



(12)

BREVET DE INVENTIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **148980**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **16.04.91**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **16 04.90 US 07/510161**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. US 91/02604 16.04.91

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.05.95 BOPI nr. 5/95

(87) Publicare internațională:
Nr. WO 91/16061/31.10.1991

(45) Data publicării brevetului:
BOPI nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 89496; WO 84/04326

(71) Solicitant: **President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Massachusetts, US; Institut Suisse de Recherches Experimentales sur le Cancer, Epalinges, CH**

(73) Titular: (71)

(72) Inventatori: **Kraehenbuhl Jean-Pierre, CH, Weltzin Richard A., Neutra Marian R., US**

(54) Complex Poly-Ig-proteină stabilizatoare și procedeu de obținere a acestuia

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un complex Poly-Ig-proteină stabilizatoare format din : a) un anticorp Poly-Ig specific pentru un anumit antigen sau familie de antigeni; și b) o proteină stabilizatoare, conținând cel puțin un domeniu de legare Poly-Ig a receptorului Poly-Ig, fiind lipsită de transmembrane terminale C și domenii intracelulare ale receptorului Poly-Ig; și prezintă stabilitate proteolitică. Al doilea obiect al invenției este procedeul de obținere a acestui complex, care constă în aceea că celulele epiteliale, ancorate, prelucrate pentru a produce receptor Poly-Ig sunt

cultivate astfel, încât să formeze un monostrat de celule pe un suport poros, respectivul monostrat separând un prim mediu, la partea bazală a monostratului, de un al doilea mediu, la partea apicală, apoi se introduce IgA monoclonal, pe partea bazală a monostratului și se recuperează respectivul complex, pe la partea apicală a monostratului.

Revendicări: 15
Figuri: 13

RO 109703 B1



Invenția se referă la un complex poly-Ig-proteină stabilizatoare și un procedeu de obținere a acestuia, destinată a fi folosită în domeniul general al imunoprotecției pasive a mucoasei. Utilizăm termenul poly-Ig, pentru clasele de anticorpi polimerici, adică IgA și IgM. Anticorpii IgM sunt produși, în general, în etapele inițiale ale răspunsului imun și nu reprezintă un factor important în imunitatea mucoasei protectoare. Astfel, invenția se referă la anticorpi polimerici Ig și anume cei preferați și uzuali pentru toate aspectele invenției sunt cei din clasa IgA care, în mod normal, sunt secretați în formă de dimeră și într-o mai mică măsură ca polimeri înalți IgA.

Multe virusuri și bacterii patogene intră inițial în corp prin traversarea învelișului celular (epiteliul) al tractului gastrointestinal, respirator sau genital. O clasă specializată de anticorpi și anume anticorpi IgA protejează aceste suprafețe. Anticorpii IgA sunt molecule dimere sau polimere produse de celulele localizate în țesuturile de sub suprafețele epiteliale. Ei sunt transportați de celulele epiteliale în secrețiile mucoasei unde leagă sau acoperă agenții patogeni care nu au pătruns încă în organism, prevenind ca aceștia să contacteze și să adere la celulele epiteliale. Astfel, anticorpii IgA acționează asupra agenților patogeni care sunt în afara corpului, protejând prin prevenirea intrării în organism prin suprafețele epiteliale. Răspunsul IgA care decurge în mod natural este declanșat de asigurarea cu antigen a suprafețelor mucoaselor. Antigenul intră în corp prin poziții specifice (denumite microfold sau celule M), prin care are loc trecerea transepitelială a antigenului spre suprafețele mucoaselor care conțin celule organizate și specializate ale sistemului imun al mucoaselor. După cum se vede în fig.1, antigenii A (reprezenți prin puncte pline) în lumenul 1 leagă suprafața luminală a celulelor M în poziția 2. Antigenii sunt îmbogățiți și transferați prin citoplasmă la 3 pentru a fi eliberați în pliul intra-epitelial 4, conținând celule limfoide L (celule B și T) și prelucrarea antigenului/prezentând celule ca celulele microfold M.

Anticorpii IgA, într-o gazdă imunizată natural sunt transportați în secreții prin legare

la un receptor specific (denumit receptor poly-Ig) pe suprafețele bazale (interioare) ale celulelor epiteliale și glandulare ale întregului sistem digestiv și respirator, tractul genital și glandele mamare (Solari și Krachenbuhl, *Receptor-Mediated Transepithelial Transport of Polymeric Immunoglobulins*, p.269-298 in *The Mammary Gland*, Neville și Daniel, Ed. Plenum Publishing Cambridge (1978); Mestecky (1987), *J.Clin. Immunol* 7: 265-276). Complecșii receptor IgA sunt transportați prin aceste celule și excitozați pe suprafețele celulei (exterioare) unde receptorul este scindat enzimatic, eliberând IgA în secreții, împreună cu un fragment de receptor denumit component secretor (SC) [Mostov ș.a. (1980), *Proc.Nat. Acad.Sci. USA* 77:7257-7261; Solari R. și Krachenbuhl, *J.P.Cell*, 36; 61-71 Kuhn și Krachenbuhl, *J.Biol. Chem.*, 256; 12490-12495 (1981)]. Este prezentat faptul că, componentul secretor reduce degradarea proteolitică a IgA [Lindh, *J.J.Immunol.*, 114;284 - 286 (1975); Brown ș.a., *J.Vlin. Invest.*, 49; 1374 (1974)].

În general, strategiile de imunizare existente care implică injectarea antigenilor provoacă producerea clasei de anticorpi IgG care circulă sistemic și neutralizează agenții patogeni, după intrarea acestora în corp. Eforturile de a avea protecția IgA la barierele mucoaselor implică imunizarea orală fie pentru protecția activă a mamiferelor imunizate, fie pentru protecția pasivă a altor mamifere care folosesc secreția mucoaselor mamiferelor imunizate [Glass ș.s., *New Eng.J.Med.*, 308:1389-1392 (1983); Eubara ș.s., *J.Immunol*, 111 (2) : 395-403 (1973)]. Anticorpii IgA monoclonali au fost produși și aplicați direct pe suprafețele mucoasei respiratorii, în dorința de a proteja împotriva intrării agenților patogeni [Mazanec ș.a., *J.Virol*, 61:2624-2625 (1987)].

S-au pus la punct diferite căi de a obține și stabiliți anticorpii poly Ig monoclonali care dau reactivi pentru imunoprotecția pasivă a mucoaselor. Acești reactivi sunt complecși poly-Ig specifici pentru un anumit antigen sau familie de antigeni și o proteină stabilizatoare conținând cel puțin un domeniu de legătură poly-Ig al receptorului poly-Ig. Stabilizatorul poly-Ig nu are transmembrane terminale-C sau domenii intracelulare

receptorului poly-Ig. Complexul rezultat este caracterizat prin stabilitate proteinică comparativ cu poly-Ig necomplexat și complexul are proprietăți de legătură specifică și de articulară imunoprotectoare de poly-Ig. Un prim aspect al invenției, este aceea că proteina stabilizatoare este o proteină recombinată. Într-un alt aspect al invenției anticorpul poly-Ig este un anticorp monoclonal.

După cum se va detalia în cele ce urmează, o formă preferată a complexului este caracterizată prin legături covalente (poli-sulfură) între poly-Ig și stabilizator. Asemenea complecși pot fi făcuți de o celulă capabilă să producă poly-Ig specifice pentru antigenul sau familia de antigeni selectați și care celulă a fost făcută să producă stabilizatorul poly-Ig. Complexul este produs și recuperat dintr-o cultură de astfel de celule.

De preferință, poly-Ig este o clasă de anticorpi Ig A monoclonali. Stabilizatorul preferat poate fi caracterizat prin domeniile care sunt în receptorul poly-Ig și el conține domeniul I, și cel puțin unul din domeniile IV sau V, sau ambele, domeniul VI fiind substanțial micșorat. Domeniul I este distanțat, de preferință de domeniul V, printr-o secvență de aproximativ 100....500 aminoacizi.

Un al treilea aspect al invenției prezintă poly-Ig stabilizator recombinat conținând un domeniu de legătură poly-Ig al receptorului poly-Ig și fără transmembrane terminale C sau domenii intracelulare ale receptorului poly-Ig. Stabilizatorii preferați sunt cei discutați mai sus.

Un al patrulea aspect al invenției prezintă metodele pentru aprecierea capacității de protecție a anticorpilor monoclonali poly-Ig *in vivo*, prin introducerea poly-Ig monoclonal, care urmează a fi testat în circulația unui mamifer și urmărirea în secrețiile mucoaselor mamiferelor a poly-Ig. Mamiferul este apoi confruntat cu agentul patogen (sau spermatozoid) și se determină protecția împotriva patogenului sau fecundării. De preferință, poly-Ig monoclonal este introdus în circulația mamiferului prin injectare sau infuzie. O altă variantă este când o celulă tumorală, sau care poate forma tumoră (adică hibridomă) este introdusă subcutanat ca o sursă

continuă de poly-Ig monoclonal.

Un al cincilea aspect al invenției prezintă un procedeu pentru obținerea complexului sulfhidril reticulat prin: furnizarea celulelor epiteliale capabile să producă receptorul poly-Ig, cultura acelor celule epiteliale în condiții în care se formează un monostrat de celule pe un suport poros, care este poziționat să separe un prim mediu prin partea bazală a monostratului respectiv, de un al doilea mediu prin partea apicală monostratului. IgA monoclonal este introdus pe partea bazală a monostratului și se formează complexul în celulă în timp ce anticorpul este transportat prin monostrat. Complexul este recuperat din mediu pe partea apicală a monostratului. De preferință, primul mediu este un mediu nutritiv adecvat, pentru a susține creșterea celulelor epiteliale. Al doilea mediu este fără proteine, care să interfereze cu recuperarea complexului poly-Ig. IgA monoclonali pot fi introduși prin co-cultura celulelor hibridoma, în primul mediu. Ca alternativă IgA monoclonal este produs inițial într-o cultură de hibridoma, apoi separat și, în final, introdus în primul mediu.

Complexul poate fi administrat direct pe suprafețele mucoasei mamiferului pentru a proteja de agentul patogen sau de fecundare. De preferință, complexul se administrează oral, nazal, vaginal, rectal, ocular sau în urechea medie. O metodă preferată de administrare este de a introduce complexul într-o secreție mucoasă a unui mamifer și apoi de a administra această secreție la un alt mamifer. De exemplu, laptele de la un prim mamifer conținând complexul poate fi administrat la un al doilea mamifer. Pentru a genera secreția, poli-Ig (de exemplu putificat dintr-o cultură de hibridoma) este introdus în circulația primului mamifer (de exemplu prin infuzie sau injectare) și laptele sau alte secreții mucoase sunt colectate de la acesta.

Un al șaselea aspect al invenției constă în generarea poly-Ig producător de hibridoma prin atacarea unui mamifer cu un antigen și recuperarea celulelor limfoide, din țesuturile mucoasei mamiferului, cum ar fi porțiunea Peyer sau alte țesuturi mucoase bogate în celule limfoide.

Se preferă bucățile (fâșiile) Peyer, deși sunt bune și alte țesuturi mucozice, bogate în celule, cum ar fi amigdalele, vegetațiile, apendicele și țesuturile limfoide rectale. Celula limfoidă este aplicată la o celulă myeloma. De preferință, antigenul se aplică la o suprafață a mucoasei mamiferului.

Invenția propune o imunizare pasivă, sigură și eficientă, din cauză că este nesistemică. Reactivii de imunizare a animalelor (mamifere neumane) sunt mai bine tolerați în imunoprotecția mucoaselor decât în imunizarea sistemică. Infecțiile la noii născuți, cum ar fi enterocolitele necrotice și infecțiile streptococice din grupa B, sunt frecvente întrucât mucoasele nu au la această vârstă imunitate naturală.

Invenția este deosebit de utilă pentru protecția împotriva *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* și *typhimurium*, *Cloridium perfringens* și alte *clostridiae* enterice, *Shigella flexnerii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas*, *Entameba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Streptococcus*, virusul respirator sincițial, rotavirus, reovirus, virusul imunodeficienței umane, virusul limfotrop al celulelor T umane, polivirusuri tip I și II, virusul polio, rinovirus, virusul influenței, virusurile herpesului, virusul papilloma uman, patogeni AIDS 2°, ca de exemplu *Pneumocystis* și drojdii, ca de exemplu monilia. Invenția este de asemenea utilizată pentru protecția de alergenii care contactează suprafețele mucoaselor sistemelor respirator și digestiv. Asigură protecție și față de sarcină prin reticularea spermatozoizilor în vagin și împiedicarea deplasării lor spre uter.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției în legătură și cu fig. 1...13, care reprezintă:

- fig.1, este o reprezentare schematică a trecerii prin citoplasmă a antigenului prin celule M;

- fig.2, este o reprezentare schematică a etapelor de formare a hibridomului producător de IgA polimeric;

- fig.3, este o reprezentare schematică a metodei de evaluare a caracteristicilor de

protecție a IgA polimeric, produs de hibridoma;

- fig.4, este o reprezentare schematică a structurii complexului între IgA polimeric și receptorul poly-IgA modificat;

- fig.5, reprezintă o schemă a domeniilor receptorului poly-IgA;

- fig.6A și 6B, reprezintă secvența de nucleotide a genei care codifică receptorul poly-Ig și secvența de aminoacizi dedusă;

- fig.7, este secvența de aminoacizi dedusă din DNA clonat a două alele de iepure a receptorului poly-Ig;

- fig.8 A-B-C, prezintă c DNA din care a fost obținută secvența din fig.7;

- fig.9, face comparația secvenței de aminoacizi a domeniului I a alelelor receptorului poly-Ig din fig.7;

- fig.10, prezintă diagramele componentelor diferiților vectori de expresie;

- fig.11, construcția diagramelor a doi vectori de expresie specifici p1K-neo 6,8 kb și pLM-neo 6,8 kb;

- fig.12, prezintă inserarea receptorului poly-Ig clonat în vectorii din fig.11;

- fig.13, prezintă diferite puncte de restricție la receptorul poly-Ig c DNA.

Proteina stabilizatoare și complexul poly-Ih

Proteina stabilizatoare preferată este obținută din receptorul poly-Ig, o moleculă de transmembrană mediind transportul poly-Ig. Receptorul poly-Ig include următoarele domenii, prezentate în fig. 4 și 5 : 5 domenii extracelulare, un segment de distanțare și o coadă intracelulară terminală C. Scindarea proteolitică a receptorului produce 5 domenii de proteine "SC" sau componente secretoare [Mostov ș.a., *Nature*, 308, 37-43 (1984); Kuhn ș.a., *J.Biol.Chem.*, 258, 6653-6559(1983)]. Punțile disulfidice sunt formate între receptorul poly-Ig și IgA, după cum se vede în fig.4.

Receptorul poly-Ig este, în general, conservat la speciile de mamifere și utilizează acest termen pentru toți astfel de receptori indiferent de proveniență, de exemplu șoarece, șobolan, iepure, porc, oaie, cal, vacă sau om.

Specialiștii în domeniu pot aprecia că secvențele seceptorului poly-Ig de la iepure, conform prezentei invenții, pot fi folosite în tehnicile standard de clonare prin hibridizare pentru identificarea cDNA care codifică receptorii poly-Ig la alte mamifere.

Porțiunea de proteină stabilizatoare a complexului poate fi o proteină produsă în cel puțin două moduri. Receptorul poly-Ig poate fi clonat și trecut într-o celulă care este capabilă să-l transfere și să scindeze dând proteina stabilizatoare recombinată. O altă alternativă este aceea în care gena receptor poly-Ig poate fi prelucrată în diferite moduri (în particular prin inserarea unui codon stop, cum se va descrie mai jos) pentru a obține direct o proteină stabilizatoare.

Deci, ambele moduri de obținere a proteinei stabilizatoare, încep cu gena receptorului poly-Ig clonată. [Mostoc ș.a., *Nature*, 308-37-43 (1984) prezintă clonarea și secvența acestei gene]. Fig.6 exemplifică aceasta și este explicată în detaliu în cele ce urmează.

Un alt mod specific pentru clonarea genei este următorul: [Schaerer ș.a., *J.Cell.Biol.*, 110987-998, (1990)] : RNA citoplasmatic a fost preperat din glanda mamară a iepurilor de Noua Zeelandă, conform lui Suard ș.a., *Biochim.J.*, 20193-116 (1980). Poly A + RNA îmbogățit cu activitatea de translație a receptorului, prin fracționare pe un gradient de sucroză liniar de 5....20%, a folosit drept matrice (template) pentru sinteza cDNA. Prima fâșie de cDNA a fost sintetizată, conform lui Wahli ș.a., *Dev.Biol.*, 67,371-383 (1978) și a doua conform metodei Gubler DNA-polimeraza I - RNaza H (Gene 25:263-269 (1983). Fâșia dublă de cDNA cu coadă de dC a fost fracționată pe un gel de agaroză 1% cu punct de topire scăzut și cDNA cu o mărime cuprinsă între 1,5 și 7 kb a fost eluat și atașat la pBR 322 cu coada dG, după cum a descris Poacock ș.a., *Biochem.Biophys., Acta.*, 655, 243-250 (1981). Celulele DH₁ s-au transformat cu DNA prin metoda generală a lui Hanahan ș.a., *J.Mol.Biol.*, 166, 577-580 (1983). Bacteriile transformate au fost separate și DNA-ul transferat pe filtre de nitroceluloză [Tomas, *Methods Enzymol.*, 100, 255-266 (1983)], și examinat cu două oligonucleotide

sintetice. Probele specifice folosite au fost nucleotidele 186 - 206 și 2421 - 2437 din secevnța publicată de Mostrov ș.a. (*Nature* 308, 37-43 (1984) marcate cu polinucleotidkinază T4 și P^{32} - ATP, conform lui Gough N ș.a. (*Nature* 309, 763-767 (1984). Clonele de cDNA hibridizați la ambele probe au fost caracterizați în continuare prin translație selectivă a hibridului (Riezman ș.a., *EMBO J.*, 2:2161-2168, 1983). Plasmidele rezultate sunt pSC-I care corespund formei cu masa moleculară joasă a receptorului poly-Ig cu micșorarea domeniilor 2 și 3, conform descrierii din Deitscher ș.a., *Moll. Cell. Biol.*, 6; 2712-2712 (1986), pSC-II modifică forma cu masa moleculară înaltă.

Fig. 6A și 6B prezintă secvența mRNA a receptorului poly-Ig și secvența amino-acidului dedusă din el, prezentată cu Mostov ș.a. Caracterizarea lor din fig.6A și 6B este prezentată în continuare. Reziduurile sunt numerotate de la 5' la 3', începând cu prima nucleodită de după coada poly (dG) în p. 21.53. Numerele nucleotidelor sunt indicate în partea dreaptă. Secvența completă este 3517 baze lungime și conține secvența de adiție mai puțin obișnuită a poly(A) și anume AUUAAA, începând cu 26 resturi în sus de la coada poly(A) și indicată prin triunghiuri sub fiecare rest. Secvența de aminoacizi prezisă este prezentată deasupra secvenței de nucleotide. Peptida semnal este numerotată de la -18 la -1. Primul aminoacid al receptorului poly-Ig matur (Gen) este numărul 1. Cele două poziții potențiale pentru glicozilarea cu Asn sunt subliniate deasupra. Regiunea prezisă de distanțare a membranei este indicată prin linie întreruptă. Perechile de cisteină pentru cinci domenii cât și prima cisteină pentru domeniul al 16-lea sunt indicate prin cercuri plasate deasupra primei Cys a fiecărui domeniu și prin cercuri deschise deasupra celei de-a doua Cys a fiecărui domeniu.

Având gena receptorului poly-Ig clonată ea poate fi prelucrată pentru obținerea directă a proteinei stabilizatoare dorite. Proteinele recombinante conținând anumite domenii de legare a poly-Ig a SC vor stabili Ig polimeric față de clivajul proteolitic fără a avea vreun efect asupra capacității de legare

specifice și a funcțiilor de protecție a IgA polimeric. În particular, domeniile fig. 4 și 5 sunt domenii de legătură poly-Ig primare (I) două domenii de distanțare II și III și domeniile C-terminale IV și V, care contribuie la stabilizarea poly-Ig.

Receptorul poly-Ig este micșorat la C-terminus pentru îndepărtarea transmembranei și a porțiunilor intracelulare proteinei, care nu sunt esențiale pentru stabilizare sau protecție. Receptorul poly-Ig micșorat util în prezenta invenție, include (la o valoare minimă) domeniul I de legătură a poly-Ig cu N-terminal.

Următorul comentariu referitor la doi receptori poly-Ig micșorați (reduși) este făcut pentru a ilustra invenția, dar nu o limitează.

Fig.7 prezintă secvența de aminoacizi dedusă din două alele de cDNA clonat ale receptorului poly-Ig. O alelă este notată prin "No.1" și corespunde la cDNA prezentat în Mostov ș.a., *Nature*, 308, 37-43 (1984), și este figurată în 6A și 6B. Cealaltă alelă a fost clonată în laboratorul lui Krachenbuhl, prin tehnica prezentată mai sus, și secvența respectivei alele este notată prin "No.2" în fig. 7. În fig.7 cele două puncte (":") sunt folosite pentru a arăta resturile identice; intervalul (".") este utilizat pentru a desemna resturile similare, adică: A, S, T; D,E; N,Q; R,K; I,L,M,V; F,V.

Fig. 8A-8C prezintă secvențele de cDNA a acelor clone. Cele două puncte prezintă bazele identice. "N" reprezintă o bază necunoscută.

Cele 7 domenii din secvența receptor poly-Ig sunt următoarele (numerele se referă la fig. 8):

Domenii	Segment
I	10-118
II	119-223
III	224-332
IV	333-447
V	442-552
VI	553-652
VII	653-755

Domeniul I este un domeniu de legătură poly-Ig care este menținut în receptorul poly-Ig, micșorat conform invenției.

Secvența specifică domeniului I pentru ambele alele (incluzând aminoacizii 1 - 9 care nu sunt esențiali pentru legătura poly-IG și prin

urmare nu sunt critici pentru prezenta invenție) este prezentată în fig. 9.

Secvența receptor poly-Ig poate fi modificată prin substituție de aminoacizi, reduceri și adiții care nu alterează legarea poly-Ig. Într-adevăr, după cum se vede în fig. 9, comparația celor două secvențe ale domeniului I prezintă numai trei variații ale aminoacidului la pozițiile 38, 70 și 76. În fiecare din celelalte domenii prezentate (II-V) sunt între 2 și 6 modificări ale aminoacidului. Domeniul IV are schimbări la resturile 337 și 358 și domeniul V la resturile 448, 480 și 513.

În general, există o omologie de peste 80% la nivelul aminoacidului și secvențele pot fi modificate în toate cele 5 domenii prin substituții ale aminoacidului sau prin micșorarea domeniului.

În particular, trebuie reținută o omologie suficientă în domeniul I pentru asocierea poly-Ig, trebuie menținută o distanțare adecvată (de exemplu 100....500 aminoacizi), între domeniile I și V și domeniul V trebuie să fie în așa fel încât să mențină stabilizarea prin legături disulfidice covalente. Astfel, pot fi tolerate modificări foarte semnificative în domeniile II-IV.

Este de dorit ca receptorul poly-Ig redus (micșorat) să includă și domeniul V, prin intermediul unei legături sulfhidril, care este răspunzător de stabilizarea complexului prin legături covalente, [Eiffort ș.a., *Hoppo Seyler's, Z.Phys.Chem.*, 365, 1489-1493 (1984)] identificând resturile de cisteină ale poly-Ig (uman) implicat în formarea punților de disulfură. Este important să fie inclus un distanțier corespunzător domeniilor II-V, pentru a poziționa domeniul V favorabil formării punții disulfidice, după cum se vede în fig.5, și a mări în acest fel protecția la proteoliză.

Pentru a determina poziția adecvată pentru micșorarea segmentului de deschidere a membranei în domeniul VI a receptorului complet, acesta poate fi identificat cu o formă extinsă a restului predominant hidrofob neîncărcat (exemplu Lys 629) și urmat de o secvență extrem de bazică (exemplu : Arg-Ala-Arg-His-Arg în fig.6). Această porțiune de deschidere a membranei cât și coada citoplasmatică cu C-terminal sunt reduse prin

trunchiere.

Trunchierea a fost realizată prin sinteza unei oligonucleotide cu 16-mer: ACTAGTOTAGACTAG, având codon stop TAG în toate cele trei structuri. Oligonucleotida este un palindrom și se autohibridizează. Duplexul rezultat a fost inserat în poly-Ig cDNA descris anterior, (poziția DNA 1834, aminoacid 554). Cei patru aminoacizi/T-S-L-D/codificați de oligomer sunt adăugați la C-terminus al domeniului V, astfel că trunchierea are loc precis la trecerea dintre domeniile V și VI. Poziția endonucleazei selectată pentru inserție oligomerului este poziția Sal I, ea fiind unică și apropiată de poziția probabilă a clivajului natural (aminoacizii 563, 597 și 605). Alte poziții convenabile de inserție în domeniul V sunt la Asp (1827); KpnI (1831); AccI (1835). În domeniul VI nu există poziții unice convenabile, vezi fig. 13.

Receptorul poly-Ig clonat cDNA, descris mai sus, sau receptorul poly-Ig cDNA prelucrat (de exemplu trunchiat) poate fi exprimat într-o mare varietate de sisteme de exprimare cunoscute specialiștilor în domeniu. De exemplu, sisteme de expresie adecvate sunt celulele secretoare (adică celulele care în mod natural secretă o cantitate mare de proteine), cum ar fi celulele fibroblaste, inclusiv sistemele de expresie ovariene a hamsterului chinezesc. Pot fi folosite ca sisteme de expresie celula tumorală endocrină, cum ar fi celulele AT₁ 20 (ATCC = CRL 89 și CRL 1795) sau celulele PC-12. Celule gazdă adecvate sunt și celulele de rinichi canin Madin-Darby (MDCK) 35 (Mostov ș.a./1989). Alegerea sistemului de expresie depinde de celula gazdă care a fost selectată.

Receptorul poly-Ig trunchiat poate fi exprimat în celule producătoare de IgA în stare de perpetuare, ca de exemplu fuziunea lymfocit-mielona. În acest caz, vehiculul de expresie preferat este un promotor inițiator, element stimulator (de exemplu, stimulator specific sau stimulator de origine virală) un codon stop prelucrat introdus în poly-Ig R-cDNA, pentru a evita nevoia separării proteolitice a domeniilor I-V(SC) de ancora membranei celulare (domeniul VI-VII). Sisteme de transport specifice sunt descrise în

cele ce urmează:

După cum se prezintă în fig.10, vehiculul de expresie poate fi un vector exemplificat prin p1K-neo sau hygromycin sau pLM-neo sau hygromycin, având elemente sensibile glucocorticoide sau prin aceeași vectori în care elementele glucocorticoide sau fost îndepărtate și înlocuite printr-un element μ stabilizator pAKR- μ -neo și pSV40- μ -neo. Vectorul poate include următoarele elemente:

1. Un promotor adecvat pentru inițierea transcrierii cDNA. LTR din retrovirusuri sunt adecvați, inclusiv LTR separat din adenocarcinomul rinichiului (Williger ș.a., *J.Viral.*, 60:1-11 (1986)). LTR din rinichi este omolog cu LTR din tumorile mamare cu câteva diferențe în regiunea U₃. Ambii LTR au un element sensibil glucocorticoid, care permite stimularea hormonală a transcrierii. De exemplu, glucocorticoizii (dexametazonă, *Sigma Corp.*, St.Louis MO) măresc transcrierea receptorului poly-Ig trunchiat de 10...50 ori. LTR mamar sau din rinichi recuperat din vectorul de clonare (pLK sau pLM: dr. Heidi Diggelman, *Swiss Institute for cancer Research*) în care au fost construite grupe de plasmidă (vezi Williger ș.s.) prin digestia secvențelor pSt 1.S1 și BamH1, s-a inserat în neovectorul pSV₂ (accesibil prin Biolass) care a fost în prealabil digerat secvențial cu EcoR1.S1 și BamH1 (pentru îndepărtarea promotorului SV40 și înlocuirea lui cu promotor LTR) (fig.6B). Vectorul p1K-higro sau pLM-higro a fost construit prin introducerea genei rezistente de hygromicină (1B) în locul genei rezistente de neomicină. S-a depozitat plasmida pLK_{neo} PIR-11 în ATCC Rockville Maryland, sub numărul de acces ATCC 40787. Această plasmidă este plasmida pLK_{neo}, prezentată în fig.10, cu receptorul imunoglobulinic polimeric micșorat (trunchiat), având codificat DNA (fig.8), inserat în poziția Bam H1.

2. Elemente de stimulare, pentru stimularea transcripției și prin urmare producerea receptorului poly-Ig trunchiat. Asemenea elemente includ elemente virale (SV40, elemente sensibile glucocorticoide ale MMTV) sau stimulatori specifici ai țesutului mamiferelor, cum ar fi stimulatorul μ

răspunzător de expresie înaltă a Ig în celulele B. Stimulatorul μ recuperat dintr-un clon genomic de șoarece care cuprinde locus cu catenă grea μ , (Mercola M.Wang, X.F. Olsen, Y și Calame, K., 1983, *Science*, 221, 663-665) 5 poate fi inserat în diferiți promotori.

3. Un schelet de vectori incluzând markeri selectabili (de exemplu o genă rezistentă de neomicină sau hygromicină), o origine a replicării în *E.coli* cu o genă 10 rezistentă la antibiotic.

4. Receptorul poly-Ig codificat de cDNA.

5. Un oligomer sintetic conținând codoni stop în fiecare cadru, ca de exemplu: 15 ACTAGTCTAGACTAGT.

Detalii suplimentare pentru construirea acestor vectori sunt date în fig.11. cDNA pentru pSC-1 a fost introdus în vectorul de expresie pSV-2 [Southern și Berg, 20 *J.Mol.Appl.Geo.*, 1, 327-341 (1982)]. Rezultatul obținut este notat cu pSV2-SC1.

Vectorul rezultat a fost transformat în celulele myeloma și celulele s-au izolat pentru a arăta expresia eficientă a receptorului poly-Ig. 25 S-au folosit tehnici de electroporare standard pentru efectuarea transfecției.

Celulele sunt preluate din mediul de creștere (2×10^6 per probă) și centrifugate (5×1000 rot/min). Celulele trebuie să iasă din 30 culturi într-o stare de confluență de 30...70% și mediul trebuie schimbat la 24 h. La temperatură joasă (baie cu gheață) celulele sunt spălate cu mediul de electroporare (RPMI 2mM glutamină și 0,5% ser de făt de vițel cu 35 Pen Strp.) Celulele sunt numărate și resuspendate în mediul de electroporare la $2 \times 10^6/0,75$ ml. Aproximativ 40...50 μ l DNA liniarizat (10 μ g liniarizat și suspendat în 45 μ l soluție tampon fosfat) au fost adăugați la o 40 parte alicotă (0,75 ml) suspensie de celule în cuva de electroporare. Cuvă este lăsată să stea în gheață, timp de 15 min și amestecul este supus unei mișcări de pulsație. Celulele sunt apoi puse pe plăci în RPM1 condiționat sau în 45 mediu Eagle, după care sunt selectate.

Celulele myeloma transfectate exprimă și conțin receptorul poly-Ig trunchiat. Celulele myeloma sunt incapabile să cliveze și conțin receptorul întreg. Receptorul poly-Ig trunchiat 50

este izolat și purificat din lichidul supernatant al culturii de myeloma prin precipitare cu sulfat de amoniu și filtrare pe gel.

Receptorul poly-Ig trunchiat poate fi produs într-o celulă hybridoma, care a fost selectată dintr-o poly-IgA.

Într-un astfel de sistem legăturile disulfidice covalente, care leagă receptorul trunchiat de poly-Ig, se formează în celulele vii și se secretă complexul poly-Ig rezultat. Acest sistem poate fi obținut fie prin transfecția celulelor myeloma care sunt folosite ca partenere de fuziune pentru a perpetua poly-Ig producător de celule B sau prin transfecția celulelor hybridoma care au fost obținute pentru producerea poly-Ig dorit. În fiecare caz se obține o legătură disulfidică covalentă.

Transfecția celulelor SP-20 sau p 3 x 63/Ag 8U, 1 myeloma (ATCC CRL-1581, CRLS287, CRL1597) s-a făcut utilizând un vector de expresie pLK în care transcripția receptorului poly-Ig cDNA este sub controlul promotorului LTR din rinichi MMTV (Williger ș.a., *J. Virology.*, 60; 1-11 (1986). O transcripție eficientă este obținută prin stimularea celulelor transfectate cu dexametazonă 10^{-6} M, timp de cel puțin 12 h.

Un alt sistem pentru obținerea proteinei stabilizatoare implică transfecția unui purtător (vehicol) de expresie, pentru expresia receptoreului poly-Ig complet, într-o linie de celule dependente de ancorajul epitelial la mamifere, care formează un monostrat pe un substrat poros. O linie de celule este linia de celule MDCK transformată cu un vector pentru expresia receptorului poly-Ig, după cum a fost descris mai înainte. Poate fi utilizat vectorul pLK-neo-SCII, conținând glucocorticoidul LTR_c. Se pot folosi și alte celule epiteliale care formează monostrat. Gena rezistentă la hygromicină este accesibilă, după cum este descris în Bloechlinger și Diggelmann, *Mol. Cell.Biol.*, 4:2929-2937 (1984).

În general, linia de celule transfectate este crescută pentru formarea unui monostrat pe un substrat poros, cum ar fi un filtru acoperit cu collagen [de exemplu filtre de 0,45 μ M, 4,7 cm^2 - Steele ș.a., *Am.J.Physiol.*251:C136-C139(1986)]. Celulele

devin asimetrice, având membrane bazale și epiteliale. Membrana și monostratul sunt aranjate să separe într-un vas un mediu bazal și un mediu apical. Deoarece celulele au tendința să se alimenteze dintr-un mediu bazal, mediul trebuie să conțină substanțe nutritive necesare pentru a asigura creșterea celulei. Nevoia de substanțe nutritive este mai mică în mediul apical.

Celulele vor utiliza receptorul poly-Ig recombinat pentru preluarea poly-Ig din mediul bazal și transportul lui la membrana apicală, unde are loc clivajul enzimatic al receptorului, dând poly-Ig stabilizată prin legare covalentă cu proteina stabilizatoare. Necesarul de poly-Ig este asigurat în mediul bazal prin cultivarea celulei hybridoma producătoare de IgA în respectivul mediu. Se poate folosi și poly-Ig din alt mediu de cultură, după separarea acestuia (prin purificare de afinitate).

Poly-Ig stabilizat poate fi separat din mediul apical tot prin purificare de afinitate sau prin alte metode standard de separare a anticorpilor. Mediul apical poate fi menținut fără contaminanți proteici pentru a simplifica purificarea.

Construirea și selectarea celulelor hybridoma producătoare de IgA

Un alt aspect al invenției este de a forma ușor anticorpii poly-Ig și selectarea acelor anticorpi poly-Ig (în special IgA) care să asigure protecție la infecțiile produse de agenți virali și bacterieni care au pătruns în organism pe calea mucoaselor. Acest aspect al invenției include și capacitatea de a forma anticorpi poly-Ig pe suprafețele spermatozoidelor și de a selecta acei anticorpi care asigură protecție împotriva sarcinii. Ea include formarea și selectarea anticorpilor poly-Ig pentru alergeni din alimente și aer.

În acest aspect al invenției, o rezervă controlată de anticorpi poly-Ig este dată unui animal gazdă, de exemplu celule hybridoma secretoare de poly-Ig, înșămânțat într-un animal gazdă, unde se dezvoltă într-o tumoră. Poly-Ig produs și eliberat de acea tumoră intră în sistemul circulator și dimerul IgA

monoclonal iese din capilare în țesutul mucos unde se leagă de receptorii epiteliali și este transportat în secreții cu adăugarea unui component secretor endogen. Tumorile peritoneale cu celule hybridoma pot provoca modificări patologice nedorite în intestin și nivele anormal de ridicate ale IgA nesecretor în lichidul peritoneal în care stau intestinalele. O poziție preferată pentru tumorile hybridoma secretoare de IgA este cea subcutanată, de exemplu partea de sus a spatelui.

Celula hybridoma producătoare de IgA este obținută prin perpetuarea unui limfocit B sensibilizat la antigen, de exemplu cules dintr-o fâșie Peyer (PP) după imunizare orală sau a mucoaselor [Welzin ș.a., *J.Cell,Biol.*, 108. 1673-1685 (1989)]. Celule myeloma utilizate pentru perpetuarea celulelor producătoare de IgA sunt accesibile. Poate fi folosit modul de fuziune standard.

Celulele hybridoma pot fi generate și testate pentru producerea IgA specifice astfel:

Se pot folosi diferite metode standard pentru a face animalele să producă celule B sensibilizate la antigen pentru construcția celulei hybridoma (Welzin ș.a.). O metodă anume implică folosirea microparticulelor de hidroxiapatită (HA) drept purtător pentru antigenul administrat oral.

Microcristalele HA adecvate pentru transportul prin epitelii (în general mai mici de 0,1 μm) sunt acoperite până la saturație cu antigen și sunt compactate pe un purtător adecvat pentru administrare pe calea mucoaselor (de exemplu o soluție de sare). Pentru imunizarea orală a unui șoarece de 25 g o cantitate mică (eNgN.30 μg) de proteină în 200 μl PBS este amestecată cu o cantitate adecvată (de exemplu 1 mg HA pentru 30 μg proteină) de HA spălat și tratat sonic. Amestecul este agitat timp de o oră, la 4°C și HA este apoi peletizat prin centrifugare timp de două minute, la 10000 rot/min. Paletul este spălat și tratat sonic, după care se resuspendă în 200 μl apă conținând 0,1M (sau mai puțin) bicarbonat de sodiu (pentru neutralizarea sucului gastric). Soluția de administrare pentru imunizare orală poate fi ajustată în sensul evitării condițiilor de sare înaltă care tind să elibereze proteina de HA.

Alte metode pentru provocarea unui mamifer să aibe un răspuns imun al mucoaselor sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și pot fi folosite.

Într-o metodă pentru producerea celulelor hybridoma secretoare de IgA, celulele mononucleare PP sunt separate dintr-un animal stimulat să aibe un răspuns. Mucoasa și submucoasa a 8 ... 10 celule PP a fost îndepărtată și incubată într-un mediu RMPI, conținând 0,1% collagenază, timp de o oră, la 37°C. Țesuturile au fost mărunțite între capetele a două lamele sterile de microscop, răcite la capete și celulele eliberate au fost spălate de două ori în RPMI. De la un șoarece au fost obținute aproximativ $2...3 \times 10^7$ leucocite mononucleare PP viabile.

Celulele myeloma și celulele mononucleare de șoarece au fost spălate de două ori cu ser fără RMPI și au fost trecute în polietilenglicol 37%, cu masa moleculară 4000 Z(E.Mark, Darmstadt RFG) la un raport de celule leucocite/myeloma de 5:1. După fluidizare celulele s-a diluat la 1×10^6 celule/ml în RPMI și au fost distribuite în tăvile de cultură a țesuturilor prevăzute cu 96 de poziții și care au fost înșămânțate fiecare cu 24 h înainte cu 2×10^4 celule exudate peritoneale de șoarece, iradiate (800 rad). Celulele Rybridoma s-au selectat în mediu de hipoxantină aminopterină și timidină folosind metode standard. Celulele hibridoma care produc anticorpi specifici IgA pentru anumiți antigeni sau celule sunt identificate folosind metode de triere standard.

Celulele hibridoma rezultate au fost crescute, de exemplu în mediu de cultură RMPT 1640, s-au resuspendat în soluții tampon fosfat și au fost numărate. Densitatea celulelor a fost ajustată până la 10^6 celule per 0,5 ml. Celulele suspendate (10^6 în 0,1...0,5 ml) sunt injectate subcutanat pe partea de sus a spatelui șoarecelui BALB-C. După injectare, la 1...3 săptămâni când nodulii au atins un diametru de 3...5 mm se iau probe de ser prin sângerarea cozii. Pentru măsurarea IgA din ser se folosește un test ELISA. IgA secretat și cu aceeași specificitate ca hybridoma implantat este măsurat din spălăturile intestinale și în lapte folosind tot un test ELISA. Alte secreții

ale mucoaselor (de exemplu din epiteliile și glandele cavității orale/nazale, a sistemelor respirator și genital) pot conține IgA specific.

Șoarecii purtători de tumori sunt utilizați în experiențe "de provocare" în care patogenul viral sau bacterian este introdus oral pe alte suprafețe ale mucoaselor sau în care sămânța sau spermatozoidul sunt introduși vaginal. Celulele hybridoma secretoare de IgA eficient sunt identificate din șoarecii care au prezentat protecție la respectiva provocare. Asemenea teste pot fi folosite pentru identificarea IgA care este cel mai adecvat pentru protecția pasivă sau la contracepția la oameni sau la alte specii. De exemplu, în identificarea celulelor hybridoma secretoare de anti-*V.cholerae*, șoarecii s-au implantat chiar în ziua nașterii pentru a conduce la selecție înainte ca aceștia să-și dezvolte automat rezistența la holeră.

Testul de mai sus poate fi adaptat pentru experiment de protecție a nou născuților în care celulele hybridoma sunt implantate în șoarecii BALB/C gestați, în timpul primei sau celei de-a doua săptămâni a perioadei de gestație de trei săptămâni. Creșterea tumorii are loc în timpul perioadei de sarcină și dimerul IgA de la tumoră este transportat eficient de celulele epiteliale ale glandei mamare și eliberat ca IgA secretat în colostru și lapte. Nou născuții ingerează SIgA de la naștere. Acolo unde se dorește să se administreze IgA o anumită perioadă pot fi folosite mai multe femele în faza de gestație.

Odată anticorpii IgA monoclonali identificați ca anticorpi protectori, utilizând încercările, *in vivo*, descrise mai sus, ei sunt testați pentru capacitatea lor de protecție, după aplicarea directă sau pasivă pe suprafețele mucoaselor. În aceste teste poly-IgG cu sau fără proteină protectoare, poate fi produsă în cultură (conform descrierii de mai sus) și aplicată pe suprafețele mucoaselor sistemelor prezentate anterior.

O caracteristică deosebit de importantă a invenției este operarea IgA în afara corpului receptor, pe suprafețele mucoaselor. Astfel, nu este necesar să fie compatibili din punct de vedere imunologic cu sistemul receptor, el trebuie numai să ajungă la suprafețele

mucoasei receptorului și să blocheze eficient intrarea patogenului.

Pentru protecția împotriva diverșilor antigeni în fiecare caz se folosește un antigen cunoscut a fi adecvat, patogenul în întregime sau antigenii prezentând specificitate externă, cum ar fi proteina învelișului viral sau proteinele suprafeței celulare a bacteriilor, proteina pilus, lipopolizaharide, componentul suprafeței membranei plasmei la protozoare, proteinele suprafeței spermatozoidului sau alergenii respiratori. Se mai pot folosi toxine, de exemplu CRM-197 și toxina difteriei inactivate.[Uchida, ș.a., *J.Biol.Chem.*, 248, 3838-3844 (1973)].

Antigenul este folosit conform procedurii de mai sus pentru a obține celule hibridoma care secretă anticorpii de protecție doriți. De exemplu, WO 88/08437 prezintă o proteină pilus tcPA adecvată formării anticorpilor poly-Ig monoclonali anti-*V. cholerae*. (US 4725669 prezintă glicoproteina care învelește HIV (HTLV-III) bună pentru formare a anticorpilor poly-Ig monoclonali anti-HIV. Următoarele brevete și cereri de brevete prezintă prepararea antigenilor pentru protecția împotriva infecțiilor antreprotectoare și, în special, cele produse de streptococii din grupa B.:(US 4367221; 4356263; 4207414 (RE 31672) și WO 87/06267).

Un anticorp IgA monoclonal împotriva lipopolizaharidei *V. cholerae* este produs de celule hibridoma ZD6, depozitate în ATCC, Rockville MD sub numărul ATCC HB 10420.

Alți antigeni adecvați sunt prezentați în *Bacterial Vaccines*, Sclavo International Conform, Siena, Italy, 17-19 Nov. 1986. Reactivi specifici pentru antigenii HIV sunt prezentați în *AIDS Research and Reference Reagent Program*, National Institut of Health, Junie, 1989. De exemplu, gp 120 este comercializat de MicroGeneSys, Inc. Antigenii suprafeței spermatozoidului, ca de exemplu LDH-C₄, sunt de asemenea, cunoscuți (Shaha ș.a. și Talwar ș.a., *Vaccine* 7:97-100 (1989); și Shaha ș.a., *Int.J.Androl.*, 11, 479 (1988).

De importanța deosebită în selectarea antigenilor pentru realizarea invenției este faptul că protecția mucoaselor implică reticularea, în scopul prevenirii intrării în

organism și acest mecanism nu implică ca anticorpol polimeric să distrugă sau "să neutralizeze" patogenul. Spre deosebire protecția sistemică, (IgG) implică legarea care pentru a fi eficientă trebuie să neutralizeze patogenul. Astfel, nu orice anticorp IgG care leagă agentul patogen asigură protecție, fapt ilustrat de existența anticorpilor monoclonali care leagă *Vibrio cholerae*, dar nu îl neutralizează în sensul prevenirii manifestării simptomelor clinice în gazda în care se află.

Imunoprotecția pasivă

Celulele hibridoma identificate prin metoda de mai sus ca fiind secretoare de anticorpi monoclonali poly-Ig protectori, sunt cultivate prin tehnici cunoscute și anticorpol este separat, de exemplu prin imunoabsorbție.

Complexul receptor Ig trunchiat este obținut fie prin transformarea celulelor hibridoma cu un vector de expresie, după cum a fost descris, fie prin expresia separată a receptorului Ig și adăugarea lui la anticorpol monoclonal prin tehnica de cultură a monostratului.

Anticorpol monoclonal stabilizat rezultat este formulat într-un "vaccin pasiv" care este administrat direct pe suprafața mucoasei.

Purtătorul specific și modul de administrare a complexului variază în funcție de agentul patogen. Administrarea orală este realizată prin soluție de sare tampon/sau în capsule pentru protecția complexului împotriva protezei pancreatice și gastrice. Administrarea nazală se face sub formă de aerosoli. Administrarea oculară se face cu o soluție salină. Administrarea vaginală sau rectală se face sub formă de geluri, spume/sau supozitoare.

Vaccinarea activă

În vaccinarea activă pot fi folosiți antigeni legați/conjugați de hidroxiapatită care provoacă donorii de celule hibridoma să fuzioneze cu celulele partenere. Antigenul conjugat este aplicat direct pe țesutul mucos fie

oral (folosind capsule sau alți purtători), fie nazal (prin aerosoli), fie rectal sau vaginal (prin supozitoare sau alte variante).

Revendicări

1. Complex poly-Ig-proteină stabilizatoare, caracterizat prin aceea că este format din:

a) un anticorp poly-Ig specific pentru un anumit antigen sau familie de antigeni;

b) o proteină stabilizatoare conținând cel puțin un domeniu de legare poly-Ig a receptorului poly-Ig, fiind lipsită de transmembrane terminale C și domenii intracelulare ale receptorului poly-Ig și prezintă stabilitate proteolitică.

2. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că proteina stabilizatoare este o proteină recombinată.

3. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că anticorpul poly-Ig și proteina stabilizatoare sunt legate covalent prin legături disulfidice.

4. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că anticorpul poly-Ig este un anticorp din clasa poli-IgA.

5. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că proteina stabilizatoare cuprinde domeniul I și cel puțin unul din domeniile IV și V ale receptorului poly-Ig, respectivul stabilizator al receptorului poly-Ig are domeniu VI substanțial trunchiat.

6. Complex, conform revendicării 5, caracterizat prin aceea că domeniul I al proteinei este separat de domeniile IV și V printr-o distanță corespunzătoare unei secvențe de 100...500 aminoacizi.

7. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că, conține un anticorp IgA monoclonal specific pentru antigen din grupa *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Salomella typhi* și *tiphinutium*, *Clostridium perfringens* și *closteidae*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Neissaria gonorrhoeae*, *Tricomonas*, *Entameba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Streptococcus*, *Virus syncytial respirator*, rotavirus, reovirus, virusul imunodeficienței

umane, virusul polio de tip I și II, Rhinovirus, virusul gripei, virusul uman limfotropic al celulelor T, *Pneumocystitis* și antigenii spermatozoizi.

8. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se formează într-o cultură de celule obținute prin tehnici de inginerie genetică și care sunt capabile să producă anticorpi poly-Ig monoclonali specifici pentru un antigen sau o familie de antigeni cât și proteina stabilizatoare.

9. Complex, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că se folosește pentru realizarea protecției unui mamifer împotriva atacului cu agenți patogeni sau a sarcinii prin administrarea respectivului complex.

10. Complex, conform revendicării 14, caracterizat prin aceea că administrarea lui se face pe suprafața unei mucoase, pe cale orală, nazală, vaginală, rectabilă, oculară sau în urechea medie, sau prin introducerea lui într-o secreție a unei mucoase a unui mamifer și administrarea respectivei secreții altui mamifer.

11. Procedeu pentru obținerea unui complex descris în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că, celulele epiteliale ancorate, prelucrate pentru a produce receptor poly-Ig sunt cultivate astfel, încât să formeze un monostrat de celule pe un suport poros, respectivul monostrat separând un prim mediu la partea bazală a monostratului de un al doilea mediu la partea apicală, apoi se introduce IgA monoclonal pe partea bazală a monostratului și se recuperează respectivul complex pe la partea apicală a monostratului.

12. Procedeu, conform revendicării 8, caracterizat prin aceea că primul mediu este un mediu nutritiv adecvat pentru creșterea celulelor epiteliale.

13. Procedeu, conform revendicării 8, caracterizat prin aceea că al doilea mediu este lipsit de proteine care să interfereze la recuperarea complexului.

14. Procedeu, conform revendicării 8, caracterizat prin aceea că anticorpul Ig monoclonal este introdus în primul mediu prin co-cultura celulelor hibridoma în acel mediu.

15. Procedeu, conform revendicării 8, caracterizat prin aceea că anticorpul IgA monoclonal este produs și separat dintr-o cultură de celule hibridoma.

109703

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

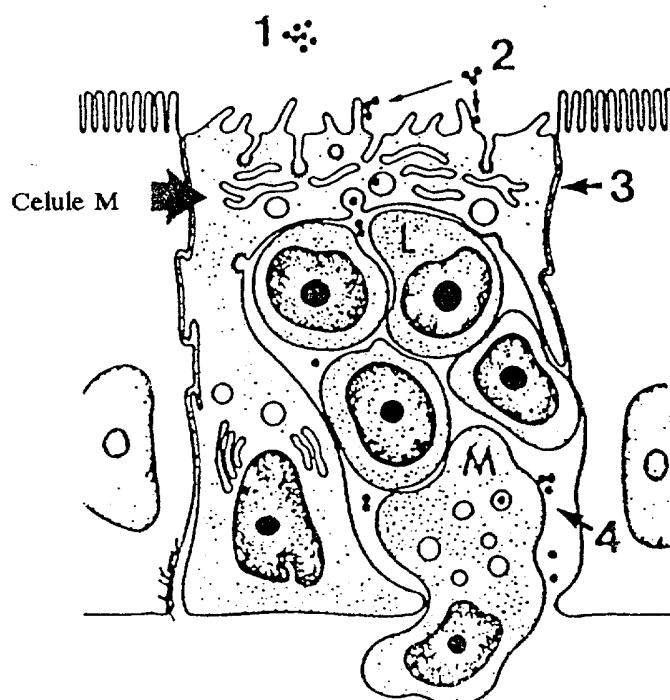


Fig.1

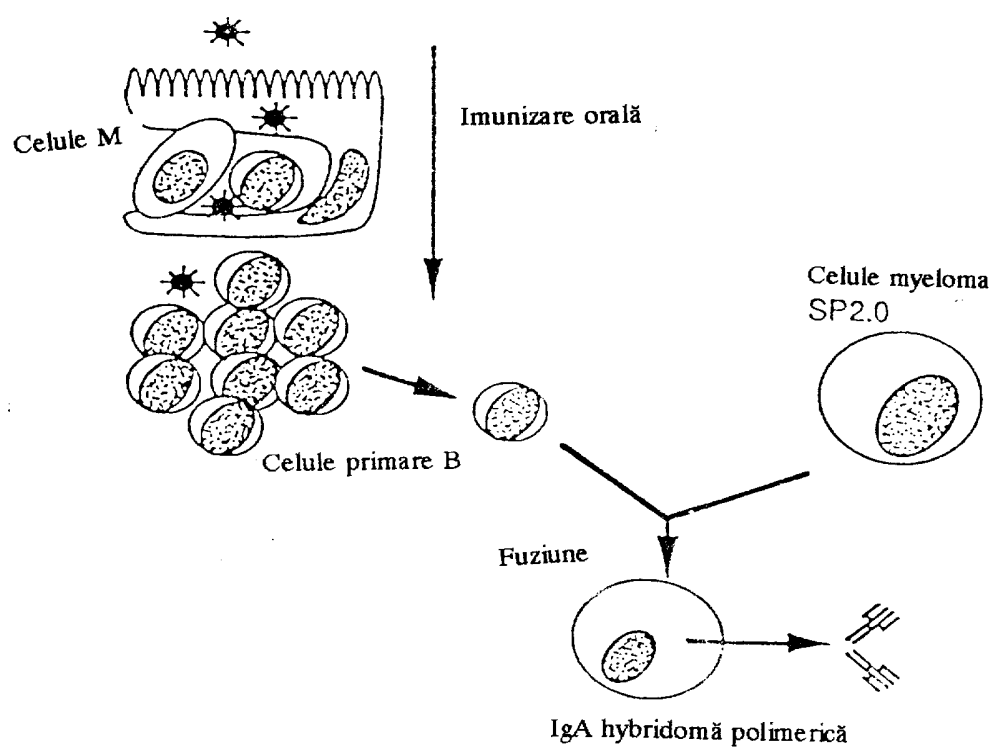


Fig. 2

109703

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

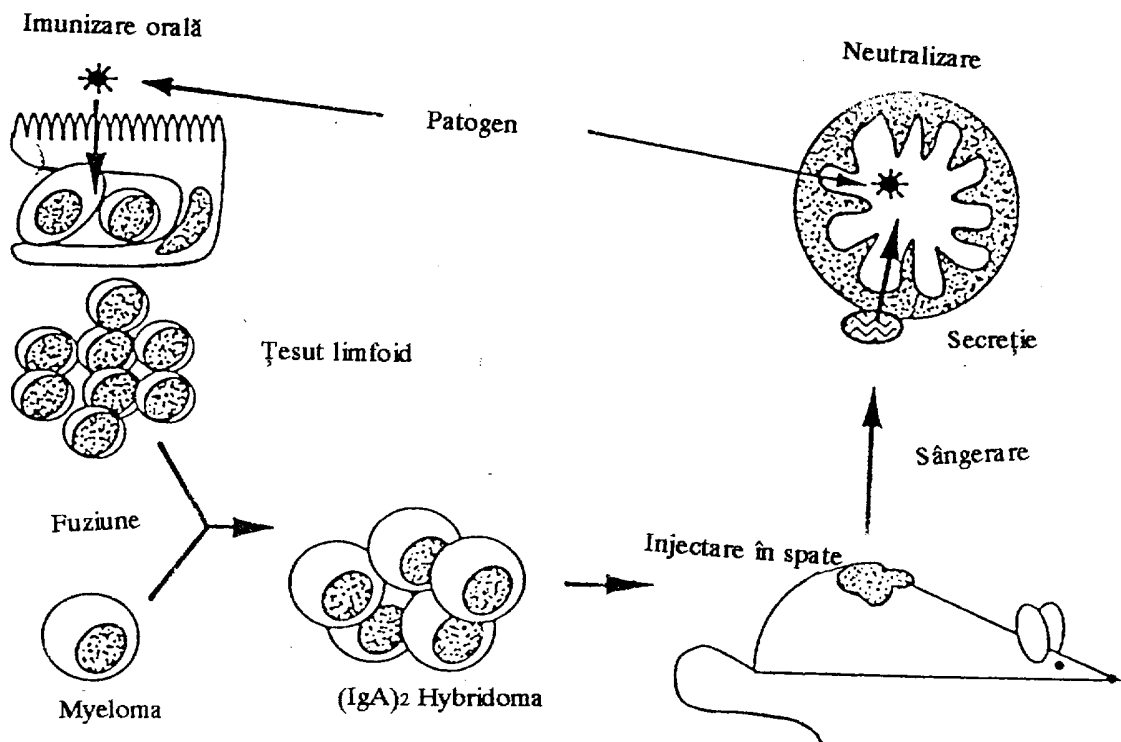


Fig. 3

109703

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

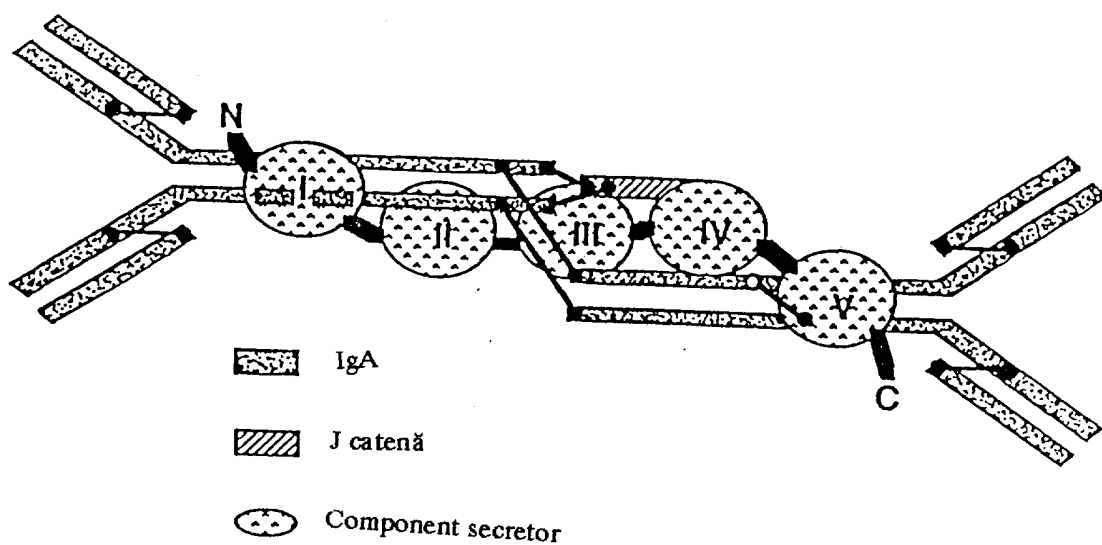


Fig.4

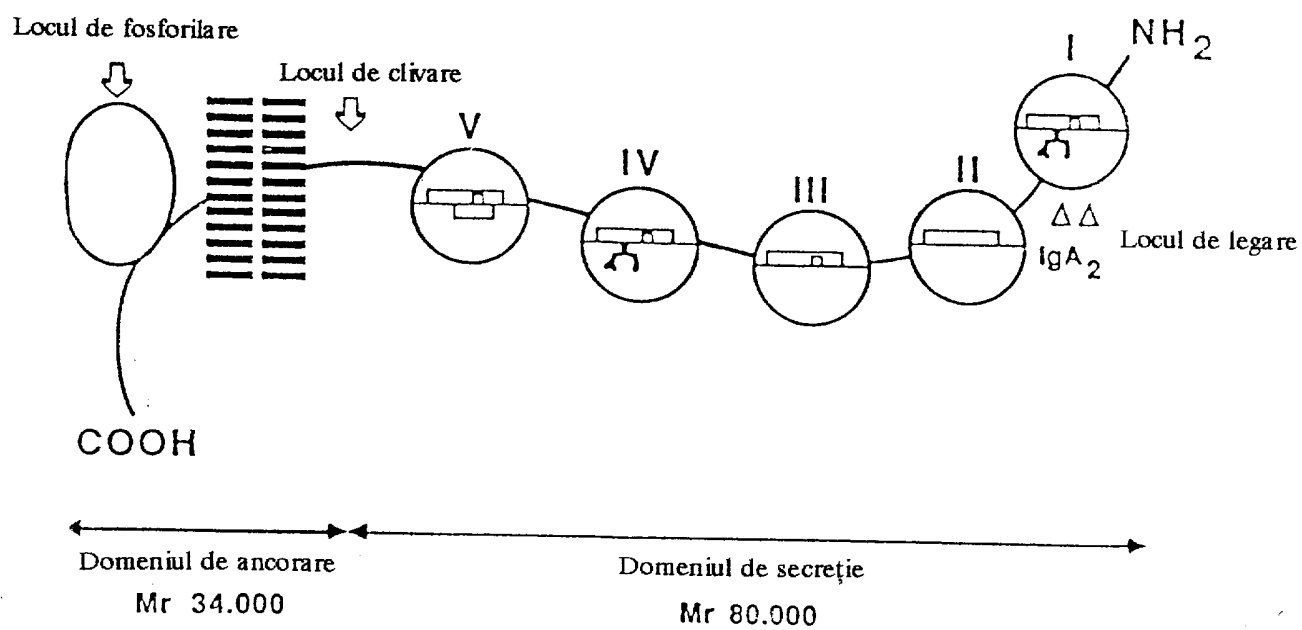


Fig.5

Fig. 6A

151 160 170
TyrLysValGluAspGlyGluLeuValLeuIleIleAspSerSerSerLysGluAlaLysAspProArgTyrLys
UACAAGGUGGAAGACGGGGAAACUUGUACUCAUCAUUGAUUCCAGCAGUAAGGAGGCAAAAGGACCCAGGUAUAAG
180 190 200
GlyArgIleThrLeuGlnIleGlnSerThrThrAlaLysGluPheThrValThrIleLysHisLeuGlnLeuAsn
GGCAGAAUAAACGUGGCAGAUCCAAAGUACCAAGCAAAAGAAUUCACAGUCACCAUCAAGCAUUUGCAGCUCAA 777
201 O 210 220
AspAlaGlyGlnTyrValCysGlnSerGlySerAspProThrAlaGluGluGlnAsnValAspLeuArgLeuLeu
GAUGCUGGGCAGUAUGUCUGCCAGAGUGGAAGCGACCCACUGCUGAAGAACAGAACGUUGACCCUCCGACUGCUA
230 240 ● 250
ThrProGlyLeuLeuTyrGlyAsnLeuGlyGlySerValThrPheGluCysAlaLeuAspSerGluAspAlaAsn 927
ACUCCUGGGUCUCUCAUGGAAACCUUGGGGGGCGUCGGUGACCUUUGAAUGUGCCUUGAAGACGAAAC
251 260 270
AlaValAlaSerLeuArgGlnValArgGlyGlyAsnValValIleAspSerGlnGlyThrIleAspProAlaPhe
GUGGUAGCAUCCUUGCGCCAGGUUAGGGGUGGCAUUGUGGUCAUUGACAGCCAGGGGACAAUAGAUCACGCCUUC
280 290 300
GluGlyArgIleLeuPheThrLysAlaGluAsnGlyHisPheSerValValIleAlaGlyLeuArgLysGluAsp 1077
GAGGGCAGGAUCCUGUUCACCAAGGCUGAGAACGGCCACUUCAGUGUAGUGAUCGCGAGCCUGAGGAAGGAGAC
301 O 310 320
ThrGlyAsnTyrLeuCysGlyValGlnSerAsnGlyGlnSerGlyAspGlyProThrGlnLeuArgGlnLeuPhe
ACAGGGAAACUUAUCUGUGCGGAGUCCAGUCCAAUUGGUCAGUCUGGGGAUUGGGCCACCCAGCUUCGGCAACUCUUC
330 340 350
ValAsnGluGluIleAspValSerArgSerProProValLeuLysGlyPheProGlyGlySerValThrIleArg 1227
GUCAAUGAAGAGAUCCGUGUCCCGCAGCCCCCCCCUGUGUUGAAGGGCUUUCACGAGGGCUCGUGACCAUACGC

Fig. 6B

351. 360 370
 CysProTyrAsnProLysArgSerAspSerHisLeuGlnLeuTyrLeuTrpGluGlySerGlnThrArgHisLeu
 U6CCCCUACAACCGAAGAGAGCGACAGCCACCUAGCUGUAUCUCUGGGAAGGGAGUCAAAACCCGCCAUCUG
 380 390 400
 LeuValAspSerGlyGlyLeuValGlnLysAspTyrThrGlyArgLeuAlaLeuPheGluGluProGlyAsn
 CUGGUGGACAGCGGCGAGGGGCGUGGUUCAGAAAGACUACACAGGCGGCGUGGCCCCUGUUCGAAGAGCCUGGGCAAU 1377
 401 410 420
 GlyThrPheSerValValLeuAsnGlnLeuThrAlaGluAspGluGlyPheTyrTrpCysValSerAspAspASP
 GGCACCUUCAGUCGUCUACAACAGCUCACUGCGGAGGAUGAAGGCUUCUACUGGUGUGUCAGCGAUGACGAU
 430 440 450
 GluSerLeuThrThrSerValLysLeuGlnIleValAspGlyGluProSerProThrIleAspLysPheThrAla
 GAGUCCUGACGACUUCGGUGAAGCUCACAGAUUGGACGGAAGAACCAAGCCCCACGAUCGACAAAGUUCACUGCU 1527
 451 460 470
 ValGlnGlyGluProValGluIleThrCysHisPheProCysLysTyrPheSerSerGluLysTyrTrpCysLys
 GUGCAGGGGAGAGCCUGUUGAGAUACCCUGCCACUUCUCCCAUGCAAUAUACUUCUCCCGAGAGAAUACUGGUGCAAG 500
 480 490 500
 TrpAsnAspHisGlyCysGluAspLeuProThrLysLeuSerSerSerGlyAspLeuValLysCysAsnAsnAsn
 UGGAAUGACCAUGGCGUGGAGGACCUCCACUAAGCUCAGCUCAGCGGCGACCUUGUGAAAUUGCAACAACAAC 1677
 501 510 520
 LeuValLeuThrLeuThrLeuAspSerValSerGluAspAspGluGlyTrpTyrTrpCysGlyAlaLysAspGly
 CUGGUCCUCACCCUGACCUUGGACUCGUGCAGCGAAGAUAGCAGGGGCGUGUACUGGUGUGGGCGCGAAAGACGGG 550
 530 540 550
 HisGluPheGluGluValAlaValArgValGluLeuThrGluProAlaLysValAlaValGluProAlaLys
 CACGAGUUUAGAGGUGGCGGCCGUCAGGGUGGAGGUCAGACAGAGCCAGCCAAAGGUAGCUUCGAGGCCAGCCAAAG 1827

Fig. 6C

```
551                               560                               570
VaiProValAspProAlaLysAlaAlaProAlaGluGluLysAlaLysAlaArgCysProValProArg
GUACCUUGCGACCCAGCCAAGGCAGCCCCCGCCGCGUGCUGAGGAGAGGCCAAGGCGCGGUGCCACAGU
GCCCCAGG

580                               590                               600
ArgArgGlnTrpTyrProLeuSerArgLysLeuArgThrSerCysProGluProArgLeuLeuAlaGluGluVal
AGAAGGCAGUGGUACCCCAUUGUCAAGGAAGCUGAGAGACAAAGUUGUCCAGAACCCUGGCUUGCGGAGGUA
1977

601                               610                               620
AlaValGlnSerAlaGluAspProAlaSerGlySerArgAlaSerValAspAlaSerSerAlaSerGlyGlnSer
GCAGUGCAGAGUGCGGAGAGACCCAGCCAGUGGGAGCAGAGCGUCUGUGGAUGCCAGCAGUGCUUCGGGACAAAGC

630                               640                               650
GlySerAlaLysValLeuIleSerThrLeuValProLeuGlyLeuValLeuAlaGlyAlaMetAlaValAla
GGGAGUGCCAAAGUACUGAUCUCCACCCUGUGGCCUUGGGGCGUGGUGCUGGCGAGCGGGGCCCAUGGGCCGUGGCC
2127

651                               660                               670
IleAlaArgAlaArgHisArgArgAsnValAspArgValSerIleGlySerTyrArgThrAspIleSerMetSer
AUAGCCAGAGCCCCCGGCACAGGAGGAACGUGGACCGAGUUUCCAUUCGGAAGCUACAGGACAGACAUAUAGCAUGUCA

680                               690                               700
AspLeuGluAsnSerArgGluPheGlyAlaIleAspAsnProSerAlaCysProAspAlaArgGluThrAlaLeu
GACUUGGAGAACUCCAGGGAGUUCGGAGCCAUUGACAACCCAAAGCGCCUGCCCCGAUGCCGGGAGACGGCCUC
2277

701                               710                               720
GlyGlyLysAspGluLeuAlaThrAlaThrGluSerThrValGluIleGluGluProLysLysAlaLysArgSer
GGAGGAAAGGAUGAGUUAGCGACGGCCACCGAGAGCACCGUGGAGAUUGAGGAGGCCCAAGAGGCAAAACGGUCA

730                               740                               750
SerLysGluGluAlaAspLeuAlaTyrSerAlaPheLeuLeuGlnSerAsnThrIleAlaAlaGluHisGlnAsp
UCCAAAGGAAGAGCCGACCUUGGCCUACUCAGCUUUCUGUCCAAUCCAACACCAUAGCUGUGAGCACCAAGAU
2427
```

Fig. 6D

[illegible]

**(51) Int.Cl.⁶: A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42**

Fig. 6E

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

Fig.7

109703

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

```
1 - GGCCGGGGTTACGGGCTGGCCAGCAGGCTGTGCCCCCGAGTCCGGTCAGC -50
      ::::::::::
2 - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCCGGTCAGC -50

1 - AGGAGGGGAAGAAGTGGCCTAAAATCTCTCCCGCATCGGCAGCCCAGGCC -100
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - AGGAGGGCAAGAAGTGGCTTAAAATCTCTCCCGCGTCGGCAGCCCAGGCC -100

1 - TAGTGCCCTACCAGCCACCAGCCATGGCTCTTCTTGCTCACCTGCCTG -150
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - TAGTGCCCTACCAGCCACCAGCCATGGCTCTTCTTGCTCACCTGCCTG -150

1 - CTGGCTGTCTTTTCAGCGGCCACGGCACAAAGCTCCTTATTGGGTCCCAG -200
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - CTGGCTGTCTTTTCAGCGGCCACAGCACAAAGCTCCTTATTGGGTCCCAG -200

1 - CTCCATATTTGGTCCCGGGGAGGTGAATGTTTTGGAAGGCGACTCGGTGT -250
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - CTCCATATTTGGTCCCGGGGAGGTGAATGTTTTGGAAGGCGACTCGGTGT -250

1 - CCATCACATGCTACTACCCAACAACCTCCGTCAACCGGCACAGCCGGAAG -300
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - CCATCACGTGCTACTACCCAACAACCTCCGTCAACCGGCACAGCCGGAAG -300

1 - TTCTGGTGCCGGGAAGAGGAGAGCGGCCGCTGCGTGACGCTTGCCCTCGAC -350
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - TTCTGGTGCCGGGAAGAGGAGAGCGGCCGCTGCGTGACGCTTGCCCTCGAC -350

1 - CGGCTACACGTCCCAGGAATACTCCGGGAGAGGCAAGCTCACCGACTTCC -400
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - CGGCTACACGTCCCAGGAATACTCCGGGAGAGGCAATCTCACCGACTTCC -400

1 - CTGATAAAGGGGAGTTTGTGGTGACTGTTGACCAACTCACCCAGAACGAC -450
      :::: :: :::::::::: :::: :::: :::: ::::
2 - CTGAAAAGGGGAGTTTGTGGTGATTTAAACCGACTCAGCCAGAGCGAC -450

1 - TCAGGGAGCTACAAGTGTGGCGTGGGAGTCAACGGCCGTGGCCTGGACTT -500
      :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
2 - TCAGGGAGCTAGAAGTGTGGCGTGGGAGTCAACGGCCGTGGCCTGGACTT -500

1 - CGGTGTCAACGTGCTGGTCAGCCAGAAGCCAGAGCCTGATGACGTTGTTT -550
      :::::::::: ::::::::::
2 - CGGTGTCAACGTGCTGGTCAGCCAGAAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -550

1 - ACAAACAATATGAGAGTTATACAGTAACCATCACCTGCCCTTTCACATAT -600
2 - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -600

1 - GCGACTAGGCAACTAAAGAAGTCCTTTTACAAGGTGGAAGACGGGGAAGT -650
2 - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -650

1 - TGTACTCATCATTTGATTCCAGCAGTAAGGAGGCAAAGGACCCCAGGTATA -700
2 - NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -700
```

Fig.8A

109703

(51) **Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;**
A 61 K 39/42

1 - AGGGCAGAATAACGTTGCAGATCCAAAGTACCACAGCAAAAAGAATTTCACA -750
2 - NN -750

1 - GTCACCATCAAGCATTTTGCGCTCAATGATGCTGGGCAGTATGTCTGCCA -800
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - NNNNNNNNNNNNNNNNTGCGCTCAGCGATGCTGGGCACTATGTCTGCCA -800

1 - GAGTGAAGCGACCCCCTGCTGAAGAACAGAACGTTGACCTCCGACTGC -850
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - GAGTGAAGAAACCCCCTGCTGAAGACCAGAACGTTGACCTCCGACTGC -850

1 - TAACTCCTGGTCTGCTCTATGGAAACCTGGGGGGCTCGGTGACCTTTGAA -900
 :::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - TAACCCTGATGTGCTCTATGGAAACCTGGGGGGCTCGGTGACCTTTGAA -900

1 - TGTGCCCTGGACTCTGAAGACGCAAACGCGGTAGCATCCTTGC GCCAGGT -950
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - TGTGCCCTGGACTCTGAAGAGGCAAAGCAGGTAGCATCCTTGC GCCAGGT -950

1 - TAGGGGTGGCAATGTGGTCATTGACAGCCAGGGGACAATAGATCCAGCCT -1000
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - TAGGGGTGGCAATGTGGTCATTGACAGCCAGGGGACAATAGATCCAGCCT -1000

1 - TCGAGGGCAGGATCCTGTTCACCAAGGCTGAGAACGGCCACTTCAGTGTA -1050
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - TCGAGGGCAGGATCCTGTTCACCAAGGCTGAGAACGGCCACTTCAGTGTA -1050

1 - GTGATCGCAGGCCTGAGGAAGGAAGACACAGGGA ACTATCTGTGCGGAGT -1100
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - GTGATCGCAGGCCTGAGGAAGGAAGACACAGGGA ACTATCTGTGCGGAGT -1100

1 - CCAGTCCAATGGTCAGTCTGGGGATGGGCCCCACCCAGCTTCGGCAACTCT -1150
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - CCAGTCCAATGGTCAGTCTGGGGATGGGCCCCACCCAGCTTTGGCAACTCT -1150

1 - TCGTCAATGAAGAGATCGACGTGTCCCGCAGCCCCCCTGTGTTGAAGGGC -1200
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - TCGTCAATGAAGAGATCGACGTGTCCCGCAGCGCCCTGTGTTGAAGGGC -1200

1 - TTTCCAGGAGGCTCCGTGACCATACGCTGCCCCCTACAACCCGAAGAGAAG -1250
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : :::
2 - TTTCCAGGAGGCTCCGTGACCATACGCTGCCCCCTACAACCCGAAGAAAAG -1250

1 - CGACAGCCACCTGCAGCTGTATCTCTGGGAAGGGAGTCAAACCCGCCATC -1300
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - CGACAGCCACCTGCAGCTGTATCTCTGGGAAGGGAGTCAAACCCGCCATC -1300

1 - TGCTGGTGGACAGCGGCGAGGGGCTGGTTCAGAAAGACTACACAGGCAGG -1350
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - TGCTGGTGGACAGCGGCGAGGGGCTGGTTCAGAAAGACTACACAGGCAGG -1350

1 - CTGGCCCTGTTCGAAGAGCCTGGCAATGGCACCTTCTCAGTCGTCCTCAA -1400
 ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: : ::: ::: :
2 - CTGGCCCTGTTCGAAGAGCCTGGCAATGGCACCTTCTCAGTCGTCCTCAA -1400

Fig. 8 B

109703

(51) Int.Cl.⁶: A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

```
1 - CCAGCTCACTGCCGAGGATGAAGGCTTCTACTGGTGTGTCAGCGATGACG -1450
   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - CCAGCTCACTGCCGAGGATGAAGGCTTCTACTGGTGTGTCAGCGATGACG -1450

1 - ATGAGTCCCTGACGACTTCGGTGAAGCTCCAGATCGTTGACGGAGAACCA -1500
   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - ATGAGTCCCTGACGACTTCGGTGAAGCTCCAGATCGTTGACGGAGAACCA -1500

1 - AGCCCCACGATCGACAAGTTCACTGCTGTGCAGGGAGAGCCTGTTGAGAT -1550
   :::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - AGCCCCACGATCGACGAGTTCACTGCTGTGCAGGGAGAGCCTGTTGAGAT -1550

1 - CACCTGCCACTTCCCATGCAAATACTTCTCCTCCGAGAAGTACTGGTGCA -1600
   : ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - CGCCTGCCACTTCCCATGCAAATACTTCTCCTCCGAGAAGTACTGGTGCA -1600

1 - AGTGGAATGACCATGGCTGCGAGGACCTGCCCACTAAGCTCAGCTCCAGC -1650
   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - AGTGGAATGACCATGGCTGCGAGGACCTGCCCACTAAGCTCAGCTCCAGC -1650

1 - GGCGACCTTGTGAAATGCAACAACAACCTGGTCCTCACCCTGACCTTGA -1700
   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - GGCGACCTTGTGAAATGCAACAACAACCTGGTCCTCACCCTGACCTTGA -1700

1 - CTCGGTCAGCGAAGATGACGAGGGCTGGTACTGGTGTGGCGCGAAAGACG -1750
   ::::::::::: :::: ::::::::::::::::::::::::::::::
2 - CTCGGTCAGCAAAGAAGACGAGGGCTGGTACTGGTGTGGCGCGAAAGACG -1750

1 - GGCACGAGTTTGAAGAGGTTGCGGCCGTCAGGGTGGAGCTGACAGAGCCA -1800
   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - GGCACGAGTTTGAAGAGGTTGCGGCCGTCAGGGTGGAGCTGACAGAGCCA -1800

1 - GCCAAGGTAGCTGTCGAGCCAGCCAAGGTACCTGTCGACCCAGCCAAGGC -1850
   ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
2 - GCCAAGGTAGCTGTCGAGCCAGCCAAGGTACCTGTCGACCCAGCCAAGGC -1850

1 - AGCCCCCGCGCCTGCTGAGGAGAAGG -1876
   ::::::::::: ::::::::::::::
2 - AGCCCCCGCTCCTGCTGAGGAGAAGG -1876
```

Fig. 8C

109703

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

	1	10	20	30	40
2	QSSLLGPSSIFGPGEVNULEGDSUSITGYYP TTSUNRHSR				
1					
		50	60	70	80
2	KFWCREEESGRCUTLASTGYTSQEYSGRGNLTDEPEKGEF				
1					
		90	100	110	
2+1	UUTVDQLTQNDSGSYKCGUGUNGRGLDFGUNLUSQKP				

Fig.9

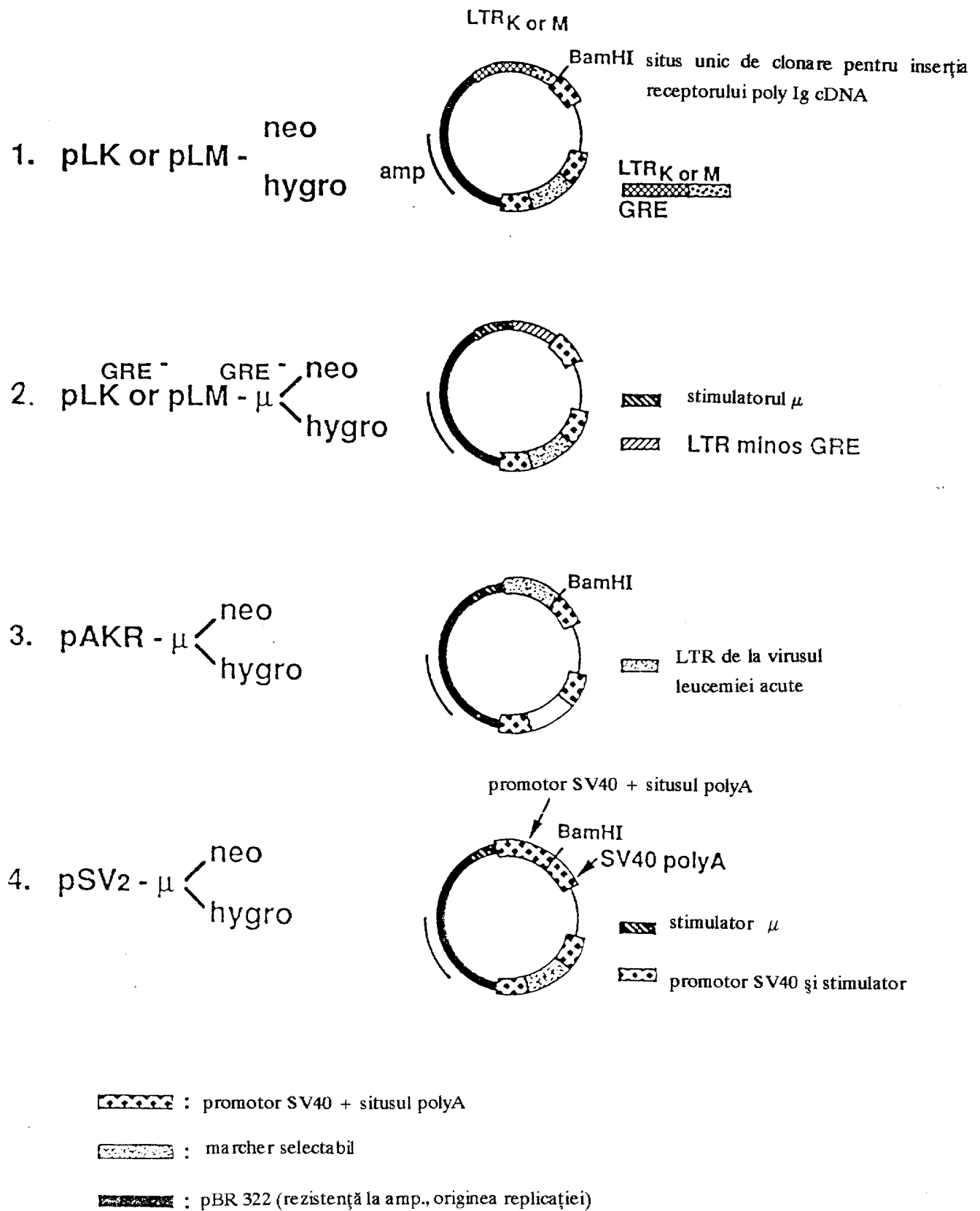


Fig.10

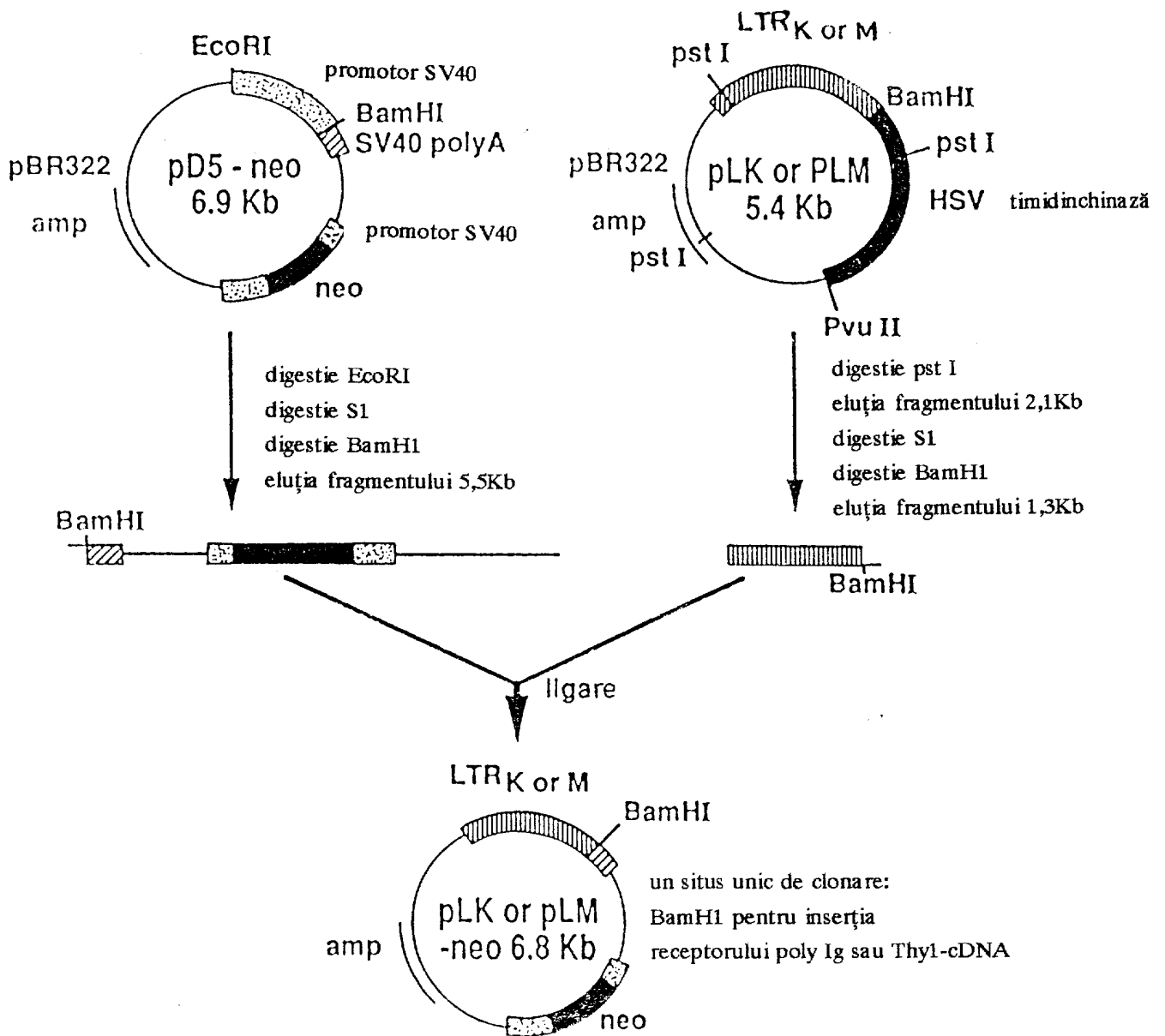
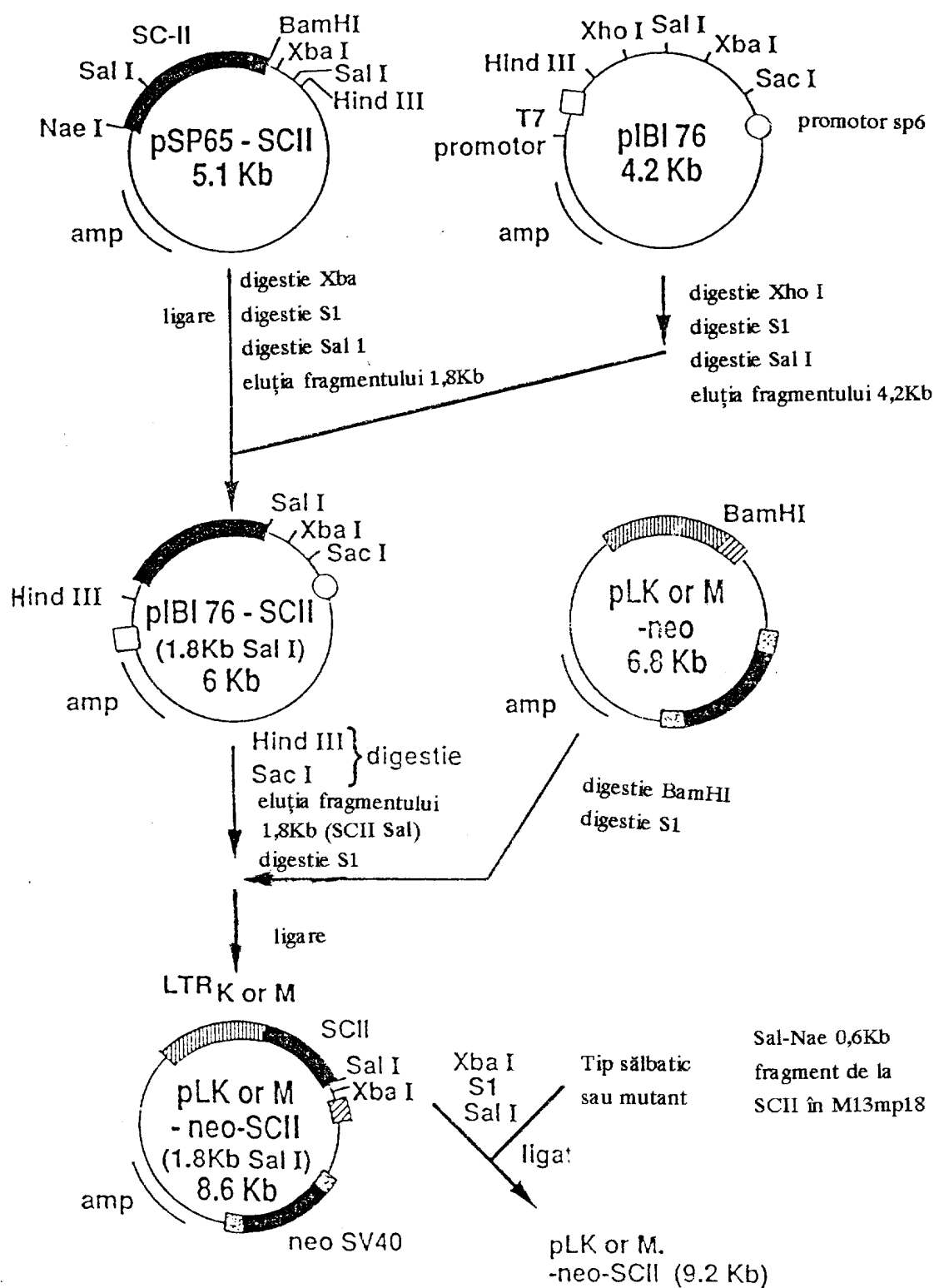


Fig.11

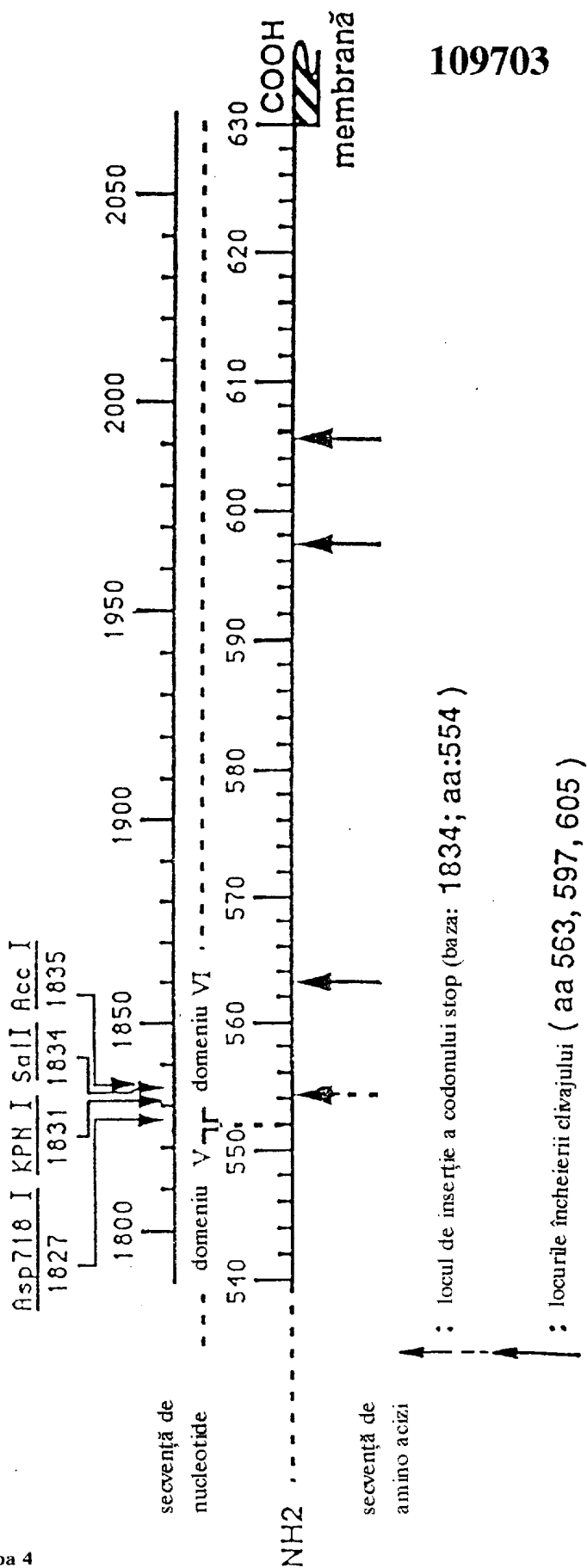
109703

(51) Int.Cl.⁶ : A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42



Insertia Thy I cDNA sau himeric Thy-Poly IG
Receptor cDNA în locul BamHI al pLK sau
pLM-neo

Fig.12



109703

(51) Int.Cl.⁶: A 61 K 35/14;
A 61 K 39/42

Fig.13

