

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 15/30  
A61K 39/008  
C07K 14/44

(11) 공개번호 특1999-022654  
(43) 공개일자 1999년03월25일

(21) 출원번호	특1997-709229		
(22) 출원일자	1997년 12월 06일		
번역문제출일자	1997년 12월 06일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 96/09141	(87) 국제공개번호	WO 96/39524
(86) 국제출원출원일자	1996년 06월 05일	(87) 국제공개일자	1996년 12월 12일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위		
	EA EURASIAN특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기스 카자흐스탄 몰도바		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 룩셈부르크		
	OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		
	국내특허 : 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 북한 대한민국 스리랑카 라이베리아 리투아니아 라트비아 마다가스카르 마케도니아 몽고 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아		
(30) 우선권주장	8/488386	1995년 06월 06일	미국(US)
	8/607,509	1996년 02월 03일	미국(US)
	8/634,642	1996년 04월 18일	미국(US)
(71) 출원인	코락사 코포레이션    길리스 스티브		
	미국 워싱턴주 98104 시애틀 콜롬비아 스트리트 1124 슈트 464		
(72) 발명자	리드 스티브 지		
	미국 워싱턴주 98005 벨뷰 122번 파인 2843		
(74) 대리인	이병호, 최달용		

**심사청구 : 없음**

**(54) 보호 면역 반응을 증강시키는 방법**

**요약**

본 발명은 종양 항원을 포함하는 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증강시키기 위한 방법 및/또는 DNA 백신을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 하나 이상의 진핵 세포 개시 인자 4A의 레이스마니아 브라질리엔시스 또는 레이스마니아 메이저 동족체 또는 이의 변이체의 생물학적 활성 부위를 함유하는 폴리펩티드 또는 핵산 조성물을 사용한다. 이러한 폴리펩티드와 조성물은 종양 치료 방법 등에서 환자의 세포 및/또는 체액의 면역 반응을 증강시키거나 유도하는데에 유용하다.

**대표도**

**도 19**

**명세서**

**관련 출원 문헌**

본 출원은 1996년 2월 23일 출원된 미국 특허 제08/607,509의 부분연속 출원이고, 1995년 6월 6일 출원된 미국 특허 제08/488,386의 부분연속 출원이고, 1994년 4월 22일 출원된 미국 특허 제 08/232,534의 부분연속 출원이다.

**기술분야**

본 발명은 분리시킨 세포나 세포 배양체 뿐만 아니라 환자 체내의 면역 반응을 증강시키기 위한 화합물과 방법에 관한 것이다. 본 발명은 특히 진핵 세포의 개시 인자 4A(eIF4A)의 동종체인 Leishmania 항체의 전부 또는 일부로 이루어진 화합물과, 면역 반응을 자극하기 위한 백신에서 그의 이용에 관한 것이다.

## 배경기술

일반적으로, 백신은 환자의 체내에서 감염이나 질병에 관련한 특이한 항원에 대하여 면역 반응을 발생시켜 감염이나 질병에 대한 면역성을 유도한다. 적당한 항원을 동정하고 이용하는 현대 기술에 의해 암과 같은 질병을 포함하여 일반적인 감염(박테리아, 바이러스 및 원생 생물에 의한 감염을 포함)에 대하여 특이성을 갖는 많은 백신을 시험하고 개발할 수 있다.

그러나, 많은 경우, 정제된 항원은 약한 면역체이므로, 원하는 대상물에 대한 면역성을 갖도록 한다 하더라도 특이한 항원에 의해 발생된 면역 반응의 정도가 면역성을 주기에는 불충분하다. 이와 같은 경우, 면역 반응을 향상시키기 위해서 보조제나 면역자극제와 같은 면역조절 약물을 사용해야 한다. 보조제는 항원과 함께 주입하였을 때 또는 항원으로써 같은 부위에 주입하였을 때 항원에 대한 특이적 면역 반응을 촉진하는 물질이다. 이러한 물질은 (1) 항원을 잡아서 천천히 놓아주고, (2) 세포가 주입 부위로 이동하도록 자극하고, (3) 림프구를 자극하거나 잡고, 또는 림프구의 급증식을 유도하고, (4) 환자의 체내에 항원의 분산을 촉진하는 것을 포함하는 여러 가지 메커니즘에 의해 작용한다. 오일, 중합체, 무기염 및 리포솜 등이 보조제로 사용되어 왔다. 비교하면, 면역자극제는 항원과 함께 투약하거나 단독으로 투약되었을 때 환자의 면역 반응을 일시적으로 증가시키는 물질이다. 대표적인 면역자극제로는 BCG(*Mycobacterium tuberculosis*)나 죽은 *Corynebacterium parvum*와 같은 박테리아가 있다. 어떤 메커니즘으로든, 보조제나 면역자극제는 비특이적 수단에 의해 일정한 면역 반응을 촉진하는 역할을 한다.

현재 사용되고 있는 많은 보조제가 갖는 단점은 독성이다. 일반적으로, 좋은 보조제(이를 테면, 원하는 면역 반응을 가장 효과적으로 촉진하는 것)일수록 독성이 강하다. 그러므로, 보조제의 독성과 약효를 잘 조절해서 사용해야 한다.

따라서, 특정한 면역 반응을 촉진하면서도 독성이 약한 화합물을 밝히는 것이 필요하다. 본 발명은 이러한 목적을 이루고 그와 연관된 그밖의 잇점도 제공한다.

### 발명의 요약

간단히 말하자면, 본 발명은 진핵 리보솜 단백질 eIF4A과 동종체인 *Leishmania* 항원 LbeIF4A나 LmeIF4A에 관련한 화합물과 방법을 제공한다. 본 발명은 일측면에 있어서, 환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 촉진하거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 방법은 (a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오타이드 및 (b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오타이드와 상보적인 뉴클레오타이드 서열과 혼성화하는 DNA서열(여기서, DNA 서열이 *Leishmania* 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 군으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열로 이루어진 LbeIF4A 폴리펩티드나 항원 및/또는 DNA 백신을 환자에게 투여하는 것이다. 본 발명의 또 다른 측면에서, (a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오타이드 및 (b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오타이드 및 (b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오타이드와 상보적인 뉴클레오타이드 서열과 혼성화하는 DNA 서열(여기서, DNA 서열이 *Leishmania* 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 군으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열로 이루어진 LmeIF4A 폴리펩티드나 항원 및/또는 DNA 백신을 환자에게 투여한다.

본 발명의 또 다른 측면에서, 환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 촉진하거나 유도하기 위하여 항원과, 서열 2의 1 내지 403번 아미노산으로 이루어진 LbeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형만 다른 그의 변이체와 항원 및/또는 DNA 백신을 포함하는 조성물을 투여한다. 또는 항원과, 서열 4의 49 내지 403번 아미노산으로 이루어진 LmeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형만 다른 그의 변이체와 항원 및/또는 DNA 백신을 포함하는 조성물을 투여한다.

본 발명의 또다른 측면에 있어서, 생물학적 시료내에서 면역 반응을 촉진하거나 유도 위한 방법은 생물학적 치료를 항원 및/또는 DNA 백신에 의해 암호화되는 항원, 그리고 상기 설명한 LbeIF4A 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함한다. 또 다른 연관된 양태에서, 상기 언급한 바와 같이 생물학적 시료를 LmeIF4A 폴리펩티드와 접촉시킴을 포함하여 생물학적 시료내 면역 반응을 증강시키거나 유도하는 방법을 제공한다(여기서, 생물학적 시료가 말초 혈액 단핵 세포와 단세포, B 세포, 모수석(dendritic)세포, 그리고 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택한 세포를 포함한다).

본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 환자의 종양에 대한 면역 반응을 촉진하거나 유도하기 위해서 환자에게 종양 항원이나 항원 및/또는 DNA 백신, 그리고 상기에 설명한 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드를 투약한다.

본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 환자의 종양을 치료하기 위하여 환자에게 상기에 설명한 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드를 투약한다.

상기에서 언급한 측면에서, LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드 대신에, 핵산 조성물로 감염되었거나 전염된 환자 세포 내에서 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터나 핵산 분자(통틀어, 핵산 조성물)를 사용한다. 핵산 조성물을 투약하는 단계는 감염되었거나 전염된 세포를 투여하는 것이다. 또한, 항원이나 종양 항원이 투약되는 경우, 핵산 조성물은 항원(같거나 다른 벡터나 분자)의 발현을 지시해야 한다.

본 발명의 이와 같은 또는 그밖의 측면은 다음의 상세한 설명과 첨부된 도면을 참조하여 분명히 이해될 것이다. 본 발명의 구체적인 참고문은 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕고자 한 것이나 이러한 특정한 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 자명하다 할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 *Leishmania* eIF4A 동종체가 보존되고 *L. braziliensis* 게놈 DNA가 LbeIF4A의 적어도 두 개의 복제물을 갖는 것을 포함하여 *Leishmania* 중 DNA의 서던블롯(Southern blot) 분석의 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 LbeIF4A 면역 토끼 혈청이 다른 Leishmania종에서 크기가 45kDa 이하인 하나의 우성 단백질과 반응하는 것을 증명하는 면역 블롯(immunoblot)분석의 결과를 나타낸다.

도 3은 L. braziliensis에 감염된 개체로부터 PBMC의 급증식을 자극하는 정제된 재조합 LbeIF4A의 능력을 나타낸 것이다.

도 4A와 4B는 L. braziliensis 감염된 환자로부터 PBMC의 사이토킨 mRNA 발현 패턴을 분석하여 얻은 결과를 나타낸다.

도 5는 L. braziliensis 감염된 개체의 PBMC에서 방출된 다음에 LbeIF4A 또는 기생 용해물로 자극시킨 IFN- $\gamma$ 의 상대적 수준을 나타낸다.

도 6은 LbeIF4A 또는 기생 용해물로 자극시킨 L. braziliensis 감염된 개체의 PBMC에서 얻은 PBMC의 상층액에서 검출된 TNF- $\alpha$  수준을 나타낸다.

도 7의 패널 A-D는 LbeIF4A가 환자의 PBMC를 자극하여 기생충 용해물의 자극에 의한 것보다 훨씬 더 높은 수준의 IL-12를 배양된 상층액에 방출시키고, IL-10이 IL-12 생산을 억제하는 것을 나타낸다.

도 8의 패널 A-B는 검사한 모든 환자의 PBMC에서 IFN- $\gamma$ 가 IL-12 의존적이고 IL-10에 의해 억제되는 것을 나타낸다.

도 9A와 9B는 LbeIF4A가 배양된 사람의 거대파아지와 착생 PBMC에서 IL-12를 자극하는 것을 보여준다.

도 10은 LbeIF4A가 사람의 유선 진행 세포 라인, THP-1에서 IL-12 p40의 생성을 자극하고, IFN- $\gamma$ 와 상승 작용하여 THP-1 세포를 자극하여 IL-12를 방출하는 것을 나타낸다.

도 11은 LbeIF4A로 처리한 쥐의 림프 노드 세포가 급증식하고 거의 배타적인 Th1 사이토킨 프로파일을 방출하는 것을 보여준다.

도 12는 LbeIF4A가 사람의 질병과 연관있다고 생각되는 동물 모델에서 L.major 감염을 방지하는 것을 증명한다.

도 13은 LbeIF4A 폴리펩티드를 사용하여 항-난자알부민 CTL을 유도하는 것을 설명하고 있다.

도 14는 LbeIF4A 폴리펩티드를 트리니트로페놀에 대하여 특이적인 항체를 유도하기 위한 보조제로서 사용하는 것을 보여준다.

도 15는 LbeIF4A 폴리펩티드에 의해 항-MUC-1 항체 생성이 촉진되는 것을 나타낸다.

도 16은 배양 세포 내에서 LbeIF4A 폴리펩티드에 의해 특이적 CTL 활성이 촉진되는 것이 나타낸다.

도 17은 LbeIF4A 폴리펩티드를 사용하거나 사용하지 않고 IL-2로 CTL 활성을 자극하는 것을 나타낸다.

도 18은 LbeIF4A 폴리펩티드에 의해 쥐의 이질반응성 CTL의 유도를 나타낸다.

도 19는 중심체에 함유된 종양 항원과 LbeIF4A 폴리펩티드의 투약에 의해 종양의 성장 억제를 나타낸다.

도 20은 중심체에 함유된 종양 항원과 LmeIF4A 폴리펩티드의 투약에 의해 종양의 성장 억제를 나타낸다.

도 21은 중심체에 함유된 종양 항원과 가용성 LmeIF4A 폴리펩티드의 투약에 의해 종양의 성장 억제를 나타낸다.

### 발명의 상세한 설명

상기에서 언급한 바와 같이, 본 발명은 환자나 세포 배양체에서 체액 및/또는 세포에 의한 면역 반응을 향상시키기 위한 것이다. 본 발명에서, 항원과 한가지 이상의 LbeIF4A 또는 LmeIF4A로부터 유도된 폴리펩티드를 환자에게 투여하여 면역 자극 항원(예: 환자가 면역 반응을 일으키는 것에 대한 항원)을 포함하는 항원에 대한 면역 반응을 개시하거나 촉진한다. 일반적으로, 항원과 면역자극 항원은 단백질 분자이고, HIV, HBV, 인플루엔자 바이러스, 호흡 신시티아 바이러스, 바이러스(예: Hemophilus influenza, Pneumococcus pneumoniae), 그리고 기생충(예: Leishmania)과 Trypanosoma를 포함한다. 또한, 종양에 대한 면역 반응은 환자에게 종양 항원(예: 종양에 대한 CTL과 같은 면역 반응을 자극하는 항원)을 투여하여 촉진하거나 유도한다. 본 발명에서, 종양 항원은 바이러스에 의해 암호화된 분자, MAGE-1, Her-2, PSA, 그리고 기타 분자를 포함한다. 따라서, 본 발명은 방법은 특정한 항원이나 면역자극 항원과 LbeIF4A에서 유도한 폴리펩티드를 함께 투여하는 것이다. 종양은 또한 환자에게 LbeIF4A나 LmeIF4A 폴리펩티드를 외부로부터 종양항원 없이 투여하여 치료될 수 있다.

본 발명의 LbeIF4A 및 LmeIF4A 폴리펩티드는 DNA 백신에 의해 암호화된 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 촉진하는데 이용된다. DNA 백신은 한가지 이상의 면역 자극 항원을 암호화하여 항원이 생성된다. 예를 들면, DNA 백신은 종양 항원과, 추가로 LbeIF4A-유도 폴리펩티드를 암호화한다. 이런 백신에서, DNA는 핵산 발현 시스템과, 박테리아 및 바이러스 발현 시스템과 같이 본 기술에 공지된 여러가지 발현 시스템 내에 존재한다. 적당한 핵산 발현 시스템은 환자의 체내에 발현을 위해 필요한 DNA 서열(예: 촉진 유전자)을 갖는다. 박테리아 발현 시스템에서 세포 표면에 전립선 세포 항원의 에피토프를 발현하는 Bacillus-Calmette-Guerrin과 같은 박테리아를 투여한다. 바이러스 발현 시스템(예: 백신시아 또는 기타 독성 바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스)을 이용하여 DNA를 도입시킬 수 있다. 적당한 시스템으로는 Fisher-Hoch et al., PNAS 86: 317-321, 1989; Flexner et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569: 86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine 8: 17-21, 1990; U.S. Patent No. 4,603,112, 5,769,330, 5,017,487; WO 89/01973; U.S. Patent No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6: 616-627, 1988; Rosenfeld et al., Science 252: 431-434, 1991; Kolls et al., PNAS 91: 215-219, 1994; Kass-Eisler et al., PNAS 90: 11498-11502, 1993; Guzman et al., Circulation 88: 2838-2848, 1993; 그리고 Guzman et al., Cir. Res. 73: 1202-1207, 1993에 나와 있다.

DNA를 발현 시스템에 도입시키는 방법은 본 기술에 공지된 것이다. DNA도 또한 공개된 것으로서, PCT 출원 WO 90/11092와 Ulmer et al., Science 259 : 1745-1749, 1993에 공개되어, Cohen, Science 259 : 1691-1692, 1993에 개재되었다. DNA를 생분해가능한 비드에 입혀서 효율적으로 세포내부로 전달한다. 본 발명의 화합물은 일반적으로 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)내에서 Th1 또는 CTL(세포 독성 T 림프구) 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드로 이루어진다. 특히, 본 발명은 진핵 세포의 리보솜 단백질 eIF4A의 Leishmania braziliensis나 Leishmania major 동종체(이후, LbeIF4A와 LmeIF4A로 칭함.)의 전체 또는 일부 자극 부위로 이루어진 폴리펩티드를 제공한다. 여기서, PBMC는 말초신경의 혈액에 존재하는 핵세포의 조제물을 말한다. 본 발명에서 폴리펩티드 아미노산 잔여기나 펩티드 공유 결합에 의해 연결된 단백질 전체 사슬과 그 부분을 포함하는 임의의 길이의 아미노산 사슬을 말한다. 그러므로, LbeIF4A 폴리펩티드는 LbeIF4A나 그 부분 또는 자극 활성을 갖는 그의 변이체로 이루어진다. 마찬가지로, LmeIF4A 폴리펩티드는 LmeIF4A나 그 부분 또는 자극 활성을 갖는 그의 변이체로 이루어진다. 여기서, LeIF4A는 LeIF4A나 LmeIF4A를 말한다. 본 발명에서는 LeIF4A가 예시되어 있지만, LeIF4A나 그의 부분, 및 폴리펩티드의 변이체(또는 그의 부분)를 사용할 수 있다. LeIF4A 폴리펩티드는 LeIF4A의 한 개 이상의 자극 부분으로 이루어지고, 또는 자극 부분(들)은 추가 LeIF4A 서열 및/또는 LeIF4A에 이중성인 아미노산 서열을 갖는 보다 큰 단백질 내에 제공된다.

바람직하게, 폴리펩티드는 외부 오염물질을 포함하지 않는다.

본 발명의 폴리펩티드는 PBMC에서 Th1 또는 CTL 면역 반응을 자극할 수 있는 능력을 보유한 LbeIF4A의 변이체를 포함한다. 이와 같은 변이체에는 일차 단백질의 여러가지 구조 형태가 포함된다. 이온화 가능한 아미노기와 카복실기가 존재하기 때문에, LbeIF4A 폴리펩티드는 산성 또는 염기성염의 형태로 존재하거나, 중성 형태로 존재한다. 개별 아미노산 잔여기는 산화나 환원에 의해 변형될 수 있다.

본 발명의 범위내의 변이체에는 LbeIF4A나 그의 단편의 일차 아미노산 구조가 다른 폴리펩티드, 글리코실기와 같은 화학적 부분, 지질, 인산, 아세틸기 등과 공유결합되었거나 이중결합을 형성하여 변형된 폴리펩티드가 포함된다. 공유결합유도체는 특정 작용기를 아미노산 결사슬이나 N-말단 또는 C-말단과 연결시켜서 얻는다. 폴리펩티드가 LbeIF4A 폴리펩티드와 결합되어 있는 유도체에는, 아래에 설명한 것과 같이 재조합 DNA 기술을 이용하여 접합 단백질을 만든다. 일실시예에서, LbeIF4A 펩티드는 동시 또는 사후 번역에 의해 합성 자리로부터 세포막이나 세포벽의 내부나 외부에서 작용 부위(예: 효모  $\alpha$ -인자 선도 영역)로 단백질을 전달하는 단백질의 N-말단 부위에서 신호(또는 선도 영역) 폴리펩티드 서열과 이중 결합되어 있다.

본 발명에서 단백질의 접합체는 면역글로블린 Fc 영역과 연결된 LbeIF4A 폴리펩티드를 추가로 포함한다. LbeIF4A 접합 폴리펩티드가 항체의 저급 또는 고급 사슬로 구성되어 있으면, 네 개의 LbeIF4A 단백질 영역으로 단백질 올리고머를 형성할 수 있다. 또한, 본 발명은 로이신 지퍼 영역과 연결된 LbeIF4A 폴리펩티드를 제공한다. 로이신 지퍼 영역은 PCT 출원 WO 94/10308에 공개된 것이다. 로이신 지퍼로 이루어진 LbeIF4A 폴리펩티드는 아래에 설명한 바와 같이 화학적 결합 또는 접합 단백질에 의해 제조된다.

바람직한 단백질 접합체는 전염성 병원균(예: 항원)에 대한 면역성을 자극하는데 유용한 유전자 서열로 이루어진 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 서열은 바이러스나, 종양 세포, 기생충 또는 박테리아로부터 얻는다.

본 발명은 또한, 원패턴의 글리코실화와 관련되었거나 관련되지 않은 LbeIF4A 폴리펩티드를 포함한다. 효모나 포유 동물 발현 시스템에서 발현된 폴리펩티드는 원조 분자와 분자량이나 글리코실화 패턴이 발현 시스템에 따라서 비슷하거나 약간 다르다. 예를 들면, 이. 콜라이와 같은 박테리아에서 LbeIF4A 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 발현은 글리코실화되지 않은 분자를 얻는다. 진핵 세포 단백질의 N-글리코실화 자리는 아미노산 삼중체 Asn-A1-Z(여기서, A<sub>1</sub>은 Pro를 제외한 아미노산이고 Z는 Ser 또는 Thr이다)로 특징을 이룬다. 비활성화 N-글리코실화 자리를 갖는 LbeIF4A 폴리펩티드의 변이체는 올리고뉴클레오티드 합성, 연결 또는 위치 특이적 돌연변이 기술과 같은 공지된 기술에 의해 얻을 수 있고 본 발명의 범위에 해당한다. 그밖에도, N-연결 글리코실화 자리를 LbeIF4A 폴리펩티드에 부가할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 또한 하나 이상의 결실, 삽입, 치환 또는 그밖의 변형에 의해 원조 LeIF4A 단백질과 다른 아미노산 서열을 갖는 LeIF4A 폴리펩티드의 변이체를 포함한다. 이와 같은 변이체는 원조 LeIF4A 단백질과는 실질적으로 동종성이고 PBMC에서 Th1 또는 CTL 면역 반응을 자극하는 능력을 보유해야 한다. 여기서 실질적 동종체는 LbeIF4A와 같이 자연 발생적인 DNA 서열 암호화가 이루어지는 중간 정도의 스트린전트 조건에서 혼성화 가능한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 말한다. 상기 중간 정도의 스트린전트 조건은 5×SSC 용액 0.5% SDA, 1.0mM EDTA(pH 8.0)에서 예비세척하고; 50 내지 65°C, 5×SSC에서 하룻밤 혼성화한 후; 0.1% SDC를 함유하는 2X, 0.5X 및 0.2X SSC 각각으로 20분 동안 65°C에서 두번 세척하는 것을 포함한다. 이와 같이 LbeIF4A 폴리펩티드의 활성을 변형시킨 효과는 돌연 변이 LbeIF4A 펩티드가 Th1 또는 CTL 반응을 유도하는 능력을 분석하여 쉽게 결정할 수 있다. LbeIF4A의 바람직한 변이체는 LbeIF4A(LmeIF4A)의 Leishmania major 동종체이다.

일반적으로, 아미노산 치환은 보존적으로 이루어진다; 즉, 아미노산 치환체가 유사한 성질을 갖는 아미노산을 대체하여 펩티드 화학의 지식을 습득한 자라면 누구나 실질적으로 변화하지 않는 폴리펩티드의 이차 구조와 수성을 예상할 수 있다. 아미노산의 다음 작용기는 보존적 변화를 나타낸다: (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; (5) phe, tyr, t계, his. 본 발명에 따른 변이체는 폴리펩티드의 자극 특성과 이차 구조, 수성에 최소한의 영향을 미치는 아미노산의 결실 또는 첨가를 포함하는 다른 변형을 포함한다. 일반적으로 말단이나 내부 잔여기 또는 서열을 제거시켜 LbeIF4A의 단편을 구성할 수 있다. 적당한 변형 수단에 관한 그밖의 정보는 LbeIF4A의 서열을 다른 eIF4A계 폴리펩티드의 서열과 비교하여 얻는다. 예를 들면, 생물학적 활성에 필요하지 않은 LbeIF4A의 말단이나 내부 잔여기 또는 서열을 제거시킬 수 있다. 단백질의 변성 회복시, 부적합한 분자내 이황화물 다리의 형성을 막기 위해서 시스테인 잔여기를 없애거나 다른 아미노산으로 치환한다. 다른 돌연변이법에서, KEX2 프로테아제 활성을 갖는 효모 시스템에서 발현을 촉진하기 위하여 인접하는 이염기성 아미노산 잔여기를 변형시킨다.

LelF4A 단백질을 암호화하는 게놈 또는 cDNA 클론을 이용하여 LelF4A 단백질의 전체 사슬을 얻을 수 있다. 전체 LbeIF4A를 암호화하는 유전자 서열이 서열 1에 나와 있고 연역된 아미노산 서열은 서열 2에 나타나 있다. 전체 LmeIF4A를 암호화하는 유전자 서열이 서열 3에 나와 있고 연역된 아미노산 서열은 서열 4에 나타나 있다. 이와 같은 클론은 점막 Leishmaniasis에 걸린 환자의 혈청과 반응하는 항원을 발현시키는 클론으로 적당한 *Leishmania braziliensis*나 *Leishmania major* 발현 라이브러리를 선별한 후, 반응성 항원이 환자의 T 세포에서 증식 반응과 CTL 사이토킨 생성을 자극하는 능력과 환자의 T 세포 내에서 CTL 반응을 자극하는 능력을 분석하여 분리해낸다. 라이브러리 제조와 선별 방법은 본 기술의 지식을 습득한 자에게 공지된 것으로서, 본 발명에서 인용한 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989에 나와 있다. 간단히 말하자면, 박테리오파지 발현 라이브러리를 입히고 필터로 이동시켜 혈청과 검출제를 가지고 배양시킨다. 본 발명에서, 검출제는 항체-항원 복합물에 결합하여 공지된 수단에 의해 검출될 수 있는 화합물을 말한다. 대표적인 결합제는 리포터기와 붙는 단백질 A나 단백질 G, IgG 또는 렉틴과 같은 결합제를 함유한다. 바람직한 리포터기에는 효소, 기질, 조효소, 억제자, 염료, 방사성 핵종, 발광 작용기, 형광 작용기 및 비연결이 있다. 보다 바람직하게는, 리포터기는 테트라메틸벤지딘이나 2,2'-아지노-디-3-에틸벤즈티아졸린 술폰산과 같은 기질로 배양시켜 검출되는 호오스래디쉬 과산화효소(horseradish peroxidase)이다. 공지된 방법에 의해 혈청 내의 항체와 결합하는 단백질을 발현시키는 게놈 또는 cDNA 서열을 갖는 플렉스를 분리시켜 정제할 수 있다(Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

환자의 T 세포 분석에서 일반적으로 환자의 PBMC를 반응성 항원으로 처리하고 세포의 반응을 분석한다. 예를 들면, PBMC 상층액 중에 분비된 사이토킨을 분석한다. 바람직하게는, 분석한 사이토킨은 인터페론- $\gamma$ , 인터루킨-2, 인터루킨-12(p40 부단위이거나 생물학적으로 활성인 p70), 인터루킨-1 또는 종양 나르코시스 인자- $\alpha$ 이다. 폴리펩티드를 아래와 같이 처리함으로써 이들 Th2형 사이토킨이 감소하므로 사이토킨 인터루킨-4와 인터루킨-10도 분석할 수 있다. 예를 들면, ELISA 포맷에서 목적 사이토킨에 대하여 특이적인 상용 항체를 사용하여 제조자의 지시에 따라 양성 반응을 나타내면 사이토킨이 존재하는 것으로 결정한다. 적당한 항체는 Chemicon, Temucula, CA 그리고 PharMingen, San Diego, CA로부터 얻는다. 또는, 처리한 PBMC에서 사이토킨 인터페론- $\gamma$ , 인터루킨-2, 인터루킨-12, p40 부단위, 인터루킨-1 또는 종양 나르코시스 인자- $\alpha$  중에서 한가지 이상을 암호화하는 mRNA를 분석하고, 또는 PBMC의 급증식 반응을 알아 볼 수 있다. 또한, PBMC 상층액에 대하여 사이토킨에 특이적인 생물학적 활성을 시험하여 사이토킨을 측정할 수 있다.

PBMC에서 Th1 면역 반응을 자극할 수 있는 LbeIF4A의 변이체는 상기의 서열을 변형시키고 결과 폴리펩티드의 Th1 반응 자극 능력을 분석하여 동정한다. 이러한 분석은 환자의 PBMC를 변형시킨 폴리펩티드로 처리하고 상기의 반응을 분석하여 이루어진다. LbeIF4A의 자연 발생적 변이체는 LbeIF4ASK RM 변이체를 암호화하는 DNA로 적당한 cDNA나 유전자 라이브러리를 분별하여 다른 *Leishmania*종으로부터 분리한다.

상기에 설명한 서열 변형은 표준 재조합 기술이나 변형된 폴리펩티드의 자동 합성으로 도입할 수 있다. 예를 들면, 원조 서열의 단편과 연결할 수 있게 제한 위치의 측면에 있는 돌연변이 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 합성하여 특정 위치에 돌연변이를 일으킨다. 연결 반응 후, 재구성된 유전자 서열은 원하는 아미노산을 삽입, 치환 또는 제거한 상중체를 암호화한다.

또한, 특정 올리고뉴클레오티드의 위치 특이적 돌연변이 기술을 이용하여 특정한 코돈이 치환, 결실, 또는 삽입에 의해 변경된 유전자를 제공한다(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: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981; U.S.Patent No. 4,518,584, 4,737,462).

LbeIF4A 폴리펩티드의 발현을 위하여 재구성된 뉴클레오티드 서열에서 돌연변이는 암호 유전자의 해독 프레임워크를 그대로 두고, 바람직하게는 혼성화하여 루프나 헤어핀과 같이 이차 mRNA 구조를 생성하는 상보적 영역을 만들지 않아야 한다. 이는, 리포터 mRNA의 해독에 악영향을 미치지 않도록 하기 위한 것이다. 돌연변이 위치가 이미 설정되었다 하더라도, 돌연변이의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들면, 소정의 위치에서 돌연변이의 적정 특성을 선택하기 위하여 대상 코돈에 무작위 돌연변이를 일으켜서 발현된 LelF4A 단백질 돌연변이에서 원하는 활성을 선별한다.

LbeIF4A 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에서 모든 돌연변이가 최종 생성물에 발현되는 것은 아니다. 예를 들면, 뉴클레오티드 치환은 주로 전사된 mRNA에서 발현을 촉진하여 이차 구조 루프를 방지하거나(참고: EP 75,444A), 이. 콜라이 발현에 우선되는 코돈과 같이 선택된 숙주에 의해 보다 쉽게 번역되는 코돈을 제공한다.

자연발생적이거나 변형된 것이거나, 본 발명의 폴리펩티드는 모두 재조합 DNA 방법에 의해 제조된다. 이 방법은 LbeIF4A 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 재조합 발현 벡터 내에 삽입시키고, 재조합 미생물, 포유 동물 또는 곤충 세포 발현 시스템에서 발현을 촉진하는 조건하에 DNA 서열을 발현시키는 것을 포함한다. 본 발명에서 제공한 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열은 cDNA 단편이나 짧은 올리고뉴클레오티드의 연결자, 또는 일련의 올리고뉴클레오티드로부터 조립되어 재조합 발현 벡터 내에 삽입되어 재조합 전사 단위에서 발현되는 합성 유전자를 만든다.

재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 얻은 적당한 전사 또는 번역 조절자와 연결 조작된 LbeIF4A 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열을 갖는다. 이러한 조절자는 전사 촉진 유전자와, 전사를 제어하기 위한 선택적인 작동 유전자 서열, 적당한 mRNA 리보솜 결합 자리를 암호화하는 서열, 및 전사와 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함한다. 형질전환체의 인식을 용이하게 하는 복제 개시점과 선택가능한 표지자를 추가로 포함시킬 수도 있다.

DNA영역은 다른 DNA 영역과 기능상 연관되어 있을 때 연결 조작된다. 예를 들면, 신호 펩티드(분비 선도 유전자 서열)의 DNA는 폴리펩티드의 방출에 참여하는 전구체로서 발현될 때 폴리펩티드의 DNA와 조작 연결되고; 촉진 유전자는 서열의 전사를 제어할 때 암호 유전자 서열과 조작 연결되고; 또는 리보솜 결합 자리가 해독을 가능하게 하는 위치에 있을 때 암호 유전자 서열과 조작 연결된다. 일반적으로 조작 연결

이란 인접하거나, 분비 선도 유전자 서열인 경우, 해독 프레임 내에서라는 뜻이다. 미생물에서 발현되는 LbeIF4A 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열은 mRNA 내부에 DNA의 전사를 영구히 종료하는 인트론을 갖지 않는 것이 바람직하다.

박테리아에 사용할 발현 벡터는 선택가능한 표지자와, 공지된 클로닝 벡터 pBR322(ATCC 37017)의 유전자 요소로 이루어진 상용 플라스미드로부터 얻은 박테리아의 복제 개시점으로 구성된다. 이와 같은 상용 벡터에는 pKK223-(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)과 pGEM1(Promega Biotec, Madison, WI, USA)가 있다. 이들 pBR322 주형부는 적당한 촉진 유전자와 발현시킬 구조 유전자와 결합된다. 이. 콜라이는 보통 이. 콜라이 종으로부터 얻은 플라스미드인 pBR322의 유도체를 사용하여 형질전환된다(Bolivar et al., Gene 2 : 95, 1977). pBR322는 암피실린과 테트라사이클린 내성주 유전자를 가지고, 형질전환된 세포를 동정하는 간단한 수단을 제공한다.

재조합 미생물 발현 시스템에 일반적으로 사용되는 촉진 유전자에는  $\beta$ -락타마아제(페니실라아제)와 락토 오스 촉진자 시스템(Chang et al., Nature 275 : 615, 1978; Goeddel et al., Nature 281 : 544, 1979), 트립토판(trp) 촉진자 시스템(Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8 : 4057, 1980; EP-A-36,776) 그리고 tac 촉진유전자(Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p412, 1982)가 있다. 특히 유용한 박테리아 발현 시스템에는 파아지  $\lambda$  P<sub>L</sub> 촉진 유전자와 c1857ts 열의존성 억제자가 이용된다. 파아지  $\lambda$  P<sub>L</sub> 촉진 유전자의 유도체를 결합하는 American Type Culture Collection에서 얻을 수 있는 플라스미드 벡터에는 이. 콜라이 JMB9(ATCC 37092)에 사는 플라스미드 pHUB2와 이. 콜라이 RRI(ATCC 53082)에 사는 pPLc280이 있다.

효모 벡터에서 적당한 촉진 유전자에는 metallothionein, 3-포스포글리세르산 조효소(Hitzeman et al., J. Biol. Chem 255 : 2073, 1980) 또는 기타 해당 효소(Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7 : 149, 1968; Holland et al., Biochem. 17 : 4900, 1978)이 포함된다. 이들 효소에는 에놀라아제, 글리세르알데히드-3-인산 탈수소화 효소, 헥소키나아제, 피루브산 카복시 이탈효소, 포스포프рук토키나아제, 글루코오스-6-인산 이성질화 효소, 3-포스포글리세르산 무타아제, 피루브산 조효소, 트리오스인산 이성질화제, 포스포글루코오스 이성질화제, 및 글루코키나아제가 있다. 효모 발현에 사용되는 적당한 벡터와 촉진 유전자는 R. Hitzeman et al., EP-A-73,657에도 나와 있다.

바람직한 효모 벡터는 이. 콜라이에서 선택 및 복제되는 pBR322로부터 추출한 DNA와, 글루코오스-억제가 가능한 ADH2 촉진 유전자와  $\alpha$ -인자 분비 선도 유전자를 포함하는 효모 DNA 서열을 이용하여 구성할 수 있다. ADH2 촉진 유전자는 Russel et al.(J. Biol. Chem. 258 : 2674, 1982)와 Beier et al.(Nature 300 : 724, 1982)에 의해 소개되었다. 이중성 단백질의 분비를 지시하는 효모  $\alpha$ -인자 선도 유전자는 촉진자와 발현시킬 구조 유전자 사이에 삽입한다(Kurjan et al., Cell 30 : 933, 1982; Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 5330, 1984). 선도 유전자는 선도 유전자를 외부 유전자와 쉽게 접합하도록 하는 한개 이상의 유용한 제한 위치를 3' 말단 가까이에 갖도록 변형시킨다. 척추 동물 세포의 형질 전환에 사용되는 발현 벡터에서 전사 및 번역 제어 유전자 서열은 바이러스로부터 추출한다. 예를 들면, 일반적으로 사용되는 촉진 유전자와 상승 유전자는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시미언 바이러스 40(SV40), 사람의 사이토메가로바이러스로부터 얻는다. SV40 오리진과 같이 SV40 바이러스 게놈으로부터 추출한 DNA 서열과 초기 및 후기 촉진 유전자, 상승 유전자, 스플라이스 및 폴리아데닐화 자리는 이중성 DNA 서열을 발현하는데 필요한 다른 유전자 요소를 제공하는데 사용된다. 초기 및 후기 촉진 유전자는 모두 바이러스로부터 SV40 바이러스의 복제 개시점을 갖는 단편으로서 쉽게 얻을 수 있기 때문에 특히 유용하다(Fiers et al., Nature 273 : 113, 1978). Hind III 자리로부터 바이러스의 복제 개시점에 위치한 Bgl II 자리로 확장 형성된 약 250bp 서열이 주어진 경우, 보다 크거나 작은 SV40 단편을 사용한다. 또한, 제어 유전자 서열이 선택된 숙주 세포와 양립가능하다면 바이러스 게놈 촉진 유전자와 제어 및/또는 신호 서열을 이용한다. 예시한 벡터는 Okayama and Berg, Mol. Cell. Biol. 3 : 280, 1983에 설명된 바와 같이 구성한다.

쥐의 유선 상피 세포에서 포유 동물 수용기 cDNA를 안정하게 고수준 발현시키기 위한 시스템은 Cosman et al.(Mol. Immunol. 23 : 935, 1986)이 소개한 바와 같이 구성한다. LbeIF4A 단백질 DNA를 발현시키기 위한 바람직한 진핵 벡터는 pDC406(McMahan et al., EMBO J. 10 : 2821, 1991)이고, SV40, 사람의 면역결핍 바이러스(HIV), Epstein-Barr 바이러스(EBV)로부터 추출한 조절 유전자 서열을 포함한다. 그밖의 다른 바람직한 벡터에는 pDC406에서 얻은 pDC409와 pDC410이 포함된다. pDC410은 EBV 복제 개시점을 SV40 대형 T 항원을 암호화하는 서열로 자극하여 pDC406으로부터 추출한다. pDC409는 다중 클로닝 자리 밖의 Bgl II 제한 자리가 결실되어 Bgl II 자리가 다중 클로닝 자리 내부에 유일하게 있다는 점에서 pDC406과 다르다.

pDC406과 pDC409와 같이 EBV 복제 개시점을 갖는 발현 벡터의 복제를 가능케 하는 유용한 세포라인은 CV-1/EBNA(ATCC CRL 10478)이다. CV-1/EBNA 세포라인은 CV-1 세포 라인을 Epstein-Barr 바이러스 핵 항원-1(EBNA-1)을 암호화하는 유전자로 감염시켜서 얻고, 기본적으로 사람의 CMV 즉석 초기 상승 유전자/촉진 유전자로부터 얻은 EBNA-1을 발현시킨다.

형질 전환된 숙주 세포는 재조합 DNA 기술에 의해 구성된 발현 벡터로 형질 전환되고 감염되고, 본 발명의 LbeIF4A 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 갖는 세포이다. 형질 전환된 숙주 세포는 원하는 LbeIF4A 폴리펩티드를 발현시킬 수 있지만, LbeIF4A DNA를 클로닝하거나 증폭시키기 위해 형질 전환된 숙주 세포는 LbeIF4A 단백질을 발현하는데 필요 없다. 발현된 LbeIF4A 단백질은 선택된 DNA에 따라 배양액 상층액 내부로 방출되고 세포막 내에 저장된다.

재조합 단백질의 발현에 적합한 숙주 세포에는 적당한 촉진 유전자의 제어를 받는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포가 포함된다. 원핵 세포에는 이. 콜라이나 바실러스 같은 그램 음성 또는 그램 양성 유기물이 포함된다. 고등 진핵 세포는 아래에 설명한 것과 같이 곤충이나 포유 동물의 세포 라인을 포함한다. 본 발명의 DNA로부터 얻은 RNA를 이용하여 LbeIF4A 단백질을 만드는 데에 세포의 번역 시스템을 사용할 수 있다. 박테리아나 버섯, 효모, 포유 동물의 세포 숙주와 함께 사용할 적당한 클로닝 및 발현 벡터에 대하여 Pouwels et al., Cloning Vectors : A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985에 나와 있다.

원핵 세포 발현 숙주는 더 이상의 단백질 가수분해나 이황화물 처리를 필요로 하지 않는 LbeIF4A 폴리펩



티드의 발현에 이용된다. 원핵 세포 발현 벡터는 항생 내성을 제공하거나 독립 영양 필요물을 제공하는 단백질을 암호화하는 유전자와 숙주 내에서 증폭을 위해 숙주가 인식하는 복제 개시 서열과 같이 한가지 이상의 표현형을 가진 선택가능한 표시 유전자로 이루어진다. 형질 전환에 적당한 원핵 숙주에는 다른 숙주도 가능하지만 이. 콜라이, 바실러스 셉틸리스, 티피무리움, 및 슈도모나스속과 포도구균에 속하는 여러 가지 종이 있다.

재조합 LbeIF4A 폴리펩티드는 바람직하게는 에스. 세레비지아에와 같은 사카로미세스 종으로부터 얻은 효모 숙주 내에서 발현된다. 피키이나 클루이베로마이세스와 같은 다른 속의 효모도 사용할 수 있다. 효모 벡터는 2 $\mu$  효모 플라스미드로부터 얻은 복제 개시 유전자와 자동 복제 서열(ARS), 촉진 유전자, LbeIF4A 폴리펩티드를 암호화하는 DNA, 폴리아데닐화 및 전사 종결 서열, 그리고 선택 유전자를 갖는다. 바람직하게는, 효모 벡터는 복제 개시 유전자와, 효모와 이. 콜라이의 형질 전환이 모두 가능한 선택가능한 표시 유전자를 갖는다. 그 예를 들면, 트립토판 성장 능력이 결여된 효모의 돌연변이 변형을 위한 선택 표시 유전자를 제공하는 이. 콜라이와 에스. 세레비지아에 trp1 유전자의 암피실린 내성 유전자와, 구조 서열의 하향 전사를 유발하는 고도로 발현된 효모 유전자로부터 추출한 촉진 유전자가 있다. 효모 숙주 세포 계능에 trp1 연결이 있으면 트립토판 없이 성장에 의한 형질전환을 검출할 수 있는 효과적인 환경을 제공한다.

적당한 효모 형질 전환 규약은 관련 기술의 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 것이다. Hind et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75 : 1929, 1978)에 의한 제안된 기술을 예로 들면, 0.67% 효모 질소 기질과 0.5% 카사미노산, 2% 글루코오스, 10mg/ml 아데닌 및 20mg/ml 우라실로 구성된 선택적인 배지에 Trp<sup>+</sup> 형질 전환체를 선택한다. ADH2 촉진 유전자로 이루어진 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 변형체는 1% 효모 추출물과, 2% 펩톤, 및 아데닌 80mg/ml와 우라실 80mg/ml로 보충된 1% 글루코오스로 이루어진 부양 배지에서 성장 발현한다. 배지 글루코오스가 소모되면 ADH2 촉진 유전자의 발현이 중단된다. 여과를 통하여 원형의 효모 상정액을 얻고 다시 여과하기 전에 4°C에 보관한다.

재조합 단백질을 발현하는 데에는 여러 가지 포유 동물 또는 곤충(예 : 스포도프테라 또는 트리코플루시사) 세포 배양 시스템을 이용하기도 한다. 곤충 세포에서 이중 단백질을 생산하기 위한 바쿠로바이러스 시스템이 Luckow and Summers. Bio/Technology 6 : 47, 1988에 소개되어 있다. 적당한 포유 동물 숙주 세포 라인에는 Gluzman(Cell 23 : 175, 1981)이 제안한 원숭이 신장 세포의 COS-7 라인과, 그리고 CV-1/EBNA(ATCC CRL 10478), L 세포, C127, 3T3, 중국 햄스터 난소(CHO), COS, NS-1, HeLa 및 BAK 세포 라인을 포함하는 벡터를 발현시키기 위한 그밖의 세포 라인이 있다. 포유 동물 발현 벡터는 복제 개시 유전자와 같은 비전사 성분과, 발현될 유전자와 연결된 촉진 유전자와, 비전사 유전자 측면의 5' 또는 3' 자리, 그리고 필요한 리보솜 결합 자리, 폴리아데닐화 자리, 슬라이스 공여체 및 수용체 자리, 전사 종결 서열과 같은 5' 또는 3' 비전사 서열로 구성된다.

본 발명에 따른 DNA의 재조합 번역 생성물을 발현시킬 적당한 숙주/벡터 시스템을 배양하고 배양 배지나 세포 추출물로부터 정제하여 정제된 LbeIF4A 폴리펩티드를 만든다. 예를 들면, 배양 배지에 재조합 단백질을 방출하는 시스템의 상정액을 먼저 Amicon이나 Millipore Pellicon 초여과 장치와 같은 상용의 단백질 농축 필터로 농축시킨다. 농축 단계 이후에는, 농축물을 적당한 정제 매트릭스에 가한다. 적당한 친화성 매트릭스는 역구조 단백질(구조에 의한 소정의 상호작용 때문에 LbeIF4A와 결합하고 있는 단백질)이나 락틴, 또는 적당한 지지물에 결합된 항체 분자로 이루어진다. 또는, 한쪽 디에틸아미노에틸(DEAE)기를 가진 매트릭스나 기질과 같이 음이온 교환 수지를 이용할 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로오스, 덱스트린, 셀룰로오스, 또는 단백질 정제에 흔히 사용되는 다른 종류를 포함한다. 적당한 양이온 교환 수지로는 술포프로필이나 카복시메틸기로 이루어진 여러 가지 비가용성 매트릭스가 있다. 술포프로필기가 적당하다. 겔 크로마토그래피도 LbeIF4A를 정제하는 수단을 제공한다.

LbeIF4A 폴리펩티드를 정제하기 위한 적당한 방법으로는 친화성 크로마토그래피가 있다. 예를 들면, 면역 글로블린 Fc 영역으로 이루어진 접합 단백질로서 발현된 LbeIF4A 폴리펩티드를 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피로 정제한다. 또한, 루이신 지퍼 부위로 이루어진 LbeIF4A 단백질은 루이신 지퍼 단백질에 특이적인 항체로 구성된 수지상에서 정제한다. LbeIF4A 단백질에 대한 단일클론 항체도 공지된 방법을 사용하여 친화성 크로마토그래피 정제법에 유용하게 쓰인다.

마지막으로, LbeIF4A 단백질 조성물을 보다 정제하기 위하여 소수성 RP-HPLC 매질(예 : 한쪽 메틸기와 다른쪽 지방족기를 갖는 실리카겔)을 이용하는 한가지 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용한다. 다음의 정제법을 병행하여 균일한 재조합 단백질을 만들 수 있다.

박테리아 배지에서 만든 LbeIF4A 폴리펩티드를 세포로부터 초기 추출하여 분리하고 한번 이상의 농축, 염석, 수용성 이온 교환 또는 크기 분류 크로마토그래피 단계를 거친다. 재조합 LbeIF4A 단백질 발현에 사용된 미생물 세포를 동결-융해, 초음파, 기계적 분쇄 또는 세포 용해제를 이용하여 파쇄한다.

방출단백질로서 LbeIF4A 폴리펩티드를 발현하는 효모를 발효시키면 정제 과정을 보다 간소화할 수 있다. 대규모 발현에 의한 방출된 재조합 단백질은 Urdal et al.(J. Chromatog. 296 : 171, 1984)가 공개한 방법에 상응한 방법으로 정제한다. 여기서, 두 번의 순차적인 역상 HPLC정제 과정으로 재조합 사람 GM-CSF를 HPLC관위에서 정제한다.

재조합 배양체에서 합성된 LbeIF4A 폴리펩티드의 제조물은 배양체로부터 LbeIF4A 단백질을 회수하기 위한 정제 단계에 따라 그 양과 특성이 다르지만 단백질을 포함하는 비LbeIF4A 세포 성분을 함유한다. 이들 성분은 효모나 원핵 세포 또는 사람의 것이 아닌 진핵 세포물로부터 얻은 것이다. 이 조제물에는 자연상태에서 발견되었을 때처럼 LbeIF4A 단백질과 결합하는 다른 단백질이 들어있지 않다.

자동 합성으로의 약 100개의 아미노산과 약 50개이상의 아미노산을 갖는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 제조하는 다른 방법을 수행할 수 있다. 예를 들면, 아미노산을 성장하고 있는 아미노산 사슬에 첨가하는 Merrifield 고상 합성법과 같은 상용의 고상기법을 이용한다.(참조 : Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149-2146, 1963). 폴리펩티드의 자동 합성 장비는 캘리포니아 포스터시의 Applied Biosystems, Inc.와 같은 공급처로부터 구입할 수 있다.

LbeIF4A 폴리펩티드의 또 다른 제조방법으로, 본 발명은 LbeIF4A 폴리펩티드나 그의 부분을 암호화하는 핵산 분자를 공급하는 조성물을 포함한다. 이 조성물은 재조합 바이러스 벡터(예 : 레트로바이러스(WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698, WO 94/03622), 아데노바이러스(Barkner, Biotechniques 6 : 616-627, 1988; Li et al., Hum. Gene Ther. 4 : 403-409, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5 : 130-134, 1993; Koll et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 215-219, 1994), 폭스 바이러스(USP No. 4,759,330; USP No. 5, 017,487; WO 89/01973), 네이키드 DNA(WO 90/11092), 다중양이온 분자와 복합된 핵산 분자(WO 93/03709), 리포솜과 연결된 핵산(Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7851, 1987)을 포함한다. 또 다른 실시예에서, DNA는 죽이거나 비활성화시킨 아데노바이러스를 사용한다(Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3 : 147-154, 1992; Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 6094, 1992), 그밖의 적합한 조성물은 DNA-리간드 조합물(Wu et al., J. Biol. Chem. 264 : 16985-16987, 1989)과 리피드-DNA 조합물(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7413-7417, 1989)를 포함한다. 또한, DNA를 생분해 가능한 라텍스 비드에 입혀서 세포내에 도입된 네이키드 DNA를 증가시킬 수 있다.

그 외에도, 동물에서 세포를 분리하여 변형시키고, 동일한 또는 다른 동물에 놓는 방법이 있다. LbeIF4A 핵산 분자를 조직 세포 내로 도입시키기 위한 상기 조성물중 어느 것을 이용해도 상관없다. 바이러스, 물리, 화학적 방법에 관한 규칙은 공지된 것이다.

상기에 언급한 바와 같이, 본 발명은 면역 반응을 촉진시키거나 유도하는 폴리펩티드나 관련 핵산 조성물을 이용하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에서 LbeIF4A는 Leishmania에 걸린 개체로부터 PBMC의 급증식을 자극하는 에피토프를 함유하고 있다는 사실이 발견되었다. LbeIF4A는 감염된 개체로부터 PBMC를 자극하여 배타적인 Th1 사이토킨 프로파일을 발생시킨다. Th1 반응은 종양 나르코시스 인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )뿐만 아니라, 사이토킨 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-12(IL-12) 또한 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )로 특징지을 수 있다. IL-12는 생물학적으로 활성인 IL-12 p70의 생산에서 동시 발현되어야 하는 p40 및 p35 부단위로 이루어진 이종이합체 분자이다. p40 부단위는 IL-12 생산 세포에 의해서만 만들어지고 박테리아와 기생충 자극 후에 유도되는 반면에, p35 부단위는 모든 곳에 편재하고 기본적으로 발현된다. 그러므로, IL-12를 생산하는 세포는 생리학적으로 비활성인 유리 p40 사슬을 많이 (10-100배) 가진다. 이 사이토킨이 Th1 반응(IFN- $\gamma$ 와 IL-12생산)에 대하여 T 세포에 영향을 미치는 작용을 하므로  $\alpha$ IL-12 생산의 자극은 특히 중요하다. 따라서, IL-12의 생산을 자극하는 단백질의 능력은 중요한 보조 특징이다.

LbeIF4A는 또한 Leishmania에 걸린 환자의 PBMC에서 IFN- $\gamma$ 과 IL-2, IL-12, p40부단위, TNF- $\alpha$ 를 암호화하는 mRNA의 Th1 프로파일을 자극한다. 이 PBMC에는 Th2 반응을 나타내는 것으로 검출된 IL-4 또는 IL-10 mRNA가 존재하지 않는다. 사실상, LbeIF4A는 환자과 정상 PBMC에 의한 LPS 유도성 IL-10L의 생산뿐 아니라, Leishmania 환자의 새로운 PBMC에 존재하는 IL-10 mRNA의 발현을 점차 하향 조절한다. 이로부터, Leishmaniasis 환자에서 보호 또는 치료성 면역 반응을 일으키는 LbeIF4A의 역할을 알 수 있다.

그리고, LbeIF4A는 사람의 마이ело이드 루케미아 세포(myeloid leukemia cell)라인 THP-1과 쥐에서 배양된 사람의 마이크로파아지 뿐만 아니라 감염되지 않은 대조 시험 개체로부터 얻은 PBMC에서 IL-12와 IL-2의 생산을 자극한다. LbeIF4A 또한 THP-1 세포를 자극하여 IL-12를 분비하는 IFN- $\gamma$ 와 상승 작용을 하고, 항-IL-12 항체가 존재하면 환자의 PBMC에 의한 IFN- $\gamma$  생성의 유도는 중단된다. IL-12와 IL-2의 생산을 자극하는 능력은 LbeIF4A가 면역 반응을 유발하는 능력을 가지고 있고, 본 발명의 폴리펩티드가 면역 반응의 비특이적 촉진에 이용될 수 있음을 증명하는 것이다.

따라서, 본 발명은 환자나 세포 배양체에서 세포의 면역 반응(예 : 항원 특이적 포낭 T 세포의 생성)을 촉진하거나 유도하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 상기에 설명한 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드를 이용하여 항원에 대한 체액 면역 반응(예 : 항원-반응성 항체 생성)을 촉진하거나 유도할 위한 방법을 제공한다. 여기서, 환자는 온혈 동물을 말하고, 특히 사람을 이르는 것이다. 환자는 Leishmaniasis와 같은 질병(또는 그밖의 전염성 질병)이나 멜라노마, 유방암, 전립선암, 림포마, 결장암 또는 그밖의 종양과 같은 암에 걸렸거나, 정상 상태(질병이나 감염이 없는)에 있다. 세포 배양체는 PBMC 제조물이나 분리시킨 같은 세포(한정적이지는 않지만, 거대파아지, 모노사이트, B 세포, dendritic cell 포함)이다. 이 세포는 Ficoll-hypaque 밀도 원심분리법과 같은 여러가지 기술에 의해 분리된다. 세포는(필수적인 것은 아니지만) Leishmaniasis에 걸린 환자로부터 분리되어 치료후 환자에 다른 질병을 재도입시킨다.

이 방법에서, LbeIF4A 펩티드(또는 핵산 조성물)가 환자나 세포 배양체에 항원과 함께 투여되어 항원에 대한 면역 반응을 촉진하거나 유도하는 면역조절제로서 작용한다. LbeIF4A 폴리펩티드는 항원과 동일한 조제물(예 : 백신)내에 투여되거나 독립적으로 투약된다. 일 실시예에서, 항원과 LbeIF4A 펩티드는 동일한 위치에 동시에 투여된다. 이때, LbeIF4A 폴리펩티드는 이중성 약제에 대한 백신 제조물에서 보조제로서 사용된다. 또 다른 실시예에서, 항원과 LbeIF4A 폴리펩티드는 환자에게 다른 위치에 투여된다. 예를 들면, LbeIF4A 폴리펩티드는 한쪽 팔에 투약되고(주사되고) 항원은 다른쪽 팔에 투여된다. 또는, LbeIF4A 항원을 투여하기 전후에 투여된다. 예를 들면, LbeIF4A 폴리펩티드는 항원 투여후 24시간 전에 투약된다. 적정한 투여량과 투여 방법은 아래에 자세히 설명하였다.

LbeIF4A 폴리펩티드가 투약되는 환자에 의해 발생하는 면역 반응은 환자의 상태에 따라 다양하다. Leishmania에 걸린 환자의 경우, 면역 반응은 우선 Th1 면역 반응(IL-12 생산 자극을 포함)과 IL-10 발현의 하향 조절이다. 감염되지 않은 개체의 경우, 면역 반응은 IL-12의 생산과 IL-12의 생산, 감마 T세포의 자극, 인터페론의 생산, 항원-반응성 CTL의 생성, 항원-특이적 항체 또는 그의조합물의 생산을 포함한다. 어떤 형태의 반응으로도 LbeIF4A 폴리펩티드와 함께 투여된 항원에 대한 환자의 면역 반응을 촉진시킬 수 있다. 또한, 멜라노마, 유방암, 림포마, 결장암, 전립선암 등으로 진단된 암에 걸린 환자의 경우 면역 반응은 CTL 반응을 포함한다. 종양을 치료하기 위해서는 면역 반응의 결과로 종양의 무게가 줄어야 한다.

LbeIF4A 폴리펩티드(또는 핵산 조성물)은 상기 방법에서 사용할 수 있도록 제약학적 조성물이나 백신으로 조제되는 것이 바람직하다. 제약학적 조성물은 일반적으로 생리학적으로 허용가능한 운반체, 부형제 또는 희석제와 함께 한가지 이상의 LbeIF4A 폴리펩티드로 이루어진다. 운반체는 사용 분량과 농도에서 무독성이다. 백신은 한가지 이상의 LbeIF4A 폴리펩티드와 증상을 나타내기 위한 한가지 이상의 부가 항원으로 이루어진다. 가용성 사이토킨 수용체, 사이토킨 및 화학치료제와 함께 LbeIF4A 단백질을 사용하는 것



도 생각할 수 있다.

투약 경로와 횟수 그리고 폴리펩티드(또는 핵산 조성물)의 투여량은 개인마다 다르고, 다른 질병의 면역이나 치료에서와 동일하게 적용된다. 일반적으로, 제약학적인 조성물과 백신은 주사(근육내 주사, 정맥 주사, 또는 피하주사 등)나, 비강을 통하여(예 : 흡입) 투약하거나 복용한다. 투여량과 횟수는 치료할 증세의 속성과 경중, 원하는 반응, 환자의 상태 등에 따라 달라진다. 바람직하게는, 2 내지 4주를 간격으로 두 번 투약한다. 적정 투여량은 환자내에서 IL-12 생성을 자극하는 LbeIF4A 폴리펩티드의 양이 환자로부터 분리한 PBCM의 상청액에 포함된 IL-12의 양이 mL당 10ng 내지 10 µg이 되도록 하여야 한다. 일반적으로 IL-12의 양은 공지된 적당한 분석법에 의해 결정한다. 숙주 1kg당 약 1pg에서 100mg까지의 범위의 일회 분량에 존재하는 LbeIF4A의 양은 보통 10pg 내지 1mg이고, 바람직하게는 100pg 내지 1 µg이다. 적당한 분량 크기는 동물의 크기에 따라 다르지만 일반적으로 동물의 체중 10-60kg에 0.01mL 내지 5mL이다. 특정한 증세에 대한 투여량도 쉽게 정할 수 있다.

또한, 세포 바람직하게는 말초 혈관 단핵 세포는 환자로부터 분리하여 LbeIF4A 폴리펩티드와 항원(중양 항원 포함)중의 하나로 자극한다. CTL 반응과 같은 항원-특이적 면역 반응이 발생하면, 세포를 다시 환자에 재접합시킨다.

본 발명의 제약학적 조성물에 공지된 운반체가 포함되지만, 운반체의 종류는 투약 방식과 지속적인 방출 투여 여부에 따라 달라진다. 피하 주사와 같은 주사 수단에 의해 투약하는 경우, 운반체는 물이나, 살린, 알콜, 지방, 왁스 또는 완충제로 이루어지는 것이 바람직하다. 구강 복용의 경우, 상기와 같은 운반체나, 만니톨이나 락토오스, 녹말, 스테아르산 마그네슘, 사카린 나트륨, 탈컴, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 탄산마그네슘과 같은 고체 상태의 운반체가 사용된다. 생분해되는 중심체(예 : 폴리락틱 갈락티드)도 본 발명에 따른 제약학적 조성물의 운반체로 사용된다. 생분해되는 중심체는 USP NO. 4,897,268과 5,075,109,US-A-08/116,484와 08/116,802(본 발명에 인용됨)는 설명되어 있다. 폴리펩티드나 폴리펩티드/항원 복합물을 생분해되는 중심체 캡슐로 싸거나 중심체의 표면에 결합시킨다. 이때, 중심체는 약 25미크론 이상인 것이 바람직하다.

제약학적 조성물과 백신은 완충제와 같은 희석제와, 아스코르빈산과 같은 산화방지제, 저분자량(잔여기 10개 이하) 폴리펩티드, 단백질, 아미노산, 글루코오스와 수크로오스, 덱스트린을 포함하는 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트제, 클루타티온 그리고 기타 안정화제와 부형제로 이루어진다. 중성 완충 살린이나 비특이적 혈청 알부민과 섞은 살린이 적당한 희석제로 이용된다. 바람직하게는 생성물을 희석액과 같은 적당한 부형제 용액(예 : 수크로오스)을 사용하여 친액제로 조제한다.

선택적으로, 면역 반응을 보다 비특이적으로 촉진시키기 위하여 LbeIF4A 폴리펩티드 외에도 여러가지 첨가제 중에서 하나를 본 발명의 백신이나 제약학적 조성물에 사용한다. 이들 첨가제에는 수산화알루미늄이나 무기오일과 같이 빠른 이화작용으로 부터 항원을 보호하도록 지정된 물질과, 리피드 A, Bortadella pertussis 또는 Mycobacterium tuberculosis와 같은 면역 반응 비특이적 자극제가 함유된다. 이 첨가제는 Freund Incomplete Adjuvant 및 Complete Adjuvant(Difro Laboratories, Detroit, MI)와 Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ)로 구입할 수 있다.

이하 본 발명의 실시예를 도면을 참조하거나 도면의 참조없이 상세히 설명된다. 특히 본 명세서에 인용한 여러 가지 참조문의 견지에서 볼 때 실시예에서 구현된 본 발명의 변형 형태가 있을 수 있음을 관련 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 분명하다 할 것이다.

#### [실시예 1]

LbeIF4A를 암호화하는 DNA의 제조

본 실시예는 *L. braziliensis* 리보솜 항원 LbeIF4A를 암호화하는 DNA서열의 분자 클로닝을 나타낸다.

유전자 발현 라이브러리를 박테리오파아지 λZAP11(Stratagene, La Jolla, CA)에서 *L. braziliensis*(MHOM/BR/75/M2903)으로부터 얻은 절단한 DNA로 구성한다. 발현 라이브러리는 점막 Leishmaniasis를 이용하여 *L. braziliensis*에 감염된 개체로부터 얻은 이. 콜라이에 미리 흡착시킨 환자의 혈청으로 선별한다. 면역반응성 재조합 항원을 함유하는 플렉을 정제하고 pBSK(-) 파아지미드를 제조자의 규약에 따라 시험한다. 엑소뉴클라아제 III를 사용하여 단일 사슬 주형 조제물에 중첩 결실을 발생시킨다. 단일 사슬 주형을 제조자(Stratagene, La Jolla, CA)가 제안한 바와 같이 VCSM13 보조자 파아지를 접종한 후에 분리해내고, Applied Biosystems Sequencer Model 373A를 이용하는 디데옥시 사슬 종료자 방법이나 Taq 염색 종료자 시스템에 의해 유전자 서열을 결정한다.

그 다음, 면역 반응성 재조합 항체를 환자의 T 세포 분석에서 실시예 5에서 설명된 바와 같이 급증식 반응을 자극하는 능력을 분석하고, 실시예 7에서 설명한 바와 같이 우성 Th1 사이토킨 프로파일을 분석한다.

아미노산 서열을 다른 단백질의 서열과 비교한 후, 재조합 클론을 상기 분석에서 동정한 결과 진행 개시 인자 4A(eIF4A)의 *Leishmania braziliensis* 동종체로 확인되었다. 분리된 클론(pLeIF.1)에는 전체 단백질 서열 중에서 첫 번째 48개 아미노산 잔여기(144개의 뉴클레오티드)가 부족하다. pLeIF.1를 삽입하여 전체 유전자 서열을 분리하는데 이용한다.

서열 1은 전체 사슬 LbeIF4A 폴리펩티드의 전체 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 개방 독출 프레임(뉴클레오티드 115 내지 1323)은 예상 분자량이 45.3kD인 403 아미노산 단백질을 암호화한다. LbeIF4A의 예견된 단백질 서열을 담배(TeIF4A), 쥐(MeIF4A), 호모(YeIF4A)에서 얻은 동종성 단백질과 비교하면, 첫 번째 20-30아미노산이 가장 많이 다르고 서열의 많은 부분이 동종인 것을 알 수 있다. LbeIF4A, TeIF4A, MeIF4A 및 YeIF4A의 길이(403,413,407,395개의 아미노산)과 분자량(45.3, 46.8, 46.4, 44.7kDa)과 등전점(5.9, 5.4, 5.5, 4.9)이 각각 비슷하다. LbeIF4A는 전체 동종성이 TeIF4A와 75.5%(일치성 57%, 보존적 치환 18.5%)이고, MeIF4A와 68.6%(일치성 50%, 보존적 치환 18.6%), YeIF4A와 67.2%(일치성 47.6%, 보존적 치환 19.6%)이다.

## [실시예 2]

## LbeIF4A 유전자의 설명

본 실시예에서 Leishmania종의 LbeIF4A DNA의 Southern blot 분석을 설명한다. Leishmania braziliensis (MHOM/BR/75/M2903), L. guyanensis (MHOM/BR/75/M4147), L. amazonensis (IFLA/Br/67/PH8), L. chagasi (MHOM/BR/82/BA-2, CI 및 MHOM/BR/84/Jonas), L. donovani (MHOM/Et/67/HU3), L. infantum (IPT-1), L. major (LTM p-2), L. tropica (1063C), Trypanosoma cruzi (MHOM/CH/00/Tulahuen C2) 그리고 T. brucei (TREU 667)이 사용된다(참고. Burns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 : 775-779, 1993). promastigotes와 epimastigotes를 무균 배지에서 배양시킨다. L. chagasi와 L. amazonensis amastigotes를 Syrian 햄스터의 비장과 BALB/c ByJ쥐의 발바닥으로부터 각각 추출하여 Burns et al., J. Immunol. 146 : 742-748, 1991에 설명한 바와 같이 정제한다.

게놈 DNA를 제조하고, LbeIF4A(BamH I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Pvu II, 및 Sst I)의 내부(Pst I 및 Not I)와 외부를 모두 절단하는 효소로 소화시키고, Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory New York, 1989에 설명된 바와 같이 0.7% 아가로오스 겔 상에서 분리시키고 Nytran(나일론)막 위에 흡수시킨다. LbeIF4A의 암호 영역의 0.94kb이하의 단편(뉴클레오티드 143 내지 1083)으로 이루어진 제한 단편을 무작위 프라이밍법에 의해 방사선 표지하고(참고. Feinberg and Bogelstein, Anal. Biochem. 137-266-268, 1984), 불꽃을 65°C에서 하룻밤 동안 혼성화시킨다. 불꽃을 0.1% SDS를 함유하는 2X, 0.5X, 0.2X SSC로 각각 65°C에서 20분 동안 두번씩 세척한다. BamH I과 Pvu II레인(도 1)에 두개의 혼성화 밴드가 나타나는 것으로 보아 L. braziliensis 게놈 DNA는 적어도 두개의 LbeIF4A 복제물을 함유한다.

도면은 또한 L. braziliensis의 eIF4A와 다른 Leishmania종 사이의 중간 보전성을 나타낸다. 동일한 혼성화 패턴을 나타내는, L. donovani 복합체(L. chagasi, L. donovani, 및 L. infantum)의 원소들로 시험한 다른 모든 Leishmania종에서 두개의 주요 Pst I 혼성화 단편이 검출되었다. LbeIF4A는 또한 더 멀리 연관된 기생충 T. cruzi와는 엄격한 혼성화 조건에서 교차 혼성화되지만 T. brucei와는 혼성화되지 않는다. 이 데이터로부터 Leishmania eIF4A 동종체의 광범위한 중간 보전성을 알 수 있다.

## [실시예 3]

## LbeIF4A의 제조

본 실시예에서는 45kDa이하의 LbeIF4A 항원 유전자 생성물의 발현과 정제를 설명한다. 게놈 클론 pLeIF.1(i. e., N-말단 48개 잔여물이 부족한 항원)의 45kDa 재조합 항원을 500ml의 IPTG-유도 배지로부터 정제한다. 함유체를 분리하고 2, 4, 및 8M 요소를 함유하는 10ml TNE(50mM Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA)에서 세척한다. 용해시킨 재조합 항원(보통, 4M 및 8M 요소 상청액)을 함유하는 분획을 분리해서 Tris-완충시킨 살린(TBS)에 대해서 투석하고 30% 황산암모니아로 침전하여 농축시킨다. 균일하게 정제하고 재조합 항원을 전기용출한다. 사용되는 모든 항원은 Immunex Corp., Seattle, WA에서 실시한 Limulus amebocyte assay에서 10pg/ml 이하 또는 1ng/mg 단백질 엔도톡신이다. 엔도톡신의 양은 사이토킨 유도 및/또는 보조제 활성도에 별로 중요하지 않는다.

다중클론 항혈청을 생산하도록 토끼를 면역시키는데 재조합 항원을 사용하였다. 성체 토끼(New Zealand White; R R Rabbitry, Stanwood, WA)에 100 µg의 무라밀 디펩티드(보조 펩티드, Calibiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA)와 함께 불완전 Freund 보조제(IFA, GIBCO, Grand Island, NY)에서 100 µg의 정제 LbeIF4A를 피하 주사한 후, 단독 IFA내에서 재조합 항원 100 µg을 4주일 동안 주사한다. 3주일 후에, 토끼에 살린에 녹인 25 µg의 LbeIF4A를 정맥 주사하고, 일주일 후에 혈청을 회수한다.

초기, 중기 또는 후기에 회수한 후, 배양체의 온도를 22-35°C로 올리고 promastigotes로부터 얻은 L. braziliensis 용해물의 이유노블롯을 다중클론 토끼 항혈청을 프로브로 사용하여 수행한다(도 2). 도 2의 패널 A는 표지물(라인 M), 비유발(라인 1) 배양체와 유발(라인 2)배양체로부터 얻은 이. 콜라이 용해물의 분자량을 이유노블롯 분석한 것을 나타낸다. 도 2의 패널 B는 L. braziliensis promastigote 용해물(라인 1), L. chagasi promastigote 용해물(라인 2), 및 L. amazonensis promastigote(라인 3) 또는 amastigote(라인 4) 용해물을 이유노블롯 분석한 것을 나타낸다.

글리콜과 β-메르캅토에타올을 사용하지 않고 SDS 시료에서 혈소판을 동결/용해에 의해 용해 반응을 시켜 기생충과 포유 동물 세포 용해물을 만든다. 10kRpm으로 원심분리하여 상청액으로부터 비가용성 물질을 분리해낸다. 단백질 농도는 Pierce BCA 단백질 분석 키트를 이용하여 결정한다. 5 내지 10 µg의 기생충 또는 세포 추출물, 또는 0.5 내지 1.0 µg의 재조합 항원을 12.5% SDS-PAGE 상에서 분리하고 전기 영동법으로 니트로셀룰로오스막에 투과시킨다. 항혈청의 반응성을 앞서 설명한 바와 같이(Skeiky et al., J. Exp. Med. 176 : 201-211, 1992)[<sup>125</sup>I]-단백질 A를 이용하여 분석한다.

토끼의 항혈청으로 크기가 45kD 이하인 우성 단백질 중을 검출하였다. 45kD eIF4A 동종체의 상대적인 세기는 분석된 모든 용해물에 대해서 유사하므로, 기생충의 초기 내지 중기 성장기나 세포내 amastigote 단계를 모방하는 온도 전이 이후에 항원을 발현시키는 것이 바람직하다. 이는 22-35°C에서 온도를 전이시킨 후 생성물이 상향 조절되는 Leishmania 열처리 단백질계와 상이하다. 예방시킨 토끼 혈청은 기생충 용해물에 반응하지 않는다.

## [실시예 4]

## LbeIF4A에 결합하는 단일클론 항체의 제조

본 실시예는 LbeIF4A에 대한 단일클론 항체의 제조를 설명하는 것이다. 정제된 재조합 LbeIF4A이나 LbeIF4A를 발현시키고 있는 감염 세포를 제조하여 미국 특허 제4,411,993에 설명된 종래의 기술을 이용하여 LbeIF4A에 대한 단일클론 항체를 생성한다. 이 항체는 LbeIF4A의 진단 또는 연구 분석 성분으로, 또는 LbeIF4A의 친화성 정제에 있어서 PBMC의 LbeIF4A 활성화를 중단하는데 사용된다.

설치류를 면역시키기 위해서, LbeIF4A 면역체를 보조제(완전 또는 불완전 Freund 보조제, 알루미늄, 또는 Ribi 보조제 R700(Ribi, Hamilton, MT)와 같은 기타 보조제)에 현탁시키고 10-100  $\mu$ 의 분량으로 BALB/c 쥐(mice) 또는 루이스 쥐(rat)과 같은 선택된 설치류에 피하 주사한다. 10일 내지 3주 후에, 면역시킨 동물에 다시 추가 면역체를 주사하고 이후 매주, 격주로, 또는 3주마다 정기적으로 주사한다. 혈청 시료를 정기적으로 dot-blot 분석(항체 샌드위치) 또는 ELISA(효소 연결 면역흡착 분석) 검사를 한다. Th1 반응 유도의 억제와 같은 다른 분석 방법도 가능하다.

적당한 항체 타이터를 검출한 후, 양성을 나타낸 동물에 살린에 녹인 항원을 정맥 주사한다. 3-4일 후에, 동물을 죽이고 스플레노사이트를 회수하여 쥐의 유선 세포 라인(예 : NS1 또는 바람직하게는 Ag 8.653[ATCC CRL 1580])과 접합시킨다. 비접합 세포와 유선세포-유선세포 혼성물, 스플레노사이트-스플레노사이트 혼성물의 급증식을 막기 위해서, 이 방법으로 만든 혼성 세포 라인을 선택성 배지(예 : 하이포क्स안탄, 아미놉테린, 티미딘 및 HAT 함유하는 것)에서 다중 마이크로타이터 플레이트에 올려놓는다.

만들어진 혼성 세포 라인을 ELISA의 방법으로 LbeIF4A와의 반응성에 따라 선별한다(Immunochem. 8 : 871, 1971; 미국 특허 제4,703,004번). 바람직한 선별 방법은 Beckman et al., J. Immunol. 144 : 4212(1990)에 소개된 항체 포획법이다. 혼성 세포 라인을 제한 희석 또는 소프트 한천에서 클로닝하여 단일클론 세포 라인을 만든다. 양성인 클론은 유성 생식 설치류의 페리토날 캐비티에 주입하여 고농도(1mg/ml)의 항 LbeIF4A 단일클론 항체를 함유하는 복수를 생성하도록 한다. 단일클론 항체는 황산암모늄 침전으로 정제된 후, 겔 제거 크로마토그래피로 다시 정제한다. 또는, 항체가 단백질 A나 단백질 G와 결합하는 것을 기본으로 하는 어피타이 크로마토그래피를 사용한다.

#### [실시예 5]

##### PBMC 증식의 LbeIF4A 자극

본 실시예는 정제 재조합 LbeIF4A가 *L. braziliensis* 감염 개체로부터 얻은 PBMC의 급증식을 자극하는 능력을 알아본다. 말초 혈액을 *L. braziliensis* 피부 감염 지역(Corte de Pedra, Bahia, Brazil)에 살고 있는 개체로부터 얻는다. 다음 중에서 적어도 한가지와 연관된 증상으로 환자를 진단한다 : leison으로부터 기생충 분리, Leishmania 용해물을 이용한 양성 피부 검사, 또는 양성 혈청 검사.

말초 혈액을 수집하고, Ficoll™ (Winthrop Laboratories, New York)을 통한 밀도 원심분리를 수행하여 PBMC를 분리해낸다. 급증식 분석에서, 지정항원 10  $\mu$ g/ml 또는 PHA(Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO) 5  $\mu$ g/ml를 사용하거나 사용하지 않고 95-well 평면바닥판에서 완전 배지(젠타마이신, 2-ME, L-글루타민, 및 10% 선별 A<sup>+</sup> 사람 혈청으로 보충한 RPMI 1640; Trimar, Hollywood, CA)에서 5일 동안 배양시킨다. 이 세포를 배양 마지막 18시간 동안 [<sup>3</sup>H] 티미딘 1  $\mu$ Ci으로 자극한다.

데이터는 세 개의 배양체의 평균 cpm으로 나타내었고, 자극 계수(SI : simulation index)는 항원이 없는 배양체의 평균 cpm에 대한 항원이 있는 배양체의 평균 cpm의 비로 나타낸다. 표 1과 도 3에 나타낸 바와 같이, 대부분의 점액성 및 활성 또는 치유된 환자의 대부분(70%)에서 얻은 PBMC나 LbeIF4A에 반응하여 서로 상이한 급증식 패턴과 함께 각각 12 내지 233 및 2 내지 64범위의 자극 계수를 나타냈다.

일반적으로, 자극 계수는 점성 개체로부터 얻은 PBMC에서 더 높다. 일부 환자의 PBMC는 기생충 용해물에서 관찰된 것에 상응하는 자극 계수를 가지고 LbeIF4A에 반응한다. 점액성 Leishmaniasis를 앓는 일부 환자에서, LbeIF4A에 대한 급증식 반응은 기생충 용해물에 의해 유도된 것보다 높다. 저액성 피부 환자와는 대조적으로, 자체 치유성 Leishmaniasis에 걸린 환자 여섯명 모두의 PBMC가 점액성 환자의 것과 상응하는 자극 계수(16-198)를 가지고 LbeIF4A에 반응하여 급증식하였다. 자연 치유된 환자(MS와 DJ)두명의 PBMC는 기생충 용해물에서 얻은 반응보다 더 큰 반응을 나타냈다. 정상적인 감염되지 않은 개체의 세포는 LbeIF4A에 의해서 최소 수준으로 자극받는다.

#### [표 1]

기생충 용해물 및 LbeIF4A 항원 반응에서 엘. 브라질리엔시스-감염된 환자로부터의 PBMC의 시험관내 증식

환자	<sup>3</sup> HITdr <b>핵심</b>		(평균 cpm(SD) x 10 <sup>-3</sup> )		
	MEDIA	LYSATE	LbeIF4A		
			S.I.		S.I.
<b>장막</b>					
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
<b>피부</b>					
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)	0.0	14.1 (2.2)	3.5
HN	0.36 (0.0)	4.73(1.7)	13	4.69(1.7)	13
<b>상피 조직</b>					
VAL	0.22 (0.0)	0.51(0.3)	2.0	2.12(0.2)	9.0
<b>가까이 피부</b>					
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
<b>장강</b>					
LV	0.14 (0.0)	0.19(0.0)	1.4	0.71(0.1)	4.0
VV	0.18 (0.0)	0.31(0.1)	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

#### [실시예 6]

PBMC에서 사이토킨 mRNA 발현의 LbeIF4A의 자극

본 실시예에서 *L. braziliensis* 감염의 경우를 확인하면서 환자로부터 추출한 PBMC의 사이토킨 mRNA 발현 패턴을 분석한다. 사이토킨 mRNA 분석에서, PBMC 0.5 내지 1ml를 서열 2(실시예 3과 같음)의 N-말단 48개의 잔여기가 부족한 LbeIF4A 항원을 이용하거나 이용하지 않고 48 내지 72시간 동안  $1-2 \times 10^6$  세포/ml로 배양시킨다. 상청액과 세포를 회수하고 폴리머라아제 사슬 반응(PCR)으로 사이토킨 mRNA를 분석한다. 사이토킨 mRNA 분석에서, Chomczynski and Sacchi(Anal. Biochem. 162 : 156-159(1987))에 설명된 바와 같이 산 구아니움 티오시안산-페놀-클로로포름 추출법을 이용하여 전체 RNA를 PBMC로부터 회수하여 분석한다. 최종 부피 20  $\mu$ 에서 폴리(dT)(Pharmacia)와 AMV 역전 전사효소(Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD)를 이용하여 상보적 DNA(RNA)를 합성한다. cDNA 시료를 물로 200  $\mu$ l로 만든다.

$\beta$ -액틴의 표준화 이후에, 희석된 cDNA 12 내지 20  $\mu$ l를 Taq 폴리머라아제(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 이용하여 반응 부피 5ml에서 0.2  $\mu$ M의 반응성 5' 및 3' 외부 프라이머를 가지고 PCR로 증폭한다. 조건은 다음과 같다 : 94°C에서 변성( $\beta$ -액틴, IL-2 및 IL-4에 1분; IFN- $\gamma$ 에 45분; IL-10에 30초), 55°C에서 급냉( $\beta$ -액틴, IL-2 및 IL-4에 1분; IL-10에 30초) 또는 60°C에서 IFN- $\gamma$ 에 45분, 72°C에서 연장. 전체 실험에서  $\beta$ -액틴, IL-2, IL-4 및 IFN- $\gamma$ 에 대한 증폭반응을 30회하였고, IL-10에 대해서는 10회 수행하였다.

사용된 프라이머 쌍과 PCR 조건은 공개되어 있다;  $\beta$ -액틴, IL-2, IL-4 및 IFN- $\gamma$ (Ehlers et al., J. Exp. Med. 173 : 23-36, 1991) 그리고 IL-10(Viera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 1172-1176, 1991). 5' 및 3' 올리고뉴클레오타이드 프라이머 각각의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다 :

(1)  $\beta$ -액틴, TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA 및

CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG;

(2) IL-2, ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT 및

GTCAGTGTGAGATGATGCTTTGAC;

(3) IL-4, ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT 및

CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT;

(4) IFN- $\gamma$ , ATGAAATATACAAGTTATATCTTTGGCTTT 및

GATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT;

(5) IL-10, TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA 및

ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA.

프로브는 사람의 유전자 서열 IL-2, IL-4 및 IFN- $\gamma$  (Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 9743-9747., 1988)와  $\beta$ -액틴(no. 65128; American type Culture Collection, Rockville, MD)을 함유하는 플라스미드를 이용하여 얻고, Hind III/EcoR I, EcoR I, Sac I/Hind III, 및 EcoR I에 의해 각각 소화된다. 사람의 IL-10 cDNA는 사람의 IL-10(Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 : 9743-9747, 1988)의 전체 암호 영역을 구성하는 535개의 염기쌍 단편을 증폭하도록 지정된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 정상적인 공여체로부터 얻은 미토겐-자극 PBMC로부터 PCR에 의해 클론된다. cDNA는 pBluescript로 다시 클론되고 BamH I/EcoR I에 의해 소화된다. 1% 아가로오스 겔에서 분리된 후, 삽입 DNA 단편을 삽입하고 전기영출하여 정제한다. 무작위 프라이밍 방법에 의해 방사선표지된 <sup>32</sup>P-프로브를 마련한다.

1.5% 아가로오스 겔 위에서 전기 영동법을 실시하여 PCR 생성물을 분석하고 나일론막으로 가져가서 <sup>32</sup>P-표지된 DNA 삽입으로 검출한다. 하룻밤 동안 55°C에서 혼성화시킨 후, 0.2% SDS를 함유하는 2X 및 1X SSC로 각각 20분씩 두 번 세척한다.

분석 결과는 도 4A와 도 4B에 나타내었다. 배양(레인 0)하기 전이나 항원(레인-)이 없는 배양 후에, 또는 20  $\mu$ g/ml *L. braziliensis* 용해물(레인 1b)이나 10  $\mu$ g/ml LbeIF4A(레인 1F) 존재하의 배양 후에 세포에 대하여 PCT 사이토킨 분석을 한다. 도 4A는 여섯명의 점액성 환자 중 세명 환자(JV, SZ 및 TE)와, *L. amazonensis* 감염된 환자(VA)의 PBMC의 사이토킨 mRNA를 분석 결과를 나타낸다. 여섯명의 환자 중에서 세명(TE, 도 4A; NO 및 E0, 도시되지 않음)에서, 배양되지 않은 PCMB는 IL-2(환자 TE 및 E0)뿐 아니라, IFN- $\gamma$ 와 IL-4에 대한 mRNA가 검출된다. IL-10 mRNA는 어느 환자의 나머지 PBMC에서도 검출되지 않는다. 그러나, 항원 자극 없이 배양시킨 후, IL-10의 합성이 분석된 대부분의 PBMC에서 상향조절되었다. 또한, 환자 TE, NO 및 E0의 나머지 PBMC에서 검출된 사이토킨 mRNA 수준은 감소한다.

양성 용해물이 Th2 사이토킨 IL4(여섯 환자 중 세명에서) 뿐만 아니라 Th1사이토킨 IFN- $\gamma$ 와 IL-2의 mRNA 발현을 자극한다. 기생충 용해물로 배양한 후에는 환자의 PBMC(SZ)중의 하나에서 IL-10 mRNA의 증가가 검출되었다. LbeIF4A 항원과 기생충 용해물 모두가 배타적 Th1 사이토킨 프로파일을 유도하는 LbeIF4A를 처리하여 모든 점액성 피부 환자의 PBMC에서 IFN- $\gamma$ 과 IL-2의 mRNA 생산을 유도한다. 사실, LbeIF4A는 항원에 의한 자극 이전에 대부분의 점액성 피부 환자의 배양된 PBMC에서 검출된 IL-10 mRNA의 합성을 하향 조절한다. 점액성 환자의 PBMC를 사용한 경우에서와 마찬가지로, LbeIF4A도 DCL 환자 VA에서 IL-10 mRNA의 합성을 하향 조절하였다.

일반적으로, IFN- $\gamma$ 와 IL-2에 대한 mRNA의 수준은 항원 자극 이전에는 검출되지 않을 정도의 양이었다가 항원 자극 후에는 브롬화 에티듐 겔에서 육안으로 확인할 정도로 증가한다. 그러나, 사이토킨인 IL-4와 IL-10의 mRNA는 PCR생성물을 방사성 탐지한 후에야 검출되어 사이토킨 메시지가 적게 들어있음을 나타낸다.

피부 환자(도 4B)로부터 추출한 PBMC에 대해서 같은 PCR 분석을 수행하였다. 네명의 환자중에서 세명(VA, JP 및 CA(도시되지 않음))의 새로운 PBMC를 분석한 결과, Th1(IFN- $\gamma$  및 IL-2)와 Th2(IL-4 및 IL-10) 사이토킨에 대한 mRNA가 검출되었다. 그러므로, 점액성 환자의 경우에 대조적으로, 피부성 Leishmaniasis

환자는 PBMC에 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 mRNA외에도 IL-10 mRNA를 가지고 있다. 항원이 없는 상태에서 PBMC를 배양시킨 후 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 mRNA가 거의 검출되지 않는 반면에, IL-10의 mRNA는 유지되거나 증가한다. 따라서, 피부성 환자에서 IL-10 mRNA의 수준은 안정하거나 PBMC가 항원 자극이 없는 상태에서 계속 IL-10 mRNA를 합성하는 것이다.

모든 피부성 환자가 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 mRNA 합성을 증가시킴으로써 기생충 용해물과 LbeIF4A 항원에 대해서 반응하고, 기생충 용해물에 의한 자극 후에 네명의 환자중에서 두명(VS 및 VS)의 IL-4 mRNA 수준이 증가한다. 세명의 환자(VA, JP 및 CA)에서, 기생충 용해물 외에 LbeIF4A도 IL-10mRNA의 발현을 감소시킨다.

자가 치유 CL 처리된 환자의 PBMC에서 사이토킨 mRNA 프로파일은 (a) 검출가능한 수준의 IL-10 mRNA를 갖는 한명의 개체를 제외하고는, 네 명의 환자 중에 세명의 신선한 PBMC에서 IL2와 IFN- $\gamma$ 의 mRNA가 검출되고, IL-10 mRNA는 약간 검출되었거나 전혀 검출되지 않았고; (b) Leishmania 용해물이 혼합된 Th1/Th2 사이토킨 프로파일의 발현을 자극한 반면에, LbeIF4A는 Th1형 사이토킨에만 mRNA 발현 증가를 유도하고 대부분의 자가 치유 개체(도시되지 않음)의 배양된 PBMC에서 IL-10mRNA의 발현을 감소시킨다.

#### [실시예 7]

##### PBMC에서 사이토킨 방출의 LbeIF4A 자극

본 실시예는 서열 2(실시예 3과 같음)의 N-말단 48개 잔여기가 부족한 LbeIF4A 항원이나 기생충 용해물로 자극한 후 *L. braziliensis* 감염된 개체로부터 얻은 PBMC의 상청액에서 방출 사이토킨의 수준을 설명한다. PBMC 상청액의 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 및 IL-10에 대해 분석한다. IFN- $\gamma$ 의 양은 쥐의 항인간 IFN- $\gamma$  mAb(Chemicon, Temucula, CA)와 다중클론 토끼 항인간 IFN- $\gamma$  혈청을 이용하는 이중 샌드위치 ELISA에 의해 정량한다. 표준 곡선을 작성하는데에는 사람의 rIFN- $\gamma$ (Genentech Inc., San Francisco, CA)를 사용한다. IFN- $\gamma$ 의 양은 쥐의 항인간 IFN- $\gamma$  mAb(Chemicon, Temucula, CA)와 다중클론 토끼 항인간 IFN- $\gamma$  혈청을 이용하는 이중 샌드위치 ELISA에 의해 정량한다. 표준 곡선을 작성하는데에는 사람의 rIFN- $\gamma$ (Genentech Inc., San Francisco, CA)를 사용한다. IL-4의 양은 쥐의 항인간 IL-4 mAb(M1)과 다중클론 토끼 항인간 IL-4 혈청(P3)을 이용하는 이중 샌드위치 ELISA에 의해 상청액 중에서 정량한다. 50pg/ml 내지 1ng/ml 범위의 표준 곡선을 작성하는데에는 사람의 IL-4(Immunex Corp., Seattle, WA)를 사용한다. IL-10의 양은 방출되는 IL-10을 포획하기 위한 쥐의 항인간 IL-4 mAb(PharMingen, San Diego, CA, Cat. # 185510)과 스트렙타비딘 이중 결합 호오스라디쉬 과산화효소와 기질로서 ABTS와 결합된 IL-10을 검출하기 위한 비오틴화 쥐의 항인간 IL-10mAb(PharMingen, San Diego, CA, Cat. # 185510)를 이용하여 측정한다. 30pg/ml 내지 2ng/ml 범위의 표준 곡선을 작성하는데에는 사람의 rIL-10(DNAX Research Institute, Palo Alto, CA)를 사용한다.

세 그룹의 환자 집단(i. e., 점액성 감염 집단, 피부성 감염 집단, 자가 치유성 피부 감염 집단)에서 얻은 세포가 10  $\mu$ g/ml의 LbeIF4A나 10  $\mu$ g/ml의 기생충 용해물에 의해 자극받은 후 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 방출한다(도 5 및 도 6). 마찬가지로, LbeIF4A는 *L. tropica* 감염된 환자(Desert Storm Patient)의 PBMC를 자극하여 IFN- $\gamma$ 를 급증시키고 방출한다(도시되지 않음). 환자의 PBMC의 상청액에서 검출된 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 수준은 감염되지 않은 대조 시험의 것보다 매우 높다. 항원에 의한 자극이 없는 경우, 점액성 감염 환자(여섯명 중에 다섯명)의 PBMC에서만 TNF- $\alpha$ 가 검출되었다(60 내지 190pg/ml). ELISA분석의 검출 한계치 이하로 나타난 것으로 보아, IL-4와 IL-10은 분석된 상청액에서 약간 검출되었거나 전혀 검출되지 않았다(도시되지 않음). 비교하면, Leishmanial 용해물도 어떤 환자에게 PBMC를 자극하여 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 방출하게 하고, IL-10도 검출된다(도시되지 않음). 결과적으로, LbeIF4A가 *L. braziliensis* 감염 환자의 PBMC에 우세한 Th1 사이토킨 프로파일을 자극한 반면에 기생충 용해물은 혼합 Th1/Th2 사이토킨 프로파일을 자극한 것으로 증명되었다.

항원 자극 후에 점액성 및 자가 치유성 환자의 PBMC 상청액에서 검출된 TNF- $\alpha$ 의 수준이 피부성 감염 환자의 것보다 더 높다(도 6). 다섯명의 점액성 감염 환자 중에서 네명(JV, SZ, AB 및 MB)의 PBMC에서 검출된 TNF- $\alpha$  수준(0.80 내지 2.20ng/ml)이 기생충 용해물로 자극한 후에 감염되지 않은 대조 시험 개체에서 얻은 PBMC의 배양체에서 검출된 것보다 높다. 마찬가지로, 같은 PBMC를 LbeIF4A로 자극시켜 상청액의 TNF- $\alpha$  수준이 0.66 내지 3.14ng/ml가 되었다. 감염되지 않은 대조군과 비교할 때, 여섯명의 자가 치유 환자 모두(GS, MS, AH, DJ, HS 및 MCT)가 LbeIF4A에 반응하여 TNF- $\alpha$ 를 많이 방출한다. 기생충 용해물에 반응하여 피부성 감염 환자의 PBMC에서 발생한 TNF- $\alpha$ 의 수준은 대조군의 것과 비슷하다. 그러나 이들 환자(RJ, AD 및 JS)에서 LbeIF4A에 자극된 PBMC는 TNF- $\alpha$ 를 생산한다. 이들 환자는 진행중인 급성 피부성 Leishmaniasis 환자이다.

#### [실시예 8]

##### LbeIF4A에 의한 IL-12 생산 자극

본 실시예는 LbeIF4A가 PBMC나 배양된 사람의 거대파아지, 착색 PBMC 외에도 *L. braziliensis* 감염 환자의 PBMC를 자극하여 IL-12를 방출하는 것을 설명한다. IL-12는 세포내 박테리아나 기생충 감염시 세포 중계 면역의 전개나 Th1 반응 발생, 및 IFN- $\gamma$  등의 면역 조절하는 역할하는 하는 것으로 밝혀졌다. 사용되는 LbeIF4A 폴리펩티드는 서열 2(실시예 3과 같음)의 N-말단 48개 잔여기가 모자란 LbeIF4A 항원이다.

IL-12 p40의 양은 mAb쌍 C11.79/C8.6을 사용하는 RIA(검출 한계 10pg/ml)로 무세포 상청액에서 측정한다(D'Andrea et al, J. Exp. Med. 179 : 1387-1398, 1992). 생물학적으로 활성인 IL-12 p70 이중이합제(검출 한계 1pg/ml)의 측정은 Kubin et al.(Blood 83 : 1847-1855, 1994)가 설명한 것과 같이 수행한다.

도 7A는 10  $\mu$ g/ml의 LbeIF4A(LeIF)에 의해 자극된 점액성 전염 환자의 PBMC가 배양 상청액에 항원(Lb)으로서 10  $\mu$ g/ml의 기생충 용해물로 자극한 IL-12 p40의 수준보다 훨씬 높은 수준으로 IL-12 p40을 방출하는 것을 나타낸다. 기생충 용해물이나 항원이 없을 때 방출된 IL-12 p40의 양이 중간으로 나타난다. LbeIF4A(LeIF+IL-10)이나 기생충 용해물(Lb+IL-10)으로 자극한 후, 환자의 PBMC에서 10  $\mu$ g/ml의 IL-10이 IL-12 p40의 생산을 감소시킨다.

감염되지 않은 개체의 PBMC를 LbeIF4A(LeIF, 도 7B)로 배양시키면, IL-12 p40이 생산된다. 반면에 기생충

용해물에 대해서는 검출되지 않는다. 항원 자극후 정상적인 PBMC에서 보다 5-100배의 IFN- $\gamma$ 를 생성하는 것으로 보아서, 환자의 PBMC에서 관찰되는 용해물 유도 p40에서 IFN- $\gamma$ 에 대한 역할을 알 수 있다(도 5).

항원 자극된 PBMC 배양체에서 관찰된 IL-12 p40이 생물학적 활성 사이토킨을 반사시키는지를 결정하기 위해, IL-12 p70을 분석한다(도 7C 및 7D). 일반적으로 p70의 생성은 p40과 같아서 생물학적 활성 IL-12가 환자의 PBMC와 정상 PBMC에서 모두 LbeIF4A에 반응하여 생성되는 것을 알 수 있다.

LbeIF4A는 또한 배양된 사람의 거대파아지(도 9A)와 착생 PBMC(도 9B)에서 IL-12 생성을 자극한다. 착생 세포는 정상 공여체의 혈액으로부터 FicoII-hypaque 성분 원심분리에 의해 분리된 PBMC로부터 얻는다.  $2 \times 10^6$  개의 PBMC가 500  $\mu$ l RPMI, 2% 사람의 AB 혈청에서 2시간 동안 배양된다. 착생 세포는 PBS로 세차례 세척하여 정제한다. 그런 다음, 자극제는 갖는 500  $\mu$ l의 시험 배지(IFN-1000U/ml, LbeIF4A(Lf) 10  $\mu$ g/ml)를 가하고 18시간 후에 상청액을 수거한다.

착색 PBMC의 IL-12 생산량은 5일된 PHA 블라스트를 사용하여 포획 성분분석에 의해 측정한다. 간단히 말하자면, IL-12 포획 항체 C11.5.14(Wister Institute)를 96 웰 플레이트에 입힌다. 표준물로 유발 실험의 상청액과 재조합 IL-12를 4일 동안 배양시킨다. 몇번 세척한 후, 5일된 PHA 블라스트를 가하고 블라스트의 급증식으로 부터 착생 PBMC 상청액의 IL-12의 농도를 결정한다.

착색 세포( $2 \times 10^6$  PBMC)를 시험 배지에서 5일간 배양하여 거대파아지를 만든 다음, PBS와 500  $\mu$ l RPMI와 2% 사람의 AB 혈청에서 세척하고, 1000U/ml IFN- $\gamma$ 를 가한다. 거대파아지는 LbeIF4A(10  $\mu$ g/ml)에 의해 자극되거나 단독 배지(M)에서 배양된다. LbeIF4A 대조 시험 거대파아지는 500  $\mu$ l RPMI와 2% 사람의 AB 혈청에 녹인 LbeIF4A로 IFN- $\gamma$  없이 배양한다. 즉, 5일된 블라스트를 2일간 거대파아지 상청액에서 배양시키는 것이다. 마지막 18시간 동안, <sup>3</sup>H 티미딘을 가한다. 중화 항-IL-12 다중클론 염소 혈청(5  $\mu$ g/ml)을 가한다.

그리고, 사람의 myeloid leukemia 세포 라인, THP-1에서 LbeIF4A는 IL-12 p40 생성을 자극한다. 세포는 24-48시간 동안 5% 태아의 보빈 혈청을 함유하는 무독성 RPMI배지에서  $10^6$  세포/ml에서 배양된다. 10  $\mu$ g/ml의 LbeIF4A는 IFN- $\gamma$ 와 상승 작용하여 THP-1 세포를 자극하여 IL-12 p40을 방출시킨다. 그 결과, LbeIF4A가 백신 보조제로 유용하다는 것을 알 수 있다.

#### [실시예 9]

LbeIF4A의 IFN- $\gamma$  생성 유도에 대한 IL-12와 IL-10의 효과

본 실시예는 서열 2(실시예 3과 같음)의 N-말단 48개 잔여기가 모자란 LbeIF4A 폴리펩티드에 반응하여 IL-12와 IFN- $\gamma$  간의 상호작용을 알아본다. 도 8A에 나타난 바와 같이, 정액성 감염 환자의 PBMC를 (LeIF) 없이 또는 10  $\mu$ g/ml의 항-IL-12(LeIF+항-IL-12)나 IL-10(LeIF+IL-10)의 존재하에 10  $\mu$ g/ml LbeIF4A로 자극시키고, 배양된 상청액의 IFN- $\gamma$  방출을 분석한다. 항-IL-12mAb와 IL-10은 모두 LbeIF4A 유도성 IFN- $\gamma$  방출을 중단한다. 그러나, Leishmanial 용해질로 자극시킨 후에는 항-IL-12mAb만이 부분적으로 IFN- $\gamma$  생산을 감소시킨다(도 8B). 결과적으로, IFN- $\gamma$  생산은 IL-12와 무관하고 IL-10에 의해 억제되는 반면에, IL-12의 생산은 IFN- $\gamma$ 와는 의존 및 독립적으로 조절된다는 것을 알 수 있다.

#### [실시예 10]

쥐(mice)에서 THI 프로파일의 LbeIF4A 자극

본 실시예는 서열 2(실시예 3과 같음)의 N-말단 48개 잔여기가 모자란 LbeIF4A 폴리펩티드가 BALB/c 쥐(mice)에서 우세한 Th1 사이토킨 프로파일을 자극하는 것을 설명한다. 보조제로서 quiIA나 CFA를 사용하여 실험 동물을 LbeIF4A나 8E(환자의 PBMC를 자극하여 고수준의 IL-10을 생산하도록 하는 L. braziliensis 미토콘드리아 hsp70의 C-말단부)로 처리한다. 10일 후에, 림프 노드(LN) 세포를 재조합 항원 없이 자극하고 배양액 상청액에서 방출된 사이토킨을 분석한다. 결과(도 11)를 보면, 상기 두가지 보조제를 모두 사용하여 LbeIF4AA와 대결시킨 후, LbeIF4A로 처리한 쥐의 LN세포는 증중식하고 거의 배타적인 Th1 사이토킨(IFN- $\gamma$ )을 방출한다. 이와 대조적으로, 8E로 처리한 쥐의 LN 세포는 Th0 반응을 내거나 Th2의 우세한 Th1/Th2형 사이토킨(보조제로서 quiIA 사용)을 생산한다. 마찬가지로, 기생충 용해질로 처리한 뒤는 혼합 사이토킨 프로파일을 나타내므로, 기생충 용해물을 백신물로서 단독으로 사용하는데 이견이 있을 수 있다(도 11).

이와 같은 결과로부터, LbeIF4A는 특이적 T 세포 백신으로 뿐만 아니라 보조제로도 사용할 수 있다는 것이 밝혀졌다. LbeIF4A이 실험상의 Leishmaniasis에서 보호 기능과 관련한 두개의 사이토킨(IFN- $\gamma$ 와 IL-12)을 포함하는 강력한 Th1 반응을 유도하기 때문에, 이 항원이 쥐를 Leishmaniasis로부터 보호하는 능력을 연구하였다. 보조제를 사용하지 않고 BALB/c 쥐를 LbeIF4A로 한 번 면역시킨 후, 7일간 L. major를 피하 주사한다. 대조 시험군과 비교하여, LbeIF4A는 L. major 전염에 대해 강력한 보호 작용을 나타낸다(도 12). 그러므로, 적어도 몇 개의 보호 에피토프가 두 개의 기생충 사이에 보존된다면, L. braziliensis로부터 추출한 이종 항원을 사용하여 L. major 감염을 예방할 수 있다.

#### [실시예 11]

LmeIF4A의 제조

본 실시예는 Leishmania major에서 얻은 LbeIF4A의 신규 변이체에 관한 것이다.

ZAP-cDNA 단방향 클로닝 키트(Stratagene, La Jolla CA)를 사용하여 L. major의 다중 A<sup>+</sup> RNA로 cDNA 발현 라이브러리를 구성한다. 서열 1의 뉴클레오티드 258 내지 1188로 구성된 방사선 표지된 DNA 프로브를 사용하여 대략 500,000 pfu를 선별할 수 있다. 0.1% SDS로 이루어진 0.5X SSC로 55°C에서 사후 혼성화 세척을 하여 약 2.5kb 삽입 서열(LmeIF4A)을 갖는 클론을 동정한다. 엑소뉴클라아제 III에 의해 cDNA 삽입 서열로부터 중첩 클론을 만들고 Taq 염색 종결 유전자로 서열을 결정한다.

LmeIF4A의 약 2.7kb cDNA 서열이 5' 스플라이스 선도 영역과 3' 측면서열뿐만 아니라 전체 암호 서열을



갖는 것으로 밝혀졌다. LmeIF4A의 전체 암호 서열을 갖는 단편을 5' 및 3' 특이적 올리고뉴클레오티드를 이용하여 PCR로 증폭한다. 5' 올리고뉴클레오티드는 ATG 개시 위치 앞의 Nde I 제한 위치를 갖는다. pET 벡터(Novagen, Madison, WI)의 Nde I 위치에 클론시키면, 단백질의 첫번째 아미노산은 비접합 재조합 LmeIF4A의 개시 코돈(Met)이 된다. pET 플라스미드 벡터와 T7폴리머라아제 발현 시스템(Novagen, Madison, WI)을 이용하여 이. 콜라이에서 비접합 rLmeIF4A 전체 사슬을 만든다. 함유체를 분리해내고 2, 4, 8M의 요소를 포함하는 10ml의 TNE(50mM TRIS, pH 8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA)에서 두번 세척한다. 재조합 항원을 포함하는 8M 요소 분획을 SDS-PAGE 겔에 가한다. 재조합 LmeIF4A을 겔로부터 전기용출이나 HPLC로 정제한다. 최종 생성물을 Limulus 분석하면 박테리아 내독소가 극히 적은 것을 알 수 있다.

LmeIF4A cDNA의 부분 서열을 분석한 결과, *L. braziliensis*에서 분리한 항원과 실질적으로 상동체(뉴클레오티드와 아미노산 수준에서)(서열 3 및 4)이다(i.e., 아미노산 서열 일치성이 90%이상).

#### [실시예 12]

##### 항원-특이적 CTL 반응의 유도

본 실시예는 다음과 같이 제조한 LmeIF4A를 이용하여 가용성 난자알부민에 대한 특이적 CTL반응의 유도를 설명한다.

C57BL/6쥐(mice)(H-2<sup>b</sup>)를 30 µg의 가용성 난자알부민(sigma, St. Louis, MO)로 면역시키고, 난자알부민 단독 또는 LmeIF4A 50 µg과 함께 폴리-락티드-글리콜리드 비드(Shouthern Research Institute, Birmingham, AL)(Lmeif/PLG) 캡슐에 싸다. 쥐에게 PLC비드(난자알부민+Lmeif/PLG)에 싸인 LmeIF4A이나 PLG 단독으로 면역시킨다. 비드의 크기는 1 내지 10 µm이다.

면역 후 3주가 지나면, 쥐를 죽이고 비장을 제거한다. 효과 인자 세포를 만들기 위하여, 5일 동안 조사한 후에(20,000rad) EG7. 난자 세포를 발현하는 비장 세포를 난자로 자극시킨다. EG7. 난자 세포 라인인 EL4 티모나 세포 라인(H-2<sup>b</sup>)(Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA)을 β-액틴의 제어하에 난자 cDNA-유입 플라스미드로 전염시켜서 얻는다(Moore et al., Cell 54 : 777-785(1988)).

<sup>51</sup>Cr 표지된 비전염성 부모 EL4 세포를 용해하지 않고 <sup>51</sup>Cr 표지된 EG7. 난자를 용해하는 효과 인자로 처리된다. 도 13에 나타난 결과를 보면, 목적 세포에 대한 효과 인자의 작용 비율로서 % 세포독성을 나타내었다. 이로부터, LmeIF4A와 함께 가용성 난자알부민으로부터 면역된 쥐에서 우수한 CTL 반응이 발생하여 특이적으로 목적 세포를 죽인다. LmeIF4A이나 PLG, 가용성 난자알부민을 각각 단독으로 사용했을 때에는 특이적 CTL 유도가 검출되지 않는다.

#### [실시예 13]

##### 트리니트로페놀에 특이적인 항체의 자극

본 실시예는 LmeIF4A에 대한 항트리니트로페닐(TNP)항체의 촉진 작용을 설명한다.

C57BL/6 쥐(mice)를 알루미늄 LmeIF4A(75 µg)이나 살린과 결합하여 3 µg의 TNP-KLH를 복강내에 주사하여 면역시킨다(0일). 10일째 되는 날에 출혈을 시키고 21일째 되는 날에(일차와 마찬가지로) 주사하고, 26일째 되는날에 출혈시킨다. 혈청을 ELISA 분석법에 의해 TNP 특이적인, 동형성 특이 항체 반응을 알아본다. 데이터는 각 ELISA에 최대 OD의 50%를 내는 항혈청의 희석도의 로그값을 도 14에 그래프로 작성하였다.

결과를 보면, 항원 단독으로 면역시켰을 때와 비교하여 LmeIF4A에 의해 항체 반응이 크게 촉진되는 것을 알 수 있다. 특히, IgE가 크게 증가하지 않았고 Th2 반응과 관련한 항체군도 발견되지 않았다. 그리고, 상기에 설명한 바와 같이 일차 IgM과 IgG 항체 반응이 LmeIF4A(75 µg)와 함께 TNP-KLH(3 µg)을 한 번 주사한 후 증대된다.

#### [실시예 14]

##### MUC-1 특이적 항체의 생산 촉진

본 실시예는 MUC-1 특이적 항체의 생산을 촉진하기 위한 LmeIF4A의 이용을 설명한다.

C57BL/6쥐(mice)를 LmeIF4A와 여러 가지로 조합한 사람의 종양 항체 MUC-1로 면역시킨다. 시험 집단은 가용성 LmeIF4A과 함께 사용하였거나 사용하지 않은 가용성 MUC-1으로 면역시킨 쥐와, 가용성 LmeIF4A와 함께 사용하였거나 사용하지 않은 PLG 비드에 고정시킨 가용성 MUC-1으로 면역시킨 쥐를 포함한다. MUC-1/PLG 실험에서, 크기가 서로 다른 두 개의 비드를 사용한다. 두 개중 한 개가 40-100 µm이면 나머지 한 개는 1-10 µm이다. 면역시킨 후, 10일, 20일, 30일후에, 쥐를 출혈시키고 혈청을 검사하여 MUC-1 특이적 항체(IgG와 IgM)가 있는지를 알아본다. 혈청 내의 µ, γ2b, γ1 동형 물질에 대해서도 검사한다.

결과는 도 15에 나타내었다. 도 15를 보면, MUC-1이나 MUC-1과 LmeIF4A로 함께 한번 면역시키면 항-MUC-1 항체 반응을 유도하기에 충분하지 않음을 알 수 있다. 그러나 MUC-1을 PLG 비드 캡슐로 싸서 투여하면 LmeIF4A가 항체 반응을 크게 향상시킨다. 작은 PLG 비드에 싸인 MUC-1을 투약하였을 때 1차 면역 후 10일 빨리 강력한 항-MUC-1 항체 반응을 일으키고, 이 제2물에 LmeIF4A를 가하면 항체 반응을 보다 강력히 촉진한다. 큰 PLG 비드에 싸인 MUC-1로 한번 면역시켰을 때 면역 후 10일 이내에 항-MUC-1 항체가 검출되지 않았으나, LmeIF4A와 함께 큰 PLG 비드로 싸인 MUC-1로 면역시키면 반응이 증폭된다. 항-MUC-1 항체의 동형 물질 분포는 IgE 반응이 검출되지 않고 IgM과 IgG γ2a, IgG γ2b, IgG γ1으로 이루어진다.

#### [실시예 15]

##### 배양세포에서 CTL 활성의 촉진

본 실시예는 배양 세포 내에서 LmeIF4A에 의해 특이적인 CTL 활성이 촉진되는 것을 설명한다.

쥐(mice)를 가용성 난자알부민 30 µg이나, PLG 비드 캡슐에 싸인 같은 농도의 난자알부민으로

면역시킨다. 2주후에, 쥐로부터 비장 세포를 제거하여 항원을 사용하지 않고 단독 LmeIF4A와, 조사된 EG7. 난자 또는 조사된 EG7. 난자와 LmeIF4A으로 자극한다. 결과는 도 16에 나와 있다.

결과적으로, 난자알부민/PLG로 면역시킨 쥐에서 난자알부민 특이적 CTL 반응이 검출된다. 또한, 배양체를 함유하는 EG7. 난자에 LmeIF4A(10 µg/ml)을 첨가하면 난자알부민/PLG로 처리된 비장 세포에서 CTL 반응이 증폭된다. 조사한 EG7. 난자 또는 EG7. 난자+LmeIF4A로 처리된 배양체에서 전체 단핵 세포의 수는 변하지 않는다는 것에 유의해야 한다(표 2, 3).

[표 11]

LmeIF4A에 의한 생체의 CTL 활성 증가

면역	생체의 자극	용해 유닛(LU)/10 <sup>6</sup> 단핵 세포
없음	항원 없음	0 -
	LmeIF4A 단독	0
	EG7. 난자	0
	EG7. 난자 + LmeIF4A	0 -
비드	항원없음	0
	LmeIF4A 단독	0
	EG7. 난자	0
	EG7. 난자 + LmeIF4A	0
OVa/비드	항원없음	0
	LmeIF4A 단독	0
	EG7. 난자	2.5
	EG7. 난자 + LmeIF4A	16.6

[표 111]

LmeIF4A 함유 배양액으로부터의 단핵 세포의 함수

면역	시험관내 자극	세포수(LU)/10 <sup>6</sup> 회수/10 <sup>7</sup> 가해진 단핵세포
난자/PLGA	항원없음	1.8
	LmeIF4A 단독	2.4
	EG7. 난자	2.52
	EG7. 난자 + LmeIF4A	2.88
	가용성 난자	3.2
	가용성 난자 + LmeIF4A	2.6

또한, LmeIF4A을 항원 특이적 CTL 활성을 강화하고 확장하는데 이용할 수 있는지도 평가한다. 난자알부민/PLG로 면역된 쥐에서 발생한 CTL은 조사한 EG7. 난자+IL-2 또는 EG7.난자+(IL-2+LmeIF4A)으로 처리하면 증폭된다. 배양후 5일째되는 날에 효과 인자 세포를 <sup>51</sup>Cr 표지된 EL4 세포와 EG7. 난자세포에 대해서 검사한다.

도 17에 나타낸 바와 같이, 특정 난자알부민에 대한 CTL는 EG7. 난자+IL-2로 처리한 효과 인자보다 EG7. 난자+LmeIF4A와 IL-2를 죽인 EG7. 난자로 처리할때 훨씬 증폭되었다. 그러나 차이는 극히 미미하다. 세포의 수에 있어서, LmeIF4A으로 처리한 배양체의 세포수가 LmeIF4A로 처리하지 않은 배양체보다 2.5배 많다. 결과는 아래의 표 4에 배양체 당 용해 단위로 나타나 있고, LmeIF4A의 전체 세기가 특이적 CTL의 수를 증가시키는 것을 알 수 있다.

[표 IV]

LmeIF4A 함유 배양액으로부터 단핵 세포 회수

면역	시험관내 자극	세포수( $10^6$ ) 회수/ $10^6$ 가해진 단핵세포	총 용해 유닛 (LU50)/배양액
Ova/PLGA sm Nr	EG7.Ova + IL-2	6.4	75.2
	EG7.Ova + IL-2 및 LmeIF4A	16	388.8

[실시에 16]

LmeIF4A에 의한 이질반응성 CTL의 유도 증대

본 실시예는 LmeIF4A에 의한 쥐의 이질반응성 CTL의 유도에 관한 것이다.

$2.5 \times 10^6$  BALB/c 비장 세포를 2ml RPMI : FCS에서  $10 \mu\text{g/ml}$ 의 겔정제화 LmeIF4A를 함께 사용하거나 사용하지 않고  $5 \times 10^6$  조사(3500R)C57BL/6 비장 세포와 함께 배양시킨다. 5일 후 배양제를 회수하여 세척하고,  $200 \mu\text{l}$  배양체에서 4시간 방출 분석으로 다른 효과 인자 세포 농도(배양체 분획)에서  $^{51}\text{Cr}$  표지된 EL4세포 (2,000/웰)에 대한 세포 활동을 알아본다. 결과는 도 18에 아래와 같이 계산된 방출량 백분율을 나타낸다 :

$$\frac{100 \times (\text{CPM 실험}) - (\text{CPM 동시})}{(\text{CPM 최대}) - (\text{CPM 동시})}$$

결과를 보면, LmeIF4A가 이형반응성 CTL을 크게 향상시키는 것을 알 수 있다. 상기에 설명한 다른 결과와 함께 생각하면, Leishmania eIF4A 동종체는 여러 분석 시스템에서 강력한 보조 활성을 나타내는 것으로 판단된다. 또한, 독성을 갖지 않고 IL-12를 유도하는 능력이 보조제로서의 가치를 높인다 할 것이다.

[실시에 17]

LmeIF4A와 항원의 투약 후 종양 성장 억제

6주 내지 8주된 C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) 쥐(mice) 암컷에 단독 LmeIF4A  $50 \mu\text{g}$ 나, 폴리-락티드-글리콜리드 비드 캡슐로 싸인 형태(LmeIF/PLG)  $30 \mu\text{g}$ , 단독 VSV 펩티드, PLG 비드에 싸인 형태의 VSV 펩티드, PLG 비드에 싸인 GM-CSF, 또는 운반체(PBS)를 피하 주사한다. EL4 세포로부터 VSV(vesicular stomatitis virus) 뉴클레오캡시드 단백질 유전자의 전염으로 N1 세포가 생성된다. VSV 뉴클레오캡시드 단백질의 플라즈미드 지시 발현이 선택가능한 표지물로서 네오마이신 내성 유전자를 함유하므로, 세포 라인을 G418을 함유하는 선택적 배지에 둔다. 재조합 LmeIF4A를 이. 콜라이 형질 전환체로부터 생성하고 HPLC로 정제한다. N1- 특이적 펩티드 항원을 화학적으로 합성하고 HPLC로 정제한다. 단백질은 PLG 중심체(Southern Research Institute, Birmingham, AL) 캡슐안에 싸들.

약  $2 \times 10^5$  N1 세포를 C57BL/6 쥐의 정측에 접종한다. 종양이 생긴 후, 쥐를 무작위로 다섯 집단으로 나누어 아래에 나열한 여러 가지 펩티드를 반대 측부에 피하 주사한다. 2 또는 3일 마다 종양의 직경을 측정하여 종양의 성장을 관찰하고  $V=4/3\pi r^3$ 의 식에 따라 체적을 계산한다.

종양 특이적 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 LmeIF4A의 효능을 검사한다. 쥐의 종양 N1에서, 8합체 항원 펩티드 에피토프 RGVYVQGL을 H-2K<sup>b</sup> 분자로 나타낸다.

도 19에서 알 수 있는 바와 같이, VSV/PLG와 LmeIF4A를 함께 주사하면 종양의 성장을 크게 억제할 수 있다. 대조 시험 쥐나 다른 항원의 조합물을 투여한 쥐에서는 이러한 억제 작용이 나타나지 않는다. 도 20를 보면, 이 결과를 확인할 수 있으며 LmeIF4A이 GM-CSF보다 더 좋은 보조제임을 알 수 있다. 이 실험에서, 종양 특이적 VSV/PLG와 LmeIF4A/PLG를 투약한 쥐에 항원을 주입한지 1주일 후에 종양의 성장이 지연된다. 다섯 마리의 쥐 중에서 세 마리의 종양이 완전히 성장을 멈춘다. 그리고, 가용성 LeIF도 PLG 캡슐에 싸인 VSV 펩티드와 함께 사용하면 강력한 종양 억제 활성을 나타낸다(도 21).

또한, LmeIF4A와 종양 항원 공동 면역을 통하여 발생한 면역 반응은 매우 특이적이다. 잔여하는 종양 덩어리를 수술로 완전히 제거한다. 이 종양 세포를  $0.2\text{mg/ml}$  G418을 함유하는 배지에서 배양하면 2일 후에 모두 죽는다. 이와 대조적으로, 종양의 접종에 사용된 원조 N1 세포는 G418에 대하여 내성을 갖는다. 그러므로, 남아있는 종양을 항원 VSV 서열과 네오마이신 내성 유전자를 갖는 발현 플라즈마를 손실한 N1 돌연변이로부터 추출한다. 그러면, LeIF는 소정의 항원에 대한 특이적 면역 반응을 촉진하고, 종양에 대한 치료 효과를 가져 올 수 있다.

[실시에 18]

LmeIF4A를 이용한 종양의 치료

C57BL/6쥐(mice) 암컷에  $2 \times 10^5$  루이스 간암 세포를 주입한다. 8일 후에, 모든 쥐에게서 종양이 검출된다. 쥐를 5마리씩 두 개의 집단으로 나눈다. 종양 접종 후 8일, 10일, 13일, 16일에 쥐에게 종양과 멀리 떨어진 부위에  $0.2\text{ml}$  살린이나,  $0.2\text{ml}$  살린에 녹인  $50 \mu\text{g}$  LmeIF를 주사한다. 8일, 10일, 13일 16일에 종양의

성장을 측정한다. 다음 표에서 볼 수 있는 바와 같이, LmeIF를 주사한 쥐에는 16일까지 종양의 성장이 감소한다.

[표 V]

LmeIF에 의한 종양 성장 억제

그룹	평균 종양 용적(mm <sup>3</sup> )			
	8일	10일	13일	16일
염수 주사	5.21	12.61	41.06	283.53
Lmeif 주사	6.79	10.83	26.75	69.48

본 발명의 특정한 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐이며, 발명의 요지와 범위에서 벗어나지 않는 한 여러가지 변형이 가능하다는 사실을 분명히 밝히고자 한다.

서열목록

(1) 일반 정보

(i) 출원인 : 리드 스티븐 지

(ii) 발명의 명칭 : 보호 면역 반응을 증강시키는 방법

(iii) 서열수 : 4

(iv) 거주 주소 :

(A) 주소 : 시드 애드 베리

(B) 거리 : 피프티 애비뉴 701 콜롬비아 센터 6300

(C) 시 : 시애틀

(D) 주 : 워싱턴주

(E) 국가 : 미국

(F) 우편번호 : 98104-7902

(v) 컴퓨터 판독형 :

(A) 매체 타입 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환성

(C) 운용 시스템 : PC-DOS/MS-DOS

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

(vi) 현출원 데이터 :

(A) 출원번호 :

(B) 출원일 : 1996년 2월 16일

(C) 분류 :

(viii) 대리인/위임자 정보 :

(A) 성명 : 노텐버그 캐롤

(B) 등록번호 : 39,317

(C) 참조/서류번호 : 210121, 40403

(ix) 통신 정보 :

(A) 전화번호 : (206) 622-4900

(B) 팩스번호 : (206) 682-6031

(2) 서열 1에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 1618 염기쌍

(B) 형태 : 핵산

(C) 본쇄형 : 일본쇄

(D) 위상 : 선형

(ix) 특징 :

(A) 명칭/키 : CDS

(B) 위치 : 115..1326

(xi) 서열 기술 :

[서열 1]

CCACTCTCTC GGTCGTCTGT CTCCCAGCGG CGCAGCAGT TGATTTCCGC CTTCTTAAAC	60
GCCTCTTTTT TTTTTTTTTT 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	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 GCC 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 Ala-Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met Arg 210 215 220	785
GAC CCC GTA CGC ATT CTC GTG AAG CGC GAG AGC CTG ACG CTG GAG GGC Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu Gly 230 235 240	837
ATC AAG CAG TTC TTC ATC GCC GTC GAG GAG GAG CAC AAG CTG GAC ACG Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp Thr 245 250 255	885
CTG ATG GAC CTG TAC GAG ACC GTG TCC ATC GCG CAG TCC GTC ATC TTC Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile Phe 260 265 270	933
GCC AAC ACC CGC CGC AAG GTG GAC TGG ATC GCC GAG AAG CTG AAT CAS Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn Gln 275 280 285	981
AGC AAC CAC ACC GTC AGC AGC ATG CAC GCC GAG ATG CCC AAG AGC GAC Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser Asp 290 295 300	1029
CGC GAG CGC GTC ATG AAC ACC TTC CGC AGC GGC AGC TCC CGC GTG CTC Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val Leu 310 315 320	1077
GTA ACG ACC GAC CTC GTG GCC CGC GGC ATC GAC GTG CAC CAC GTG AAC Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val Asn 325 330 335	1125
ATC GTC ATC AAC TTC GAC CTG CCG ACG AAC ARG GAG AAC TAC CTG CAC Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu His 340 345 350	1173
CGC ATT GGC CGC GGC GGC GGC TAC GGC GTA AAG GGT GTT GCC ATC AAC Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile Asn 355 360 365	1221
TTC GTG ACG GAG AAA GAC GTG GAG CTG CTG CAC GAG ATC GAG GGG CAC Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly His 370 375 380 385	1269
TAC CAC ACG CAG ATC GAT GAG CTC CCG GTG GAC TTT GCC GCC TAC CTC Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr Leu 390 395 400	1317
GGC GAG TGA GCGGGCCCT GCGCCCTTC CCTGCCCCC TCTGGGAGC Gly Glu	1366
AGAGAAGCA CATCGTACA CAGCCACCG AACGATAGTA AGGGCCTGG GCGGCGTTCC	1426
CCTCCTCTG CCAAGCGGCC CCTCCGCGAG CGCTTCTTT TTGAGAGGG GCGAGGGGA	1486
GGCGTSCGC CTGGCTGGAT GTGTGCTGA GCTTGCAATC CGTCAGCAA GTGCTTGT	1546
TTAATTATGC GCGCCGTTT GTTGCTGTC CCTTTCGTG GTGTTTTTC GCGCAAAACG	1606
GCCTTAAAG CA	1618

(2) 서열 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 403 아미노산

(B) 형태 : 아미노산

(D) 위상 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 기술 :



[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

(2) 서열 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 1678 염기쌍

- (B) 형태 : 핵산
- (C) 분쇄형 : 일본쇄
- (D) 위상 : 선형
- (xi) 특징 :
- (A) 명칭/키 : CDS
- (B) 위치 : 117..1325
- (xi) 서열 기술 :
- [서열 3]

C T T T A T T G T T	G A T T T C C G C C	T T C T G A A C A G	C C C T C A T T T T	T T T T T G G T T T	A C C T C T C G T T	60
G C T T G T G A C G	C C C C T C C C C C	T C T T C A C C C A	T C A A G C A C C C	C C T G T C G T C C	T C C A T C	116
A T G G C G C A G	A A T G A T A A G	A T C G C C C C A G	G A C C A G G A C	T C C T T C C T C		164
Met Ala Gln Asn Asp Lys Ile Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu						
1	5	10	15			
G A T G A C C A G	C C C G G C G T T	C G C C C G A T C	C C G T C C T T C	G A C G A C A T G	C C G	212
Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro						
	20	25	30			
C T G C A C C A G	A A C C T G C T G	C G T G G C A T C	T A C T C G T A C	G G G T T C G A G	A A G	260
Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys						
	35	40	45			
C C G T C C A G C	A T C C A G C A G	C G C G C G A T A	G C C C C T T C	A C G C G C G G C	G G C	308
Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly						
	50	55	60			
G A C A T C A T C	G C G C A G G C C	C A G T C C G G T	A C C G G C A A G	A C G G G T G C C	T T C	356
Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe						
65	70	75	80			
T C C A T C G G T	C T G C T G C A G	C G C C T G G A C	T T C C G C C A C	A A C C T G A T C	C A G	404
Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln						
	85	90	95			
G G C C T C G T G	C T C T C C C A C T	C G C G A G C T G	G C C C T G C A G	A C G G C G G A G		452
Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu						
	100	105	110			
G T G A T C A G C	C G C A T C G G T	G A G T T C C T G	T C G A A C A G C	T C C A A G T T C	T G C	500
Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ser Lys Phe Cys						
	115	120	125			
G A G A C C T T T	G T C G G C G G C	A C G C G C G T G	C A G G A T G A C	C T G C G C A A G	C T G	548
Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu						
	130	135	140			
C A G G C C G G C	G T C A T C G T T	G C C G T G G G C	A C G C C G G C	G G C G T G T C C	G A C	596
Gln Ala Gly Val Ile Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp						
145	150	155	160			
G T G A T C A A G	C G T G G C G C G	C T G C G C A C A	G A G T C G C T G	C G C G T G C T G	G T G	644
Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val						
	165	170	175			

CTC GAC GAG GCT GAT GAG ATG CTG TCT CAG GGC TTC GCG GAC CAG ATT Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile 180 185 190	592
TAC GAG ATC TTC CGC TTC CTG CCG AAG GAC ATC CAG GTC GCG CTC TTC Tyr Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe 195 200	740
TCC GCC ACG ATG CCG GAG GAG GTA CTG GAG CTG ACG AAG AAG TTC ATG Ser Ala Thr Met Pro Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met 210 215 220	788
CGC GAC CCC GTG CGT ATT CTC GTG AAG CGC GAG AGC CTG ACG CTG GAG Arg Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu 225 230 235 240	836
GGC ATC AAG CAG TTC TTC ATC GCC GTC GAA GAG GAG CAC AAG CTG GAC Gly Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp 245 250 255	884
ACG CTG ATG GAC CTG TAC GAG ACC GTG TCC ATC GCG CAG TCC GTC ATC Thr Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile 260 265 270	932
TTC GCC AAC ACG CGC CGC AAG GTG GAC TGG ATC GCC GAG AAG CTG AAC Phe Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn 275 280 285	980
CAG AGC AAC CAC ACC GTC AGC AGC ATG CAC GCC GAG ATG CCC AAG AGC Gln Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser 290 295 300	1028
GAC CGC GAG CGC GTC ATG AAC ACC TTC CGC AGC GGC AGC TCC CGC GTG Asp Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val 305 310 315 320	1076
CTC GTC ACG ACC GAC CTC GTG GCG CGC GGT ATC GAT GTG CAC CAC GTG Leu Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val 325 330 335	1124
AAC ATC GTC ATC AAC TTC GAC CTG CCA ACG AAC AAG GAG AAC TAC CTG Asn Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu 340 345 350	1172
CAT CGC ATT GGT CGC GGC GGC CGC TAC GGC CGT AAG CGT GTT GCC ATC His Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Arg Lys Gly Val Ala Ile 355 360 365	1220
AAC TTC GTG ACG GAG AAG GAC GTG GAG CTA CTG CAC GAG ATC GAG GCG Asn Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Ala 370 375 380	1268
CAC TAC CAC ACG CAG ATC GAC GAG CTC CCG GTC GAC TTC GCT GCC TAC His Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr 385 390 395 400	1316
CTT GGC GAG TAA CGGGTCCTT GCCTCCCGCC CCTCTCCTT CCATCCCAT Leu Gly Glu	1368
CCCCACCAC CCCACACACC CCCCCCGGT TCCTCGTCGG AAGAAGAAAG GACGCACATC	1428
GCCACGCGAA GGATGACGAG GGCTGAGGAG GAGCTCAGGG AACGGACTCG TCCCCGGTGA	1488
GCGGGGGGAG GAGGAGGTGA GGCCATCGCG CGAGCGCACC GCCGGAAGGT CGACCAGG6C	1548
GCTCAACACC CACCCAGCAC CCGGTTAGTT CCCTGCCCTC TCGTGCGCCT CCTCTCCCAC	1608
CCCGTAAATC TCCTGACGAC TTTGTGTGGA CCACACACGC GCGCTCTCGC TCCGTATCGG	1668
ACGGCCCTA TACAACACAA CGAACCCGCC AACGTGCCGG TCGNCTTGTG GATGTGTGTC	1728
TGGCGTAGAA CGTGCCTCTG CCCCCGTCCT ATCCCATCC CACCTCCTCG NGTGTGTGTG	1788
TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG AGTGTGTGTG TTTAAAACT ATNATNTAGA	1848
ATATATATCT ATATAGGTN	1867

(2) 서열 4에 대한 정보

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 403 염기쌍

(B) 형태 : 아미노산

(D) 위상 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 기술 :

## [서열 4]

Met Ala Gln Asn Asp<sub>5</sub> Lys Ile Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu  
 1 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 Ser 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 Ile 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 Arg Lys Gly Val Ala Ile  
 355 360 365  
 Asn Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Ala  
 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

환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아(Leishmania) 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터

터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와 항원을 포함하는 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 1 내지 403번 아미노산 또는 이의 일부를 포함하는 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 면역글로블린 Fc 영역을 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 5

환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한

(a) 서열 1의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드와 항원을 포함하는 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 1 내지 403번 아미노산 또는 이의 일부를 포함하는 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 면역글로블린 Fc 영역을 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 9

환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 항원과, 서열 2의 1 내지 403번 아미노산을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 10

환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 항원과, 서열 4의 1 내지 403번 아미노산을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 항원과 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드가 동일한 조성물 내에 존재하는 조성물.

#### 청구항 12

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 항원이 생분해성 중심체에 캡슐화되어 있는 조성물.

#### 청구항 13

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드가 생분해성 중심체의 표면에 캡슐화되어 있거나 이에 연결되어있는 조성물.

#### 청구항 14

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 항원과 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드가 생분해성 중심체에 캡슐화되어 있는 조성물.

#### 청구항 15

환자의 체내에서 DNA 백신에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드와 항원을 포함하는 조성물.

**청구항 16**

제15항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

**청구항 17**

제15항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 1 내지 403번 아미노산 또는 이의 일부를 포함하는 조성물.

**청구항 18**

제15항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 면역글로불린 Fc 영역을 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 19**

환자의 체내에서 DNA 백신에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한

(a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드와 DNA 백신을 포함하는 조성물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

**청구항 21**

제19항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 1 내지 403번 아미노산 또는 이의 일부를 포함하는 조성물.

**청구항 22**

제19항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 면역글로불린 Fc 영역을 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 23**

환자의 체내에서 DNA 백신에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 DNA 백신과, 서열 2의 1 내지 403번 아미노산을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 포함하는 조성물.

**청구항 24**

환자의 체내에서 DNA 백신에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 DNA 백신과, 서열 4의 1 내지 403번 아미노산을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 포함하는 조성물.

**청구항 25**

제15항 내지 제24항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 백신과 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드가 동일한 조성물내에 존재하는 조성물.

**청구항 26**

제15항 내지 제24항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 백신이 생분해성 중심체에 캡슐화되어 있는 조성물.

**청구항 27**

제15항 내지 제24항 중의 어느 한 항에 있어서, LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드가 생분해성 중심체의 표면에 캡슐화되어 있거나 이에 연결되어 있는 조성물.

**청구항 28**

제15항 내지 제24항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 백신과 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드가 생분해성 중심체에 캡슐화되어 있는 조성물.

**청구항 29**

환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

**청구항 30**

환자의 체내에서 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한



(a) 서열 1의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

### 청구항 31

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드와 항원을 생물학적 시료(여기서, 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵 세포, 단세포, B 세포, 모수석(dendritic) 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택한 세포를 포함한다)와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 시료 내에서 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 방법.

### 청구항 32

(a) 서열 1의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와 항원을 생물학적 시료(여기서, 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵 세포, 단세포, B 세포, 모수석 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택한 세포를 포함한다)와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 시료 내에서 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 방법.

### 청구항 33

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와 DNA 백신을 생물학적 시료(여기서, 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵 세포, 단세포, B 세포, 모수석 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택한 세포를 포함한다)와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 시료 내에서 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 방법.

### 청구항 34

(a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드와 DNA 백신을 생물학적 시료(여기서, 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵 세포, 단세포, B 세포, 모수석 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택한 세포를 포함한다)와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 시료 내에서 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 방법.

### 청구항 35

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드를 생물학적 시료(여기서, 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵 세포, 단세포, B세포, 모수석 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택한 세포를 포함한다)와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 시료 내에서 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 방법.

### 청구항 36

(a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린젠트 조건하에서 서열 1의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드를 생물학적 시료(여기서, 생물학적 시료는 말초 혈액 단핵 세포, 단세포, B세포, 모수석 세포 및 이의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택한 세포를 포함한다)와 접촉시키는 단계를 포함하여, 생물학적 시료 내에서 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 방법.

**청구항 37**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한,

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 CTL 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와 종양 항원을 포함하는 조성물.

**청구항 38**

제37항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

**청구항 39**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한,

(a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 CTL 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와 종양 항원을 포함하는 조성물.

**청구항 40**

제39항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

**청구항 41**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 종양 항원과, 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 포함하는 조성물.

**청구항 42**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 종양 항원과, 서열 4의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 포함하는 조성물.

**청구항 43**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한,

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 CTL 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와, 종양 항원을 암호화하는 DNA 백신을 포함하는 조성물.

**청구항 44**

제44항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 구성물.

**청구항 45**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한,

(a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 CTL 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드와, 종양 항원을 암호화하는 DNA 백신을 포함하는 조성물.

**청구항 46**

제45항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

**청구항 47**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, 종양 항원과 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 암호화하는 DNA 백신을 포함하는 조성물.

**청구항 48**

환자의 체내에서 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, 종양 항원과 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드, 또는 보전적 치환 및/또는 변형에서만 상이한 이의 변이체를 암호화하는 DNA 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 49

환자의 종양을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한,

(a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 사람 말초 혈액 단핵 세포에서 CTL 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드.

#### 청구항 50

환자의 종양을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한,

(a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및

(b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 사람 말초 혈액 단핵 세포에서 CTL 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드.

#### 청구항 51

제39항 내지 제50항 중의 어느 한 항에 있어서, LmeIF4A 또는 LbeIF4A 폴리펩티드가 생분성 중심체에 캡슐화되어 있거나 이에 연결되어 있는 조성물.

#### 청구항 52

제49항 또는 제50항에 있어서, 사이토킨 및 화학치료제로 이루어진 그룹으로 부터 선택한 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 53

환자 체내의 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 항원을 포함하는 조성물.

#### 청구항 54

환자 체내의 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한 핵산 분자로 전염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 항원을 포함하는 조성물.

#### 청구항 55

환자 체내의 DNA 백신에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 DNA 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 56

환자 체내의 DNA 백신에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 DNA 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 57

환자 체내의 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 DNA 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 58

환자 체내의 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 핵산 분자를 포함하는 조성물.

#### 청구항 59

환자 체내의 종양에 대한 면역 반응을 촉진시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 종양 광원을 포함하는 조성물.

#### 청구항 60

환자 체내의 종양에 대한 면역 반응을 촉진시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 핵산 분자로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와 종

양 광원을 포함하는 조성물.

#### 청구항 61

환자 체내의 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터와, 종양 광원을 암호화하는 DNA 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 62

환자 체내의 종양에 대한 면역 반응을 증강시키거나 유도하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 핵산 분자로 전염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 핵산 분자와, 종양 광원을 암호화하는 DNA 백신을 포함하는 조성물.

#### 청구항 63

환자의 종양을 치료하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 바이러스 벡터로 감염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 바이러스 벡터를 포함하는 조성물.

#### 청구항 64

환자의 종양을 치료하기 위한 약제 제조에 사용하기 위한, 핵산 분자로 전염된 환자 세포 내에서 LbeIF4A 또는 LmeIF4A 폴리펩티드의 발현을 지시하는 핵산 분자를 포함하는 조성물.

#### 청구항 65

제53항 내지 제64항 중의 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 (a) 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드 및 (b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 1의 115 내지 1323번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LbeIF4A 폴리펩티드인 조성물.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

#### 청구항 67

제65항에 있어서, LbeIF4A 폴리펩티드가 서열 2의 1 내지 403번 아미노산 또는 이의 일부를 포함하는 조성물.

#### 청구항 68

제53항 내지 제64항 중의 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 (a) 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드 및 (b) 중간 정도의 스트린전트 조건하에서 서열 3의 117 내지 1325번 뉴클레오티드와 상보적인 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 DNA서열(여기서, DNA 서열은 레이시마니아 감염 개체로부터 얻은 말초 혈액 단핵 세포에서 Th1 면역 반응을 자극하는 폴리펩티드를 암호화한다)로 이루어진 그룹으로부터 선택한 DNA 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 LmeIF4A 폴리펩티드인 조성물.

#### 청구항 69

제68항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 49 내지 403번 아미노산을 포함하는 조성물.

#### 청구항 70

제68항에 있어서, LmeIF4A 폴리펩티드가 서열 4의 1 내지 403번 아미노산 또는 이의 일부를 포함하는 조성물.

#### 청구항 71

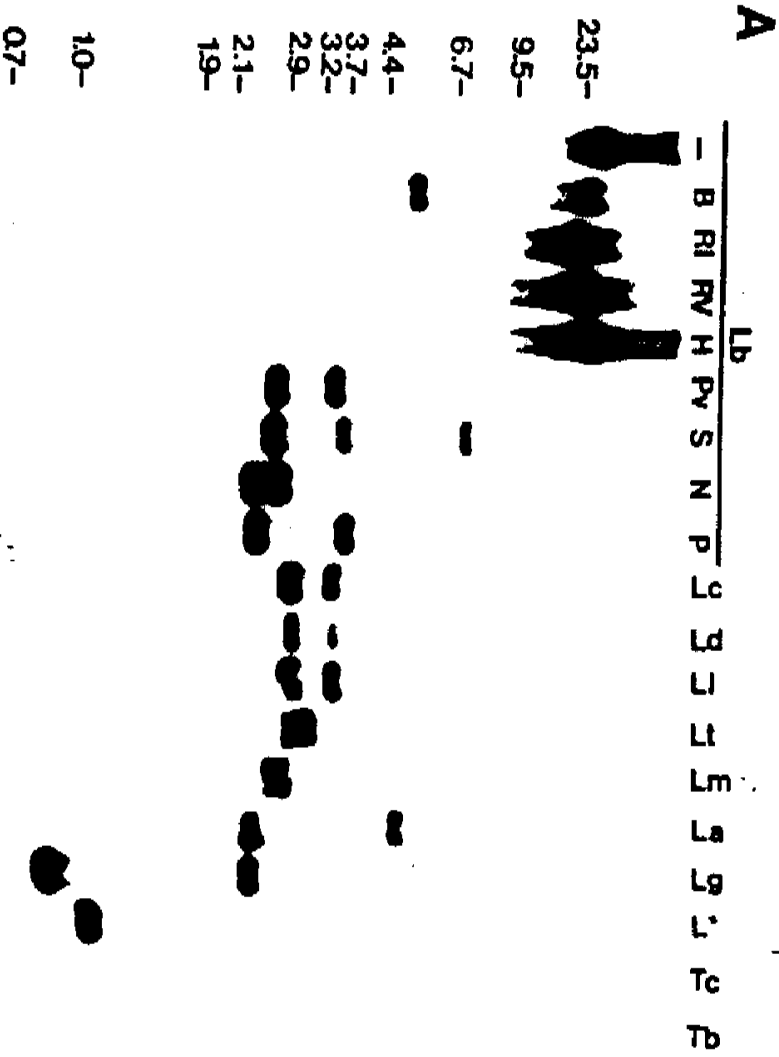
제53항 또는 제59항에 있어서, 바이러스 벡터가 항원의 발현을 지시하는 조성물.

#### 청구항 72

제54항 또는 제60항에 있어서, 핵산 분자가 항원의 발현을 지시하는 조성물.

**도면**

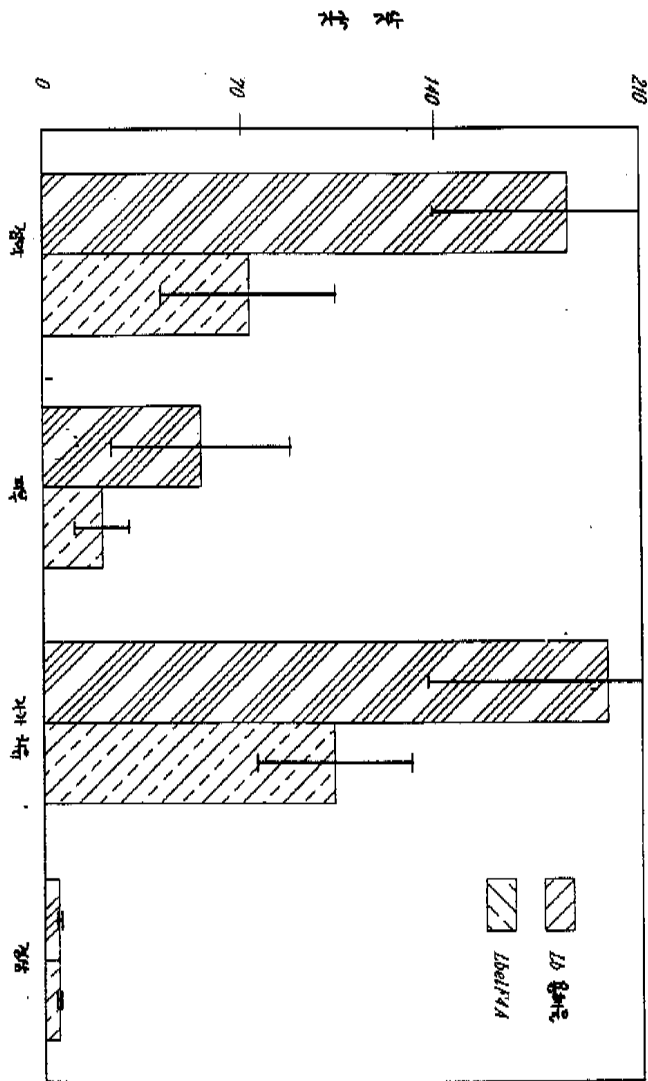
183



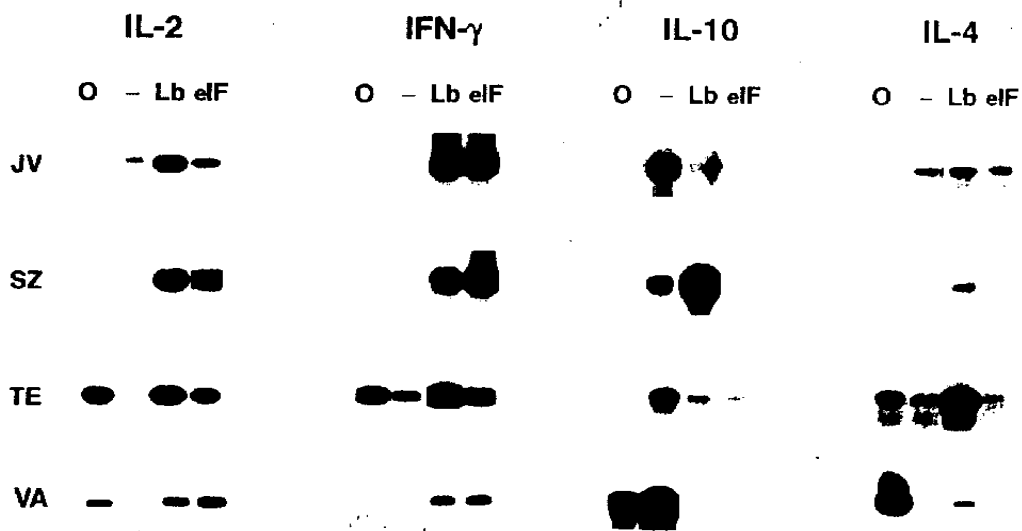


도면2

도면3

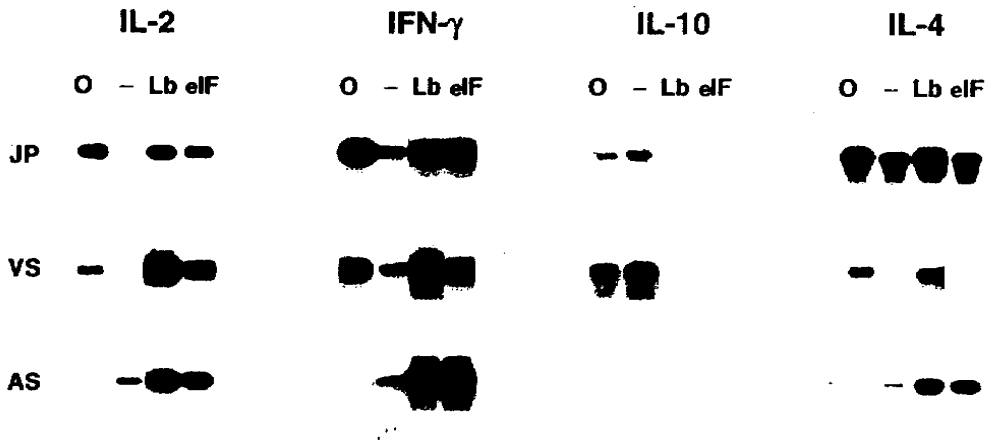


도면4a

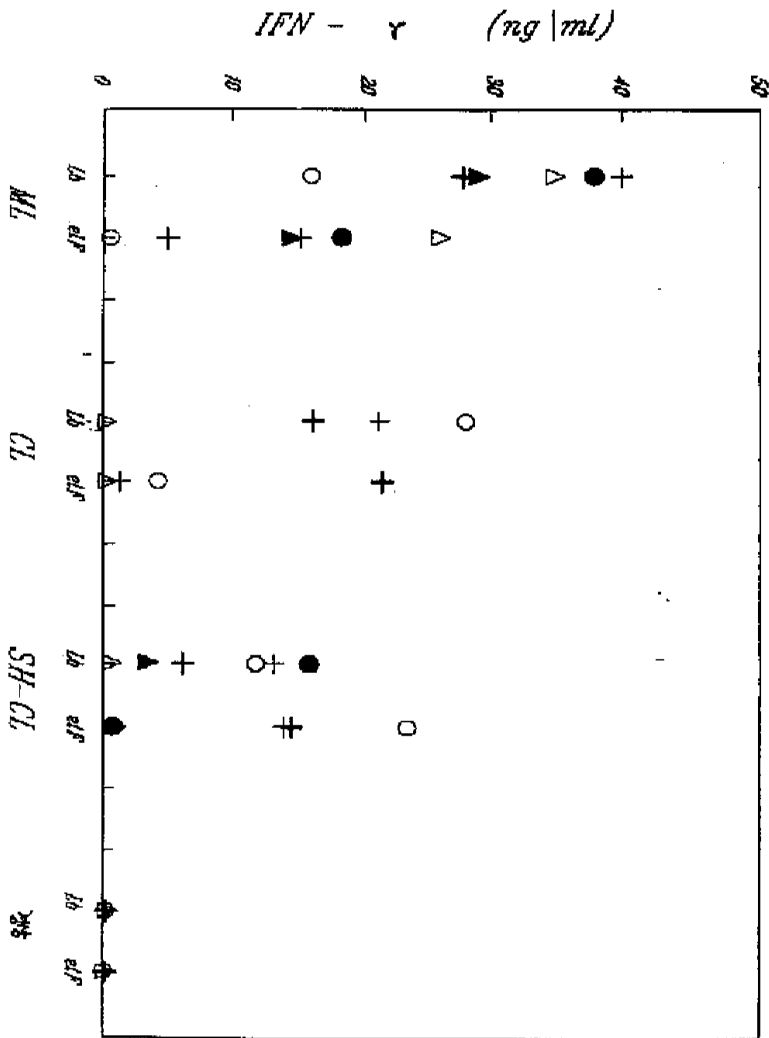




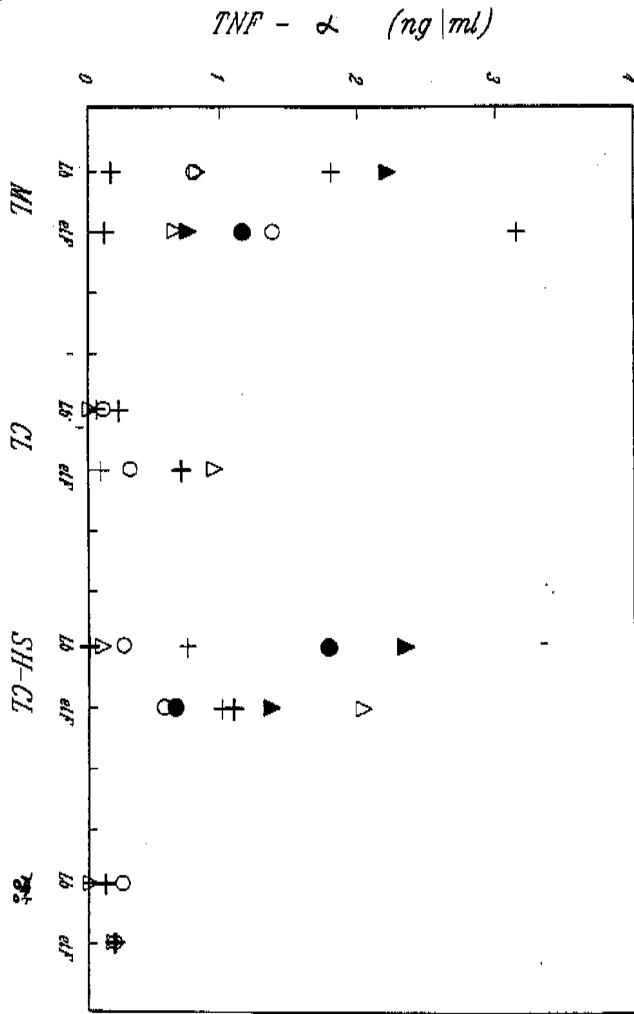
도면4b



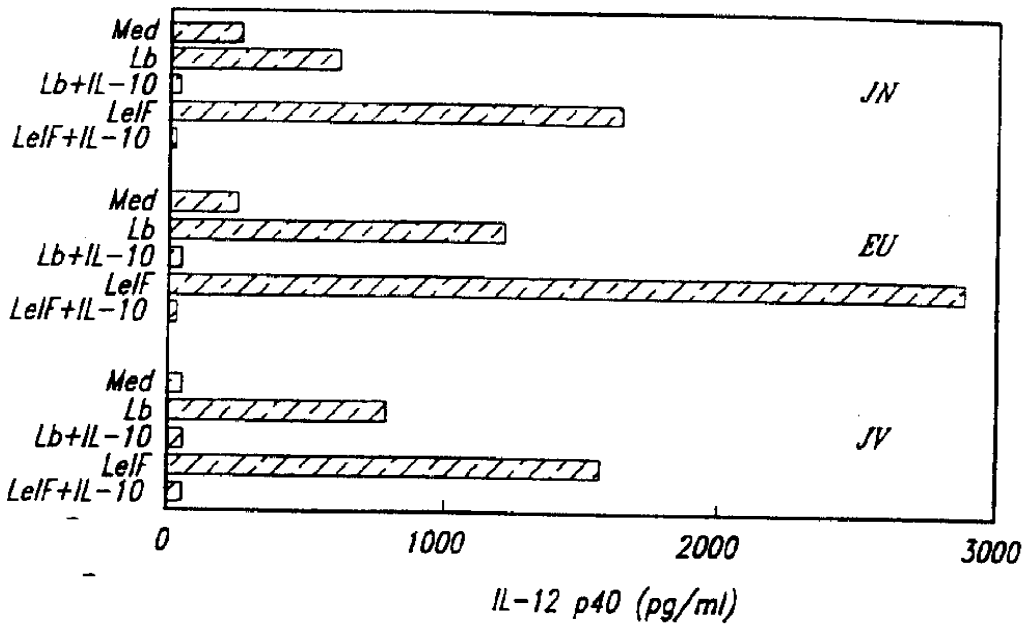
도면5



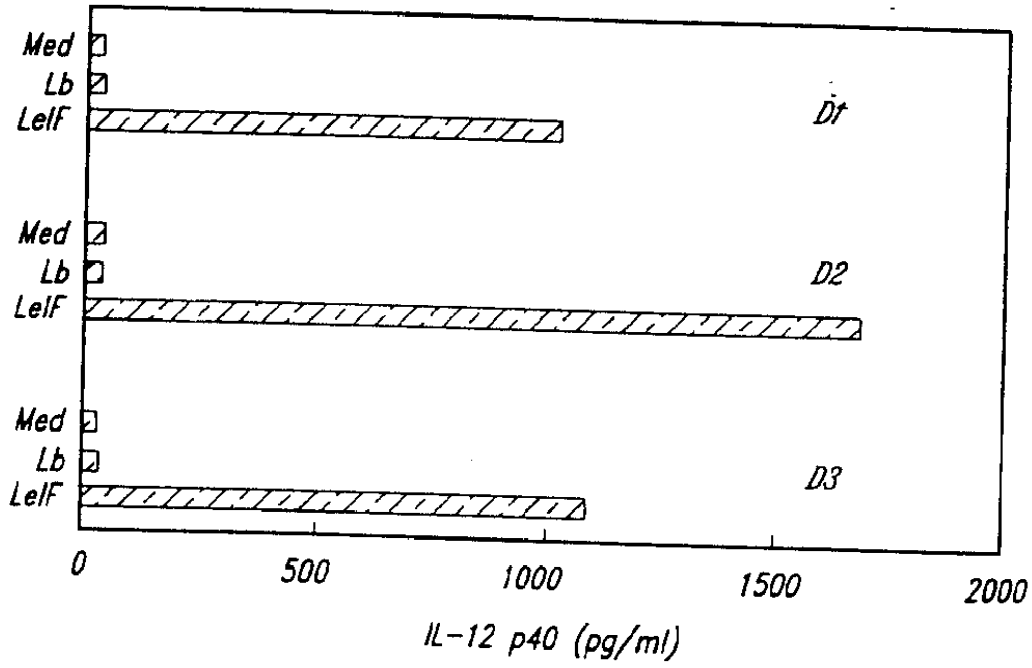
도면6



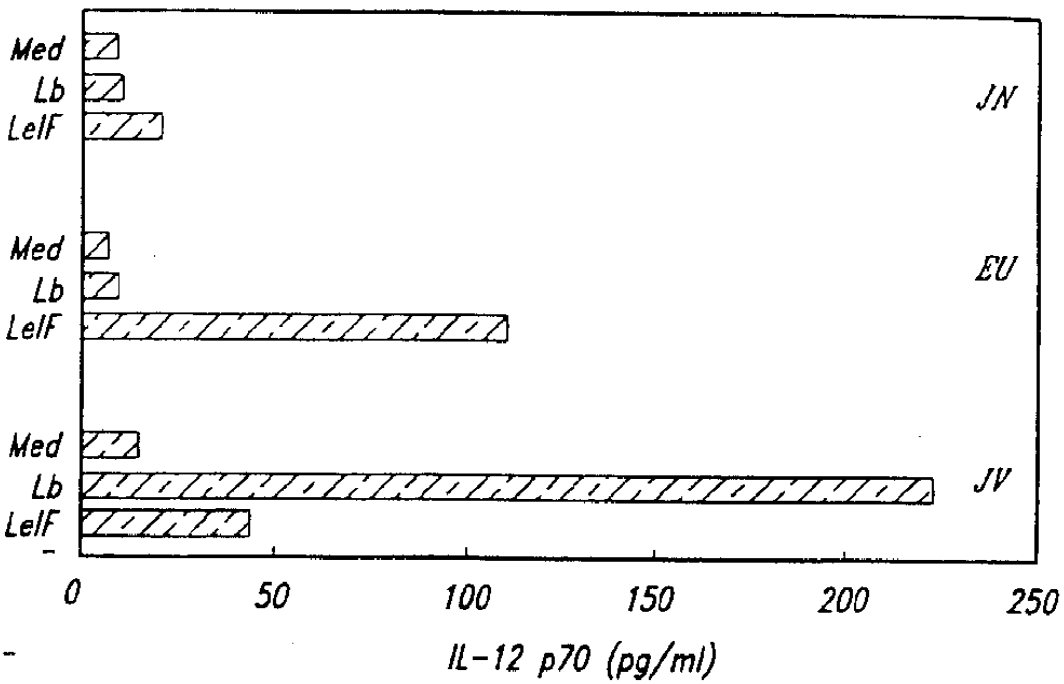
도면7a



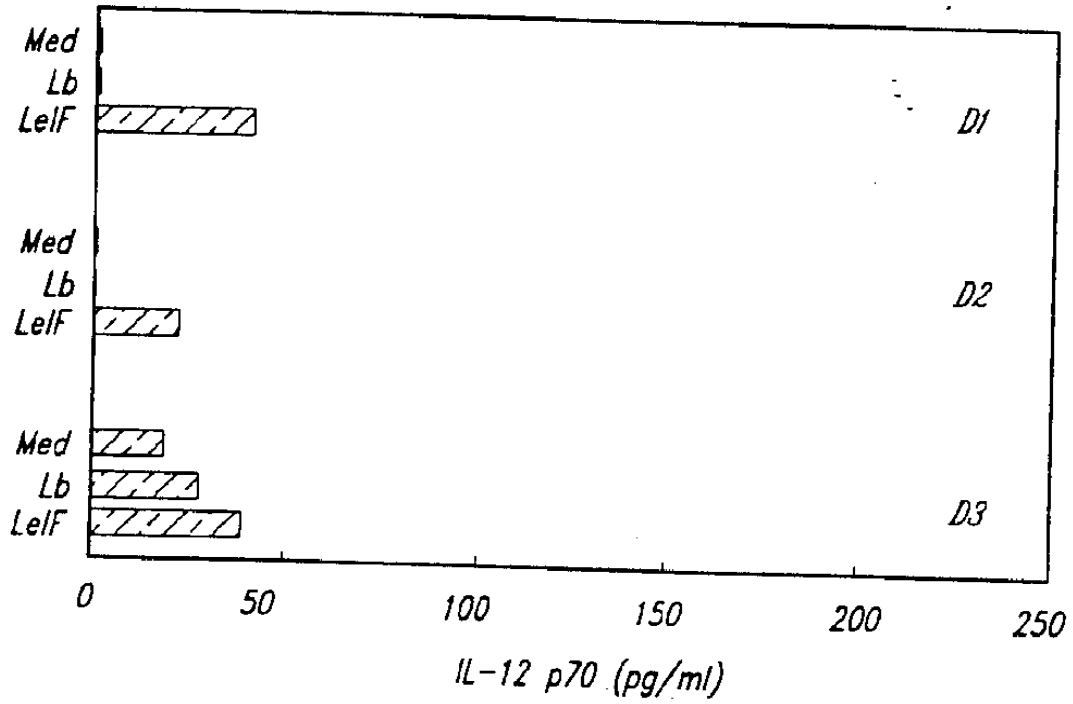
도면7b



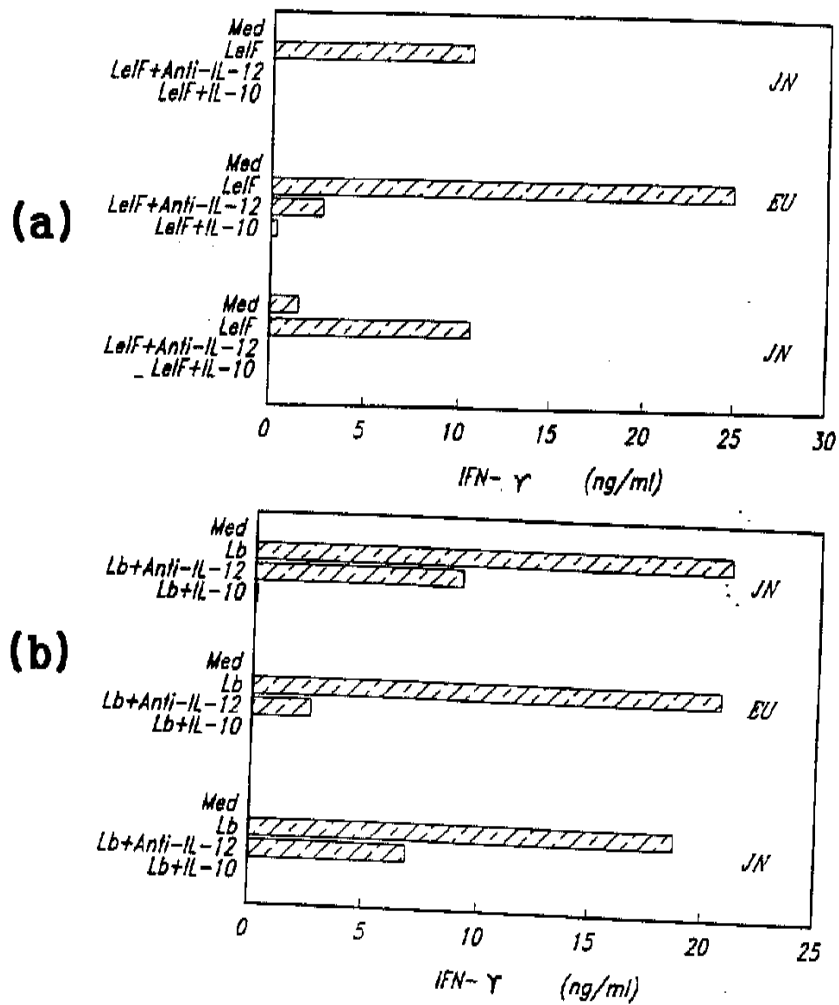
도면7c



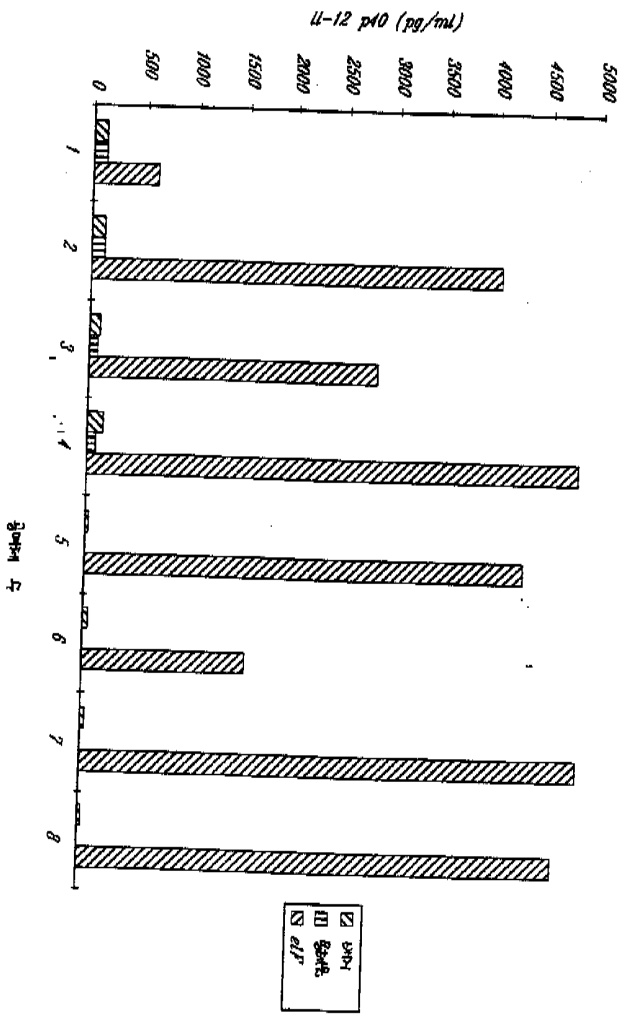
도면7d



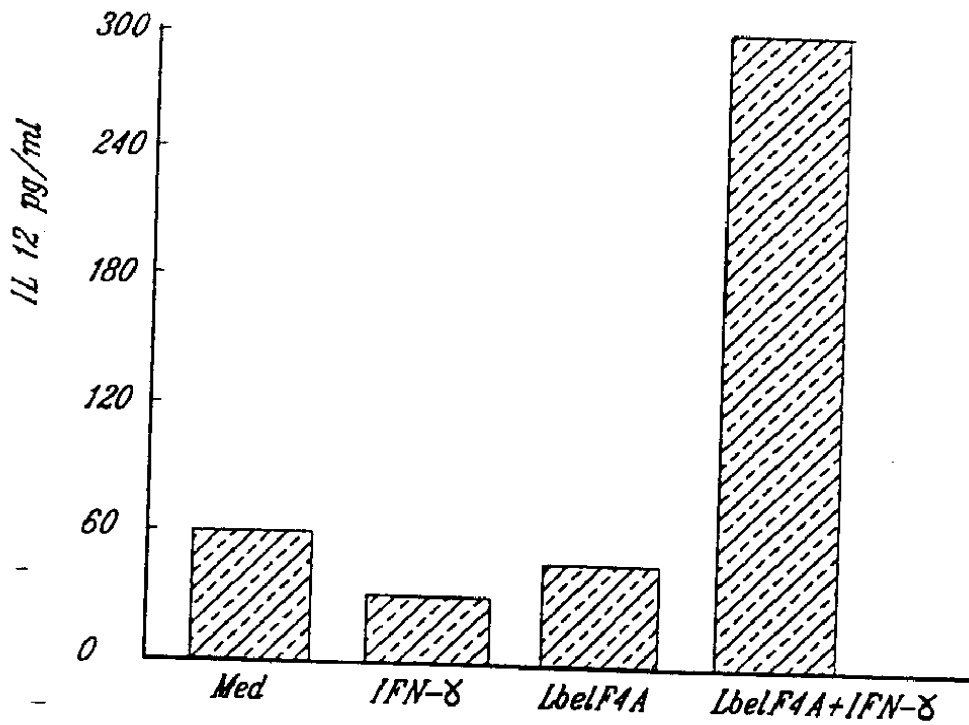
도면8



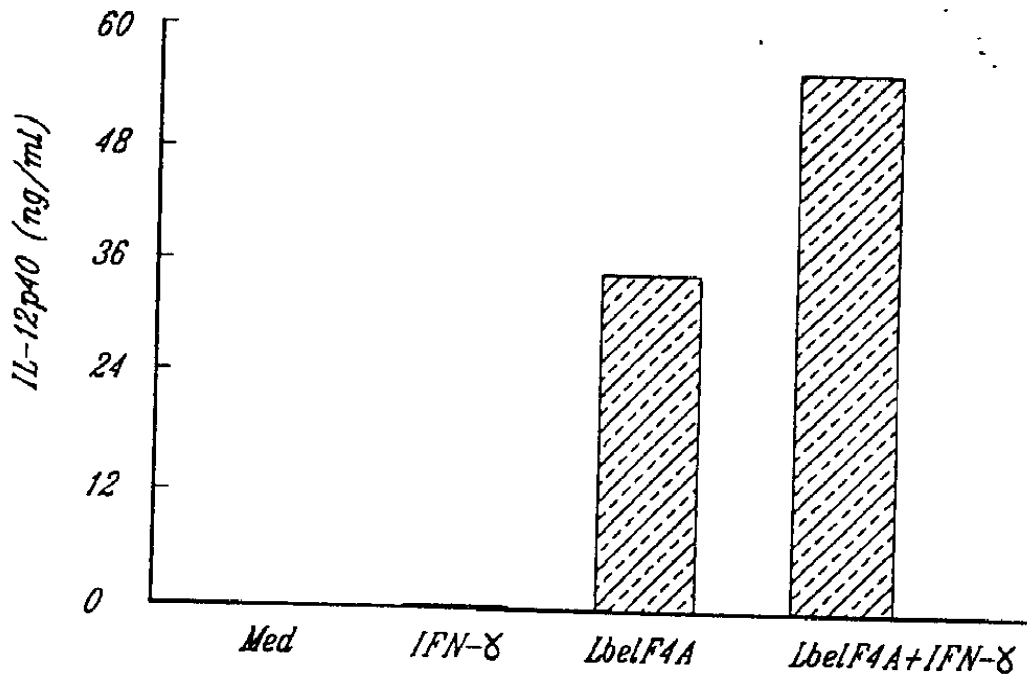
도면9a



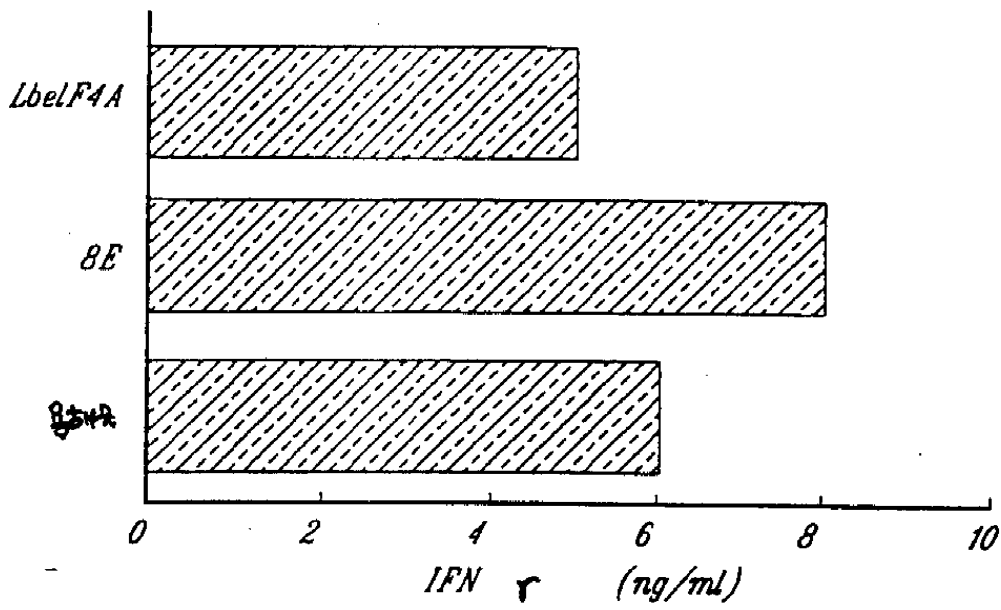
도면9b



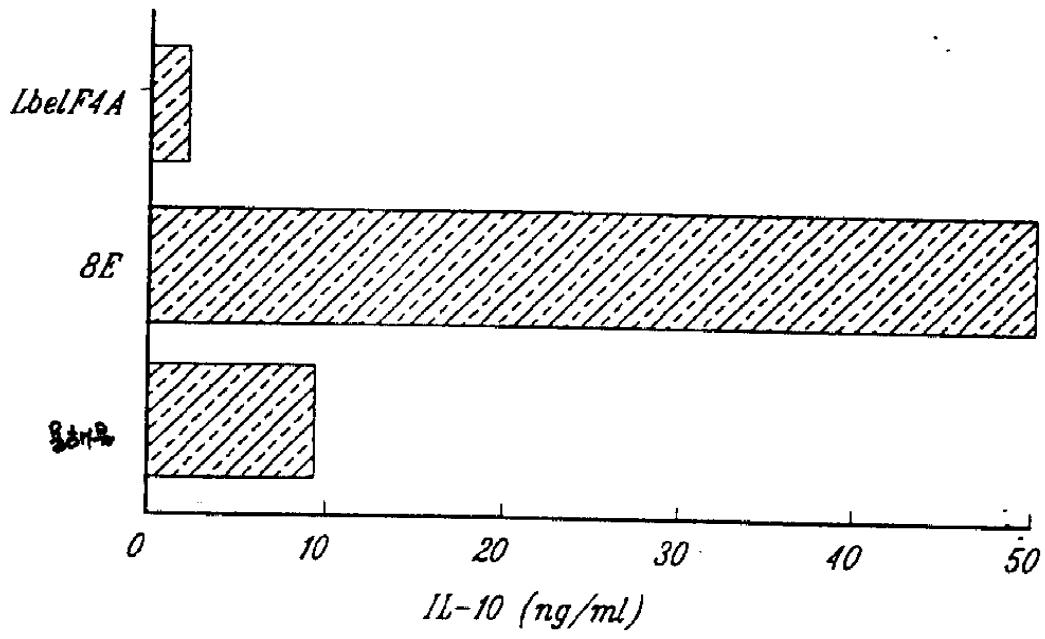
도면10



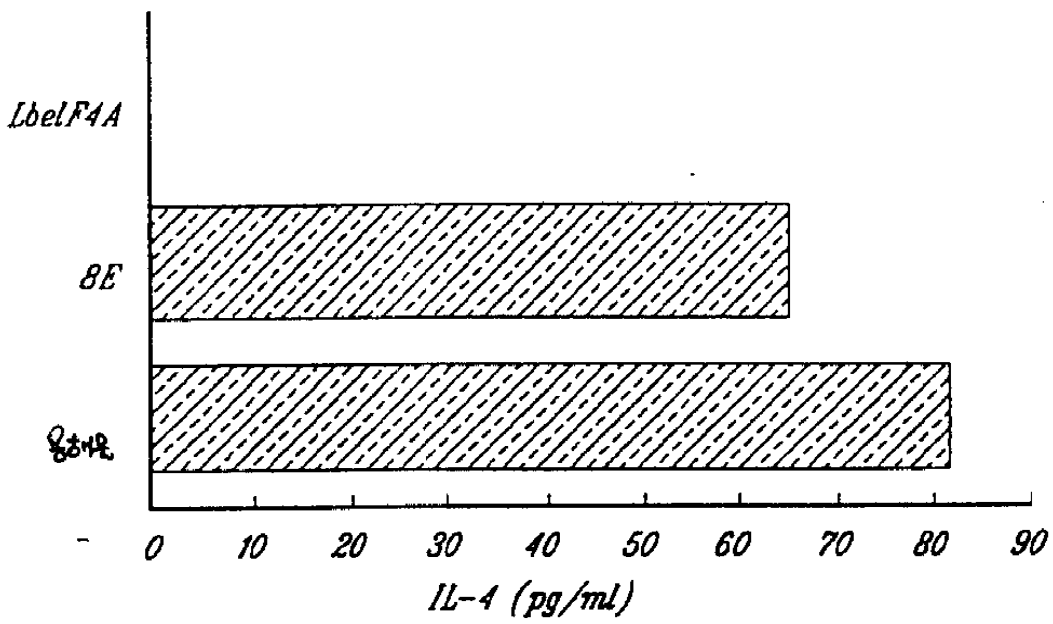
도면11a



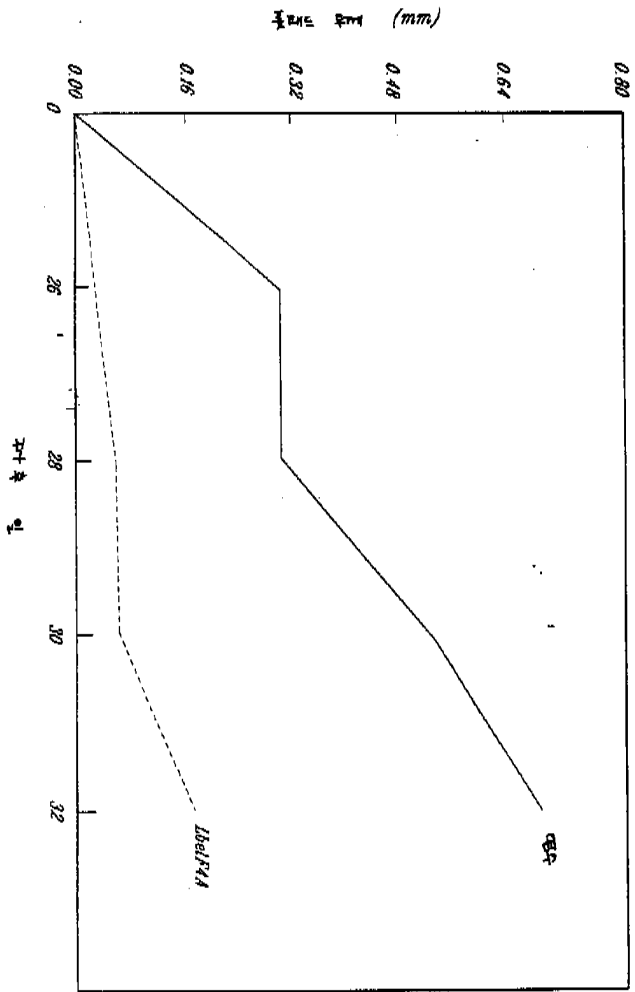
도면11b



도면11c

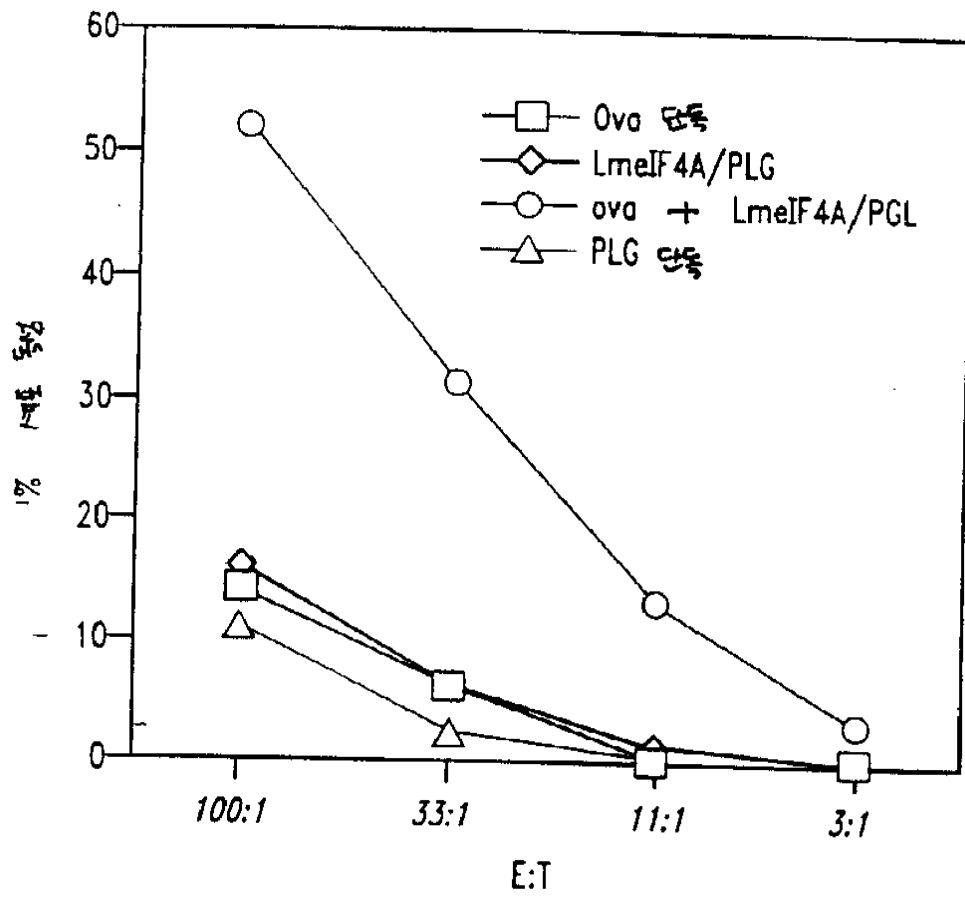


도면12

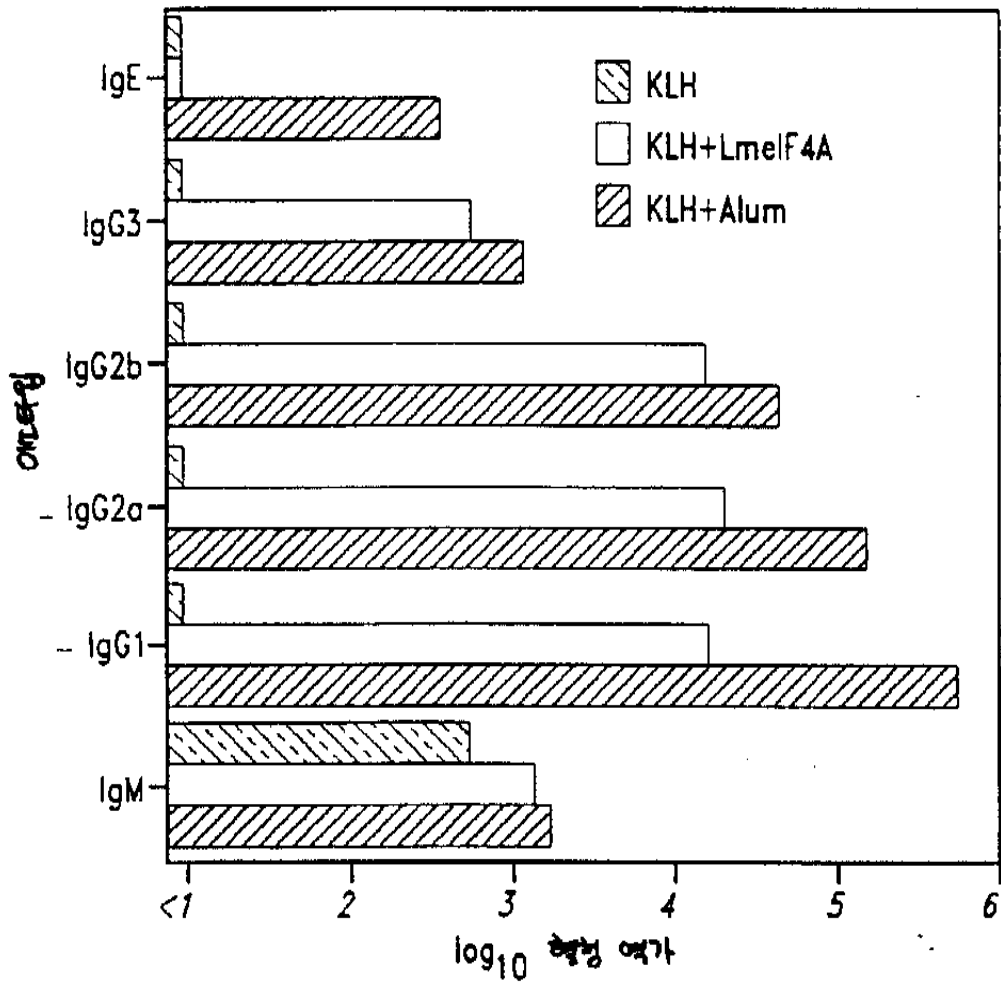




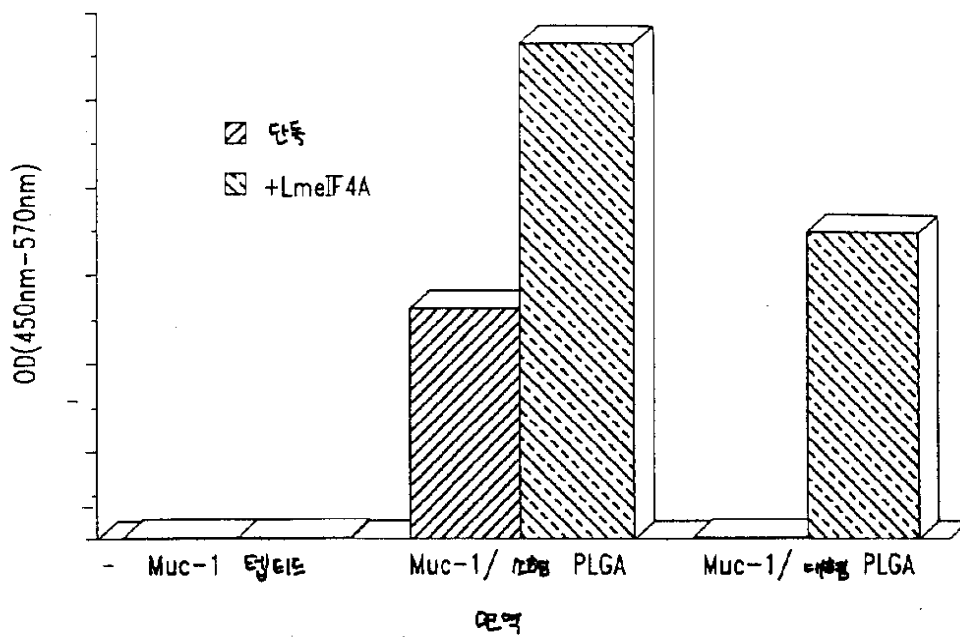
도면 13



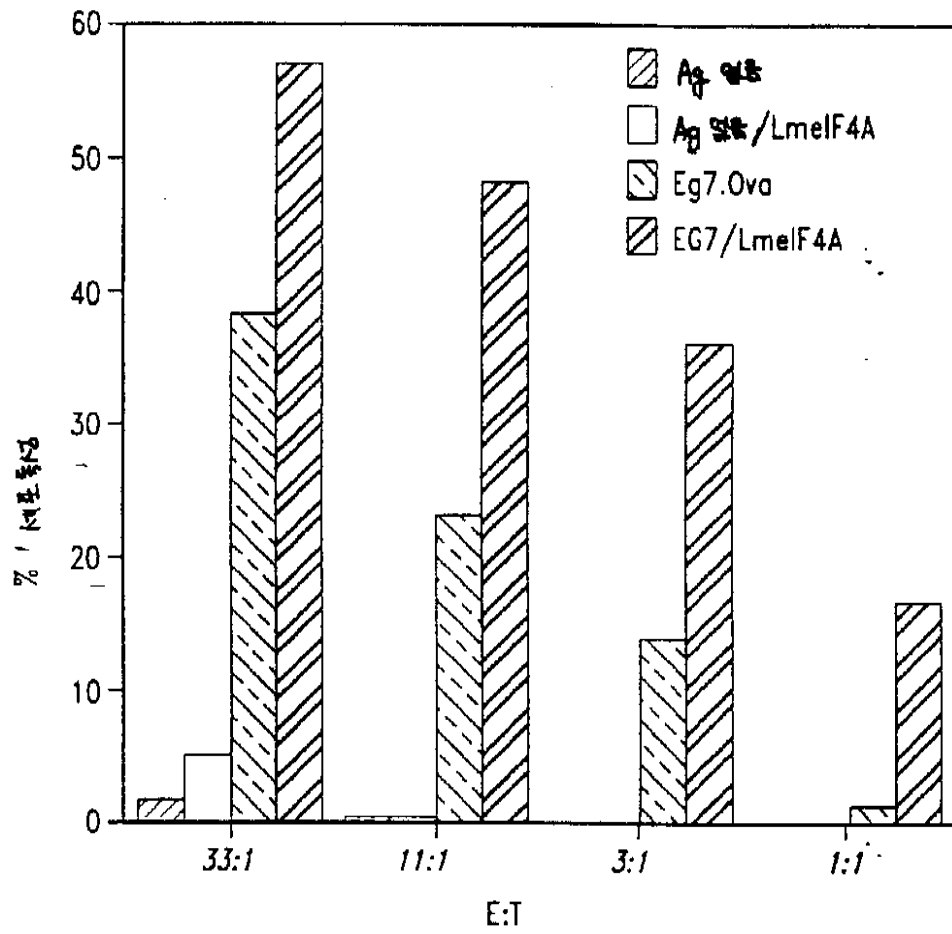
도면14



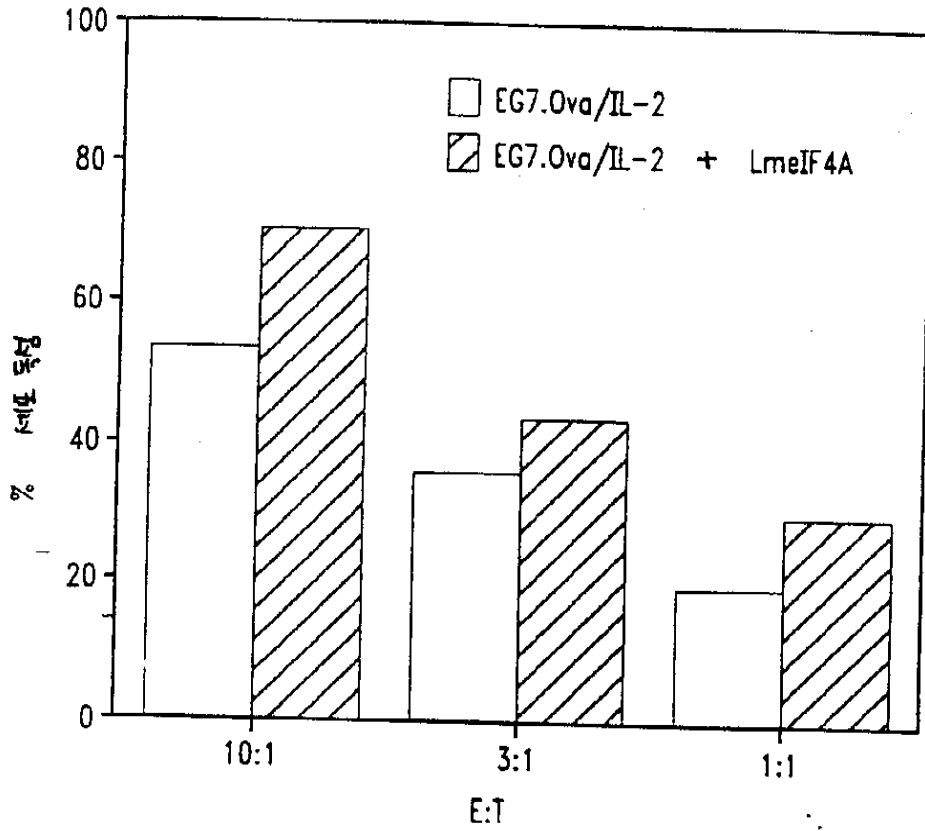
도면15



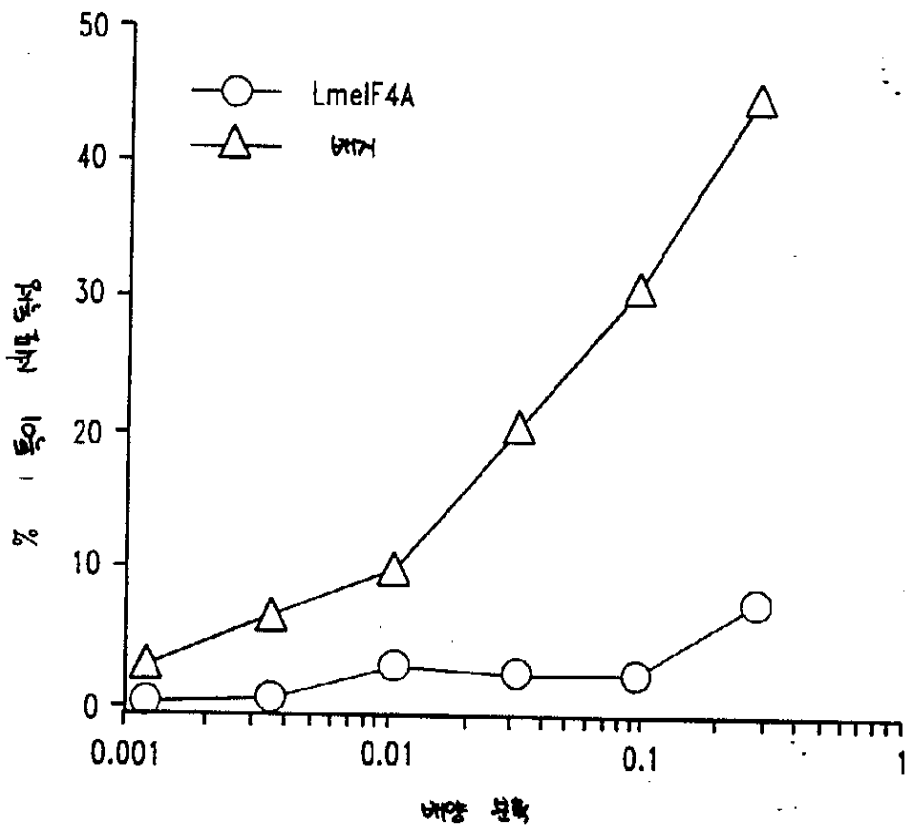
도면 16



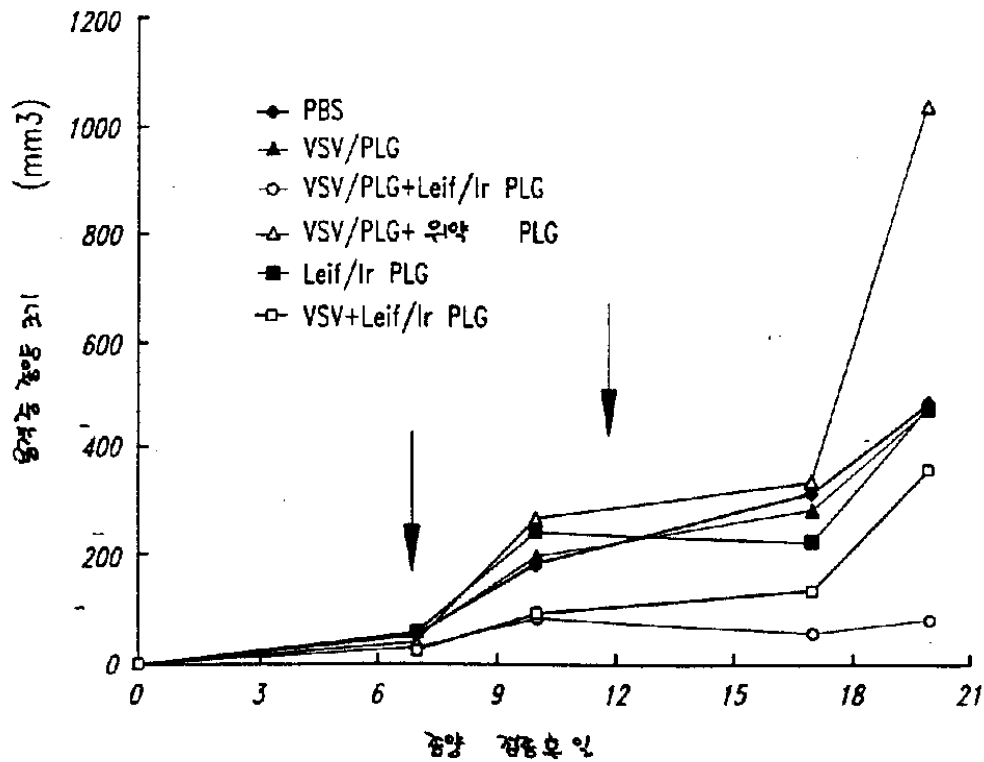
도면17



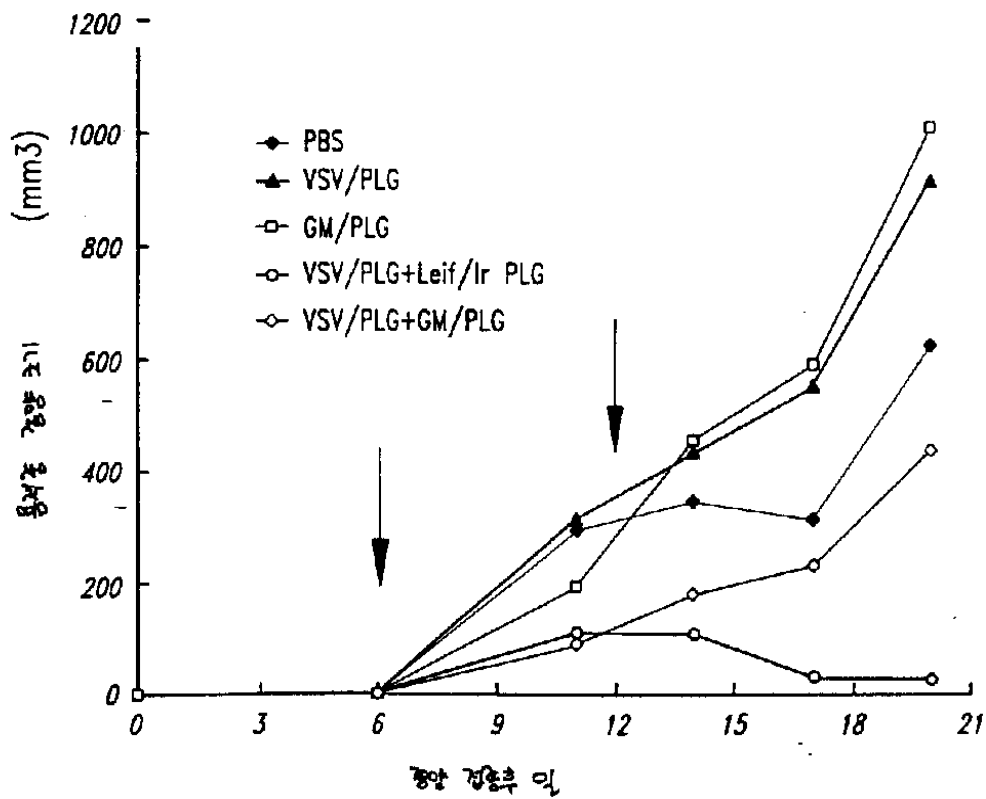
도면18



도면19



도면20



도면21

