

136/92

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

136/92
63059

55.627/SZE

K I V O N A T

eljárás Szintetikus poli-Ig receptorok, receptor antitest komplexek, ~~valamint ezek~~ előállítás^{1. par}a és alkalmazás^{1. par}a.

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, CAMBRIDGE, MA,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK,
INSTITUT SUISSE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES SUR LE CANCER,
EPALINGES, SVÁJC

A nemzetközi bejelentés napja: 1991. 04. 16.

Elsőbbsége: 1990. 04. 16. (510,161),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/02604.

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/16061.

A találmány tárgya *eljárás* szintetikus poli-Ig receptorok, receptor antitest komplexek, ~~valamint ezek~~ előállítás^{1. par}a és alkalmazás^{1. par}a.

A jelen találmány a nyálkahártya passzív immunvédelmének és a poli-Ig immunreagensek és technikák általános területeivel kapcsolatos.

jellemezés *albra* *1. par*
híj *ad*

136/92

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

63059

3500

A

55.627/SZE

Ugyvédi és Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
Telefon 153 3733, 131-4200

NSIO-5-

AGIK 35/14

33/12

30/00

Eljárás: Szintetikus poli-Ig receptorok, receptor antitest
komplexek, ~~valamint ezek~~ előállítása és alkalmazása

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, CAMBRIDGE, MA,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK,
INSTITUT SUISSE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES SUR LE CANCER,
EPALINGES, SVÁJC

Feltalálók:

KRAEHENBUHL Jean-Pierre, RIVAX, SVÁJC,
WELTZIN Richard A., WELLESLEY, MA,
NEUTRA Marian R., SHERBORN, MA,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés napja: 1991. 04. 16.

Elsőbbsége: 1990. 04. 16. (510,161)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/02604.

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/16061.

Ez a találmány részben az Egyesült Államok Kormányának anyagi támogatásával készült és az Egyesült Államok Kormányának bizonyos jogokkal rendelkezik a találmánnyal kapcsolatban.

A jelen találmány a nyálkahártya passzív immunvédelmének és a poli-Ig immunreagensek és technikák általános területeivel kapcsolatos. A poli-Ig fogalmát az antitestek polimer osztályainak jelölésére használjuk, pl. az IgA és IgM jelölésére. Az IgM antitestek általában az immunválasz korai állapotában termelődnek és nem játszanak fontos szerepet a védő nyálkahártya immunitásban. Így a találmány általánosságban a polimer Ig antitestekre vonatkozik és a találmány összes szempontjához megfelelő szokásos és előnyben részesített antitestek az IgA osztályu antitestek, melyek normális esetben dimer formában választódnak ki és kisebb mértékig magasabb IgA polimerekként.

Számos patogén baktérium és vírus először úgy nyer be bocsátást a szervezetbe, hogy a gasztrointesztinális, légzőszervi vagy a nemi szervek sejtjes borításán (epitélium) keresztül jut. Az antitestek egy specializált osztálya az IgA antitestek védik ezeket a felületeket. Az IgA antitestek dimer vagy polimer molekulák, melyeket az epiteliális felszín alatti szövetekben elhelyezkedő sejtek termelnek. Az epiteliális sejtek szállítják a nyálkahártya váladékba, ahol ezek összekötik vagy bevonják a testbe még be nem került patogéneket. Ezáltal megakadályozzák, hogy a patogének érintkezzenek és kötődjenek az epiteliális sejtekhez. Így az IgA antitestek azokra a patogénekre hatnak, melyek nem kerültek be a szervezetbe és az epiteliális felszínen keresztül

a szervezetbe való bejutás akadályozásán keresztül nyújtanak védelmet.

A természetesen előforduló IgA választ a nyálkahártya felszínre jutó antigén váltja ki. Az antigén a testbe olyan specifikus helyeken jut be (mikroréseknél vagy M sejteknek nevezett hely) melyek megvalósítják a transzepiteliális antigén transzportot a nyálkahártya borítás olyan területeire, melyek a nyálkahártya immunrendszerének specializált és rendezett sejtszöveteket tartalmazzák. Specifikusabban, ahogy azt az 1. ábra mutatja, az A antigének (pontokkal jelöltük) az 1-es lumenben a 2-es helyü M sejtek lumenális felszínéhez kötődnek. Az antigének internalizálódnak és transzcitózálódnak a 3-asnál, hogy a 4-es jelölésű intra-epiteliális zsebben szabaduljanak fel, mely L limfoid sejteket (B és T sejtek) és antigén feldolgozó/képviselő sejteket - mint pl. makrofág sejteket (M) - tartalmaz.

Az IgA antitestek egy természetes úton immunizált gazdában a váladékba a légző-és emésztőrendszer, a nemi szervek és az emlőmirigy epitel és mirigysejtjeinek bazális (belső) felszínén levő poli-Ig receptornak nevezett specifikus receptorhoz való kötődéssel transzportálódnak. Lásd Solari and Kraehenbuhl "Receptor-Mediated Transepithelial Transport of pPolymeric Immunoglobulins" pp. 269-298 in The Mammary Gland, Nelville and Daniel eds., Plenum Publishing, Cambridge (1987); Mestecky (1987) J. Clin. Immunol. 7:265-276. A receptor-IgA komplexek ezeken a sejteken keresztül szállítódnak és a lumenális (külső) sejtfelszínen kiválasztódnak, ahol a receptor enzimatikusan lehasad így az IgA kiszabadul a váladékba egy a szekréciós összetevőnek (SC) nevezett receptor fragmenttel együtt. Lásd Mostov et al., (1980) Proc. Natl.

Acad Sci. USA 77:7257-7261; Solari, R. and Kraehenbuhl, J. P. Cell 36:61-71 (1984); Kuhn and Kraehenbuhl, J. Biol. Chem. 256:12490-12495 (1981). Arról számolnak be, hogy a szekréciós összetevő csökkenti az IgA proteolitikus lebomlását. Lindh, J., J. Immunol. 114:284-286 (1975); Brown et al., J. Clin Invest. 49:1374 (1974).

Általánosságban a létező immunizációs eljárások, melyekbe beletartozik az antigének beinjekciózása, kiváltják az antitestek IgG osztályának termelését, melyek szisztémásan keringenek a szervezetben és semlegesítik a patogéneket, miután azok bejutottak a testbe. Az antigének beadása általában nem vált ki jelentős IgA választ.

A nyálkahártya gátaknál az IgA védekezés előnyeinek felhasználására való erőfeszítések magukba foglalják a szájon át történő immunizálást, akár az immunizált emlős aktív védelmére, akár az immunizált emlős nyálkahártya váladékát használva egy másik emlős passzív védelmére. Glass et al., New Engl. J. Med., 308:1389-1392 (1983); Fubara et al., J. Immunol., 111(2):395-403 (1973). Monoklonális IgA antitesteket termeltek és alkalmaztak közvetlenül a légzőszervi nyálkahártya felszínen egy olyan kísérletben, mely a patogének bejutása ellen kívánt védelmet nyújtani. Mazanec et al., J. Virol., 61:2624-2625 (1987).

A következőkben megadjuk a találmány összefoglalását.

Számos utat fedeztünk fel a monoklonális poli-Ig antitestek előállítására és stabilizálására, melyek a passzív nyálkahártya immun védekezés reagensait eredményezik.

Még specifikusabban ezek a reagensek alapjában véve egy szelektált antigén vagy antigének családjára specifikus poli-Ig és egy legalább egy a poli-Ig receptor poli-Ig kötő doménjét tartalmazó stabilizáló fehérje közötti izolált komplexek. A poli-Ig stabilizáló lényegében nem rendelkezik semmilyen C-terminális transzmembránnal vagy intracelluláris poli-Ig receptor doménekkel. A nyert komplex a nem komplex poli-Ig-hez viszonyított proteolitikus stabilitással jellemzett és rendelkezik a poli-Ig specifikus kötő és immunvédő kereszt kötő tulajdonságaival. A találmány első megvilágításában a stabilizáló fehérje egy rekombináns fehérje. A találmány egy második megvilágításában a poli-Ig antitest egy monoklonális antitest.

Ahogy az a későbbiekben részletezésre kerül a komplex egy előnyben részesített formája a poli-Ig és stabilizáló közötti kovalens (diszulfid) kötésekkel jellemzett. Ilyen komplexek olyan sejttel állíthatók elő, mely képes a szelektált antigénre vagy antigének családjára specifikus kívánt poli-Ig termelésére. Ezt a sejtet a poli-Ig stabilizáló termelése céljából manipulálták. A komplexet ilyen sejtek tenyésztésével termelik és ezekből nyerik ki.

Előnyösen a poli-Ig egy monoklonális IgA osztályu antitest. A későbbiekben szintén részletezésre kerül, az előnyben részesített stabilizáló a természetesen előforduló poli-Ig receptor doménjeire hivatkozva jellemezhető és az előnyben részesített stabilizáló tartalmazza az I-es domént és legalább a IV-es vagy az V-ös domént, vagy mindkettőt, a VI-os domént lényegében csonkitva (hiányosan). Az I-es domén előnyösen az V-ös doméntől egy 100-500 aminosavból álló

szekvencia távolságban helyezkedik el.

A találmány egy 3. megvilágítása rekombináns poli-Ig stabilizálót jellemez, mely a poli-Ig receptor egy poli-Ig kötő doménjét tartalmazza és lényegében nem rendelkezik C-terminális transzmembrán vagy intracelluláris poli-Ig receptor doménekkal. Az előnyben részesített stabilizálók azok, melyeket fent tárgyaltuk, tekintettel a találmány első két megvilágításban jellemzett komplexre.

A találmány egy 4. megvilágítása a poli-Ig monoklonális antitestek védekezési kapacitásának in vivo vizsgálatára szolgáló módszereket jellemez. A módszer szerint a vizsgálandó monoklonális poli-Ig-t az emlős keringésébe juttatjuk és az emlős nyálkahártya szekrécióját poli-Ig-re vizsgáljuk. Az emlőst ezután kitevesszük a patogénnek (vagy spermatozónak) és a patogén elleni védekezést vagy inszeminálást meghatározzuk. Előnyösen a monoklonális poli-Ig-t az emlős keringésébe injekciózással vagy infúzióval juttatjuk be. Másik megoldásként egy tumor vagy tumor-képző sejt (pl. hibrídóma) juttatható szubkután módon az emlősbe a monoklonális poli-Ig folyamatos forrásaként.

A találmány egy 5. aspektusa a fent leírt szulfhidril keresztkötésű komplex előállítás módszerét jellemzi: a poli-Ig receptor termelésére manipulált rögzítés-függő epiteliális sejteket biztosítva; ezen epiteliális sejteket olyan körülmények között szaporítjuk, hogy a sejtek egy monoréteget hozzák létre egy porusos támasztékon, melyet úgy pozicionáltunk, hogy elválassza a monoréteg bazális oldalán levő első tápközeget a monoréteg apikális oldalán levő második tápközegtől. A monoklonális IgA-t a monoréteg bazális olda-

lához adjuk és a komplex a sejtben képződik amint az anti-test a monorétegen keresztül transzportálódik. A komplexet a monoréteg apikális oldalán levő tápközegből nyerjük ki. Előnyösen az első tápközeg az epiteliális sejtek szaporodását elősegítő megfelelő nutrient tápközeg. Szintén előnyösen a 2. tápközeg lényegében a poli-Ig komplex kinyerését befolyásoló fehérjéktől mentes. A monoklonális IgA hibridóma sejtek első tápközegben való együtt tenyésztésével juttathatók be. Másik lehetőségként a monoklonális IgA-t először egy hibridóma tenyészetben termeltetjük, majd szeparáljuk a tenyészetből és végül az első tápközegbe juttatjuk.

A találmány első és 2. aspektusainak komplexe közvetlenül adható az emlős nyálkahártya felszínére a patogén elleni védekezés vagy az inszeminálás elleni védekezés céljából. Előnyösen a komplex szájon át, nazálisan, vaginálisan, rektálisan, a szembe vagy a középfülbe adható. Az alkalmazás egy előnyben részesített módja, hogy a komplexet az első emlős nyálkahártya váladékában biztosítjuk majd ezt a nyálkahártya váladékot adjuk egy második emlősnek. Például az első emlős komplexet tartalmazó tejével etetjük a második emlőst. A szekréció kiváltása céljából a poli-Ig-t (pl. hibridóma tenyészetből tisztított) iuttatunk az első emlős keringésébe (pl. infúzióval vagy injekcióval és tejet vagy más nyálkahártya váladékot gyűjtünk ettől az emlőstől).

A találmány különösen hatékony és biztonságos passzív immunizálást biztosít, mert nem szisztémás. Ennek megfelelően az állati (emlős nem-humán) immunológiai reagenssek sokkal valószínűbben toleráltak a nyálkahártya immun védelmében, mint ahogy az a szisztémás immunizálás esetén igaz lehet. A neonatális fertőzések, mint pl. a nekrotizáló

enterocolitis és a B csoportu sztreptokokkuszos fertőzés különösen fontos célpontok, mivel a természetes nyálkahártya immunitás ebben a korban hiányzik.

A találmány egy 6. aspektusa a poli-Ig-t termelő hibridóma előállítását jellemzi. Az emlőst kitesszük egy antigénnek és az emlős nyálkahártya szövetéből, mint pl. a Peyer-féle foltokból vagy más limfoid sejtekben gazdag nyálkahártya szövetből, a limfoid sejteket kinyerjük. A Peyer-féle foltokat részesítjük előnyben, azonban más limfoid sejtekben gazdag megfelelő nyálkahártya szövetek közé tartoznak a mandulák, orrmandulák, az appendix és a rektális limfoid szövet. A limfoid sejtet egy mielóma sejthez fuzionáljuk. Előnyösen az antigént az emlős egy nyálkahártyájának felületére juttatjuk.

A találmány más jellemzői és előnyei az előnyben részesített megvalósulásainak következő leírásaiból nyilvánvalók lesznek.

A következőkben megadjuk az előnyben részesített megvalósításokat.

A következő ábrákat használtuk a találmány leírásában:

1. ábra: az M sejteken keresztül történő antigén transzcitózis sematikus bemutatása.

2. ábra: a polimer Ig-A-t termelő hibridóma előállítás lépéseinek sematikus bemutatása

3. ábra: egy hibridóma által termelt polimer IgA véde-

kezési jellemzőinek becslési módszerét mutatja be sematikusan.

4. ábra: a polimer IgA és a módosított poli-Ig receptor közötti komplex szerkezetét mutatja be sematikusan.

5. ábra: a poli-Ig receptor doméneinek sematikus bemutatása.

6A és 6B ábrák: a poli-Ig receptort kódoló gén nukleotid szekvenciáját és az ebből levezetett aminosav szekvenciát mutatja.

7. ábra a poli-Ig receptor két nyul alléljának klónozott cDNS-éből következtetett, levezetett aminosav szekvencia.

8A- 8C ábrák: azt a cDND-t mutatják, melyből a 7. ábra szekvenciáját levezettük.

9. ábra: összehasonlítja a 7. ábra poli-Ig receptor alléljai I-es doménjének aminosav szekvenciáját.

10. ábra: a különböző expressziós vektorok komponenseit ábrázolja sematikusan.

11. ábra: két specifikus expressziós vektor a 6,8 kb hosszúságú pLK-neo és a 6,8 kb hosszúságú pLM-neo szerkezetét mutatja.

12. ábra: a klónozott poli-Ig receptor gén 11-es ábrán bemutatott vektorokba való inzertálását mutatja be.

13. ábra: a poli-Ig receptor cDNS különböző restrikciós

helyeit mutatja be.

Stabilizáló fehérje és poli-Ig komplex

Az előnyben részesített stabilizáló fehérje a poli-Ig receptorból származik, mely egy olyan transzmembrán molekula, mely a poli-Ig transzportját közvetíti. A poli-Ig receptor a következő doméneket tartalmazza: a 4-es és 5-ös ábrán bemutatottakat; 5 extracelluláris domént; egy transzmembrán áthidaló szegmentet és egy C-terminális intracelluláris farkat. A receptor proteolitikus hasítása eredményezi a szabad 5-doménes fehérjét az "SC"-t vagyis a szekréciós komponenst. Mostov et al. Nature 308:27-43 (1984); Kuhn et al., J. Biol. Chem 258:6653-6659 (1983). Diszulfid hidak képződnek a poli-Ig receptor és az IgA között, ahogy azt általánosságban a 4. ábra mutatja.

A poli-Ig receptor általában konzerválódott az emlős fajokban és ezt a fogalmat úgy használjuk, hogy ideértjük az összes ilyen receptort, függetlenül attól, hogy milyen emlős forrást használunk, pl egeret, patkányt, nyulat, tengeri malacot, sertést, juhot, lovat, szarvasmarhát vagy embert. A tudomány e területén jártas szakemberek elfogadják, hogy a jelen alkalmazásban szereplő nyul poli-Ig receptor szekvenciák a más emlősökből származó poli-Ig receptorokat kódoló cDNS-ek azonosítására szolgáló standard hibridizációs klónozási technikákban alkalmazhatók.

Ahogy a fentiekben összefoglaltuk a komplex stabilizáló fehérje része legalább két különböző módon termelt rekombináns stabilizáló fehérje lehet. A poli-Ig receptor klónoozható és expresszálnak egy olyan sejtben, mely ké-

pes azt kiválasztani és hasítani, hogy eredményül a rekombináns stabilizáló fehérjét kapjuk. Másik lehetőségként a poli-Ig receptor gén különböző módokon manipulálható (különösen ahogyan később leírjuk egy stop kódon inzertálásával), hogy egy olyan szerkezetet kapjunk, mely a stabilizáló fehérjeként közvetlenül expresszálható.

Ahogy fent jeleztük a stabilizáló fehérje előállítás mindkét módja a klónozott poli-Ig receptor génjével kezdődik. Mostov et al., Nature 308:37-43 (1984) számolnak be ezen gén klónozásáról és szekrécijáról. A 6. ábra ezen közleményből származik és bővebben magyarázatra kerül a későbbiekben.

Egy másik specifikus eljárás a gén klónozására a következők szerinti. Lásd Schaefer et al., J. Cell. Biol. 110:987-998 (1990). Citoplazmás RNS-at preparáltunk tejelő Uj Zelandi nyulak tejmirigyéből Suard et al. Biochem J. 201: 81-90 (1982) szerint; és a poli A + RNS-at Schibler et al., J. Mol. Biol. 142:93-116 (1980) szerint tisztítottuk. A poliA+RNS, melynek a receptor transzlátációs aktivitását 5-20%-os lineáris szacharóz grádiensen végzett méret frakcionálással fejlesztettük, szolgált templátként a cDNS szintéziséhez. Az első cDNS szálat Wahli et al., Dev. Biol. 67:371-383 (1978) szerint szintetizáltuk és a második szálat a Gubler-féle (Gene 25:263-269 (1983) DNS polimeráz I-RN-áz H módszerrel. A kétszálu és dC-farkazott cDNS-at 1%-os alacsony olvadáspontu agaróz gélen frakcionáltuk, és az 1,5 - 7 kb tartományba eső méretű cDNS-akat eluáltuk és a dG-farkazott pBR322-höz építettük Peacock et al., Biochem. Biophys. Acta 655: 243-250 (1981) leírásának megfelelően. A DH1 sejteket a kétszáluvá tett DNS-val transzformáltuk Hanahan et al., J.

pes azt kiválasztani és hasítani, hogy eredményül a rekombináns stabilizáló fehérjét kapjuk. Másik lehetőségként a poli-Ig receptor gén különböző módokon manipulálható (különösen ahogy később leírjuk egy stop kódin inzertálásával), hogy egy olyan szerkezetet kapjunk, mely a stabilizáló fehérjeként közvetlenül expresszálható.

Ahogy fent jeleztük a stabilizáló fehérje előállítás mindkét módja a klónozott poli-Ig receptor génjével kezdődik. Mostov et al., Nature 308:37-43 (1984) számolnak be ezen gén klónozásáról és szekrécijáról. A 6. ábra ezen közleményből származik és bővebben magyarázatra kerül a későbbiekben.

Egy másik specifikus eljárás a gén klónozására a következők szerinti. Lásd Schaefer et al., J. Cell. Biol. 110:987-998 (1990). Citoplazmás RNS-at preparáltunk tejelő Uj Zalandi nyulak tejmirigyéből Suard et al. Biochem J. 201: 81-90 (1982) szerint; és a poli A + RNS-at Schibler et al., J. Mol. Biol. 142:93-116 (1980) szerint tisztítottuk. A poliA+RNS, melynek a receptor transzlálhatósági aktivitását 5-20%-os lineáris szacharóz grádiensen végzett méret frakcionálással fejlesztettük, szolgált templátként a cDNS szintéziséhez. Az első cDNS szálat Wahli et al., Dev. Biol. 67:371-383 (1978) szerint szintetizáltuk és a második szálat a Gubler-féle (Gene 25:263-269 (1983) DNS polimeráz I-RN-áz H módszerrel. A kétszálu és dC-farkazott cDNS-at 1%-os alacsony olvadáspontu agaróz gélen frakcionáltuk, és az 1,5 - 7 kb tartományba eső méretű cDNS-akat eluáltuk és a dG-farkazott pBR322-höz építettük Peacock et al., Biochem. Biophys. Acta 655: 243-250 (1981) leírásának megfelelően. A DH1 sejteket a kétszáluvá tett DNS-val transzformáltuk Hanahan et al., J.

Mol. Biol. 166:577-580 (1983) általános módszerét használva. A transzformált baktériumokat lizáltuk és a DNS-at nitro-cellulóz szűrőre vittük át (Thomas, Methods Enzymol 100: 255-266, 1983) és a próbát két szintetikus oligonukleotiddal végeztük. Az alkalmazott specifikus próbák a Mostov et al, Nature 308:37-43 (1984) által publikált szekvencia 186-206 és 2421-2437 nukleotidjai voltak, melyeket Gough, N. et al., Nature 309:763-767 (1984) leírásának megfelelően T4 poli-nukleotid kinázzal és αP^{32} -ATP vel jelöltük meg. A mindkét próbához hibridizáló cDNS klónokat tovább jellemeztük hibrid szelektált transzlációval (Riezman et al. EMBO J. 2: 2161-2168, 1983). A kapott plazmidok a pSC-1 plazmid, mely megfelel a poli Ig receptor alacsony molekulásúly formájának (a 2-es és 3-as domének deléciójával) ahogy Deitcher et al, Mol. Cell. Biol. 6: 2712-2715 (1986) leírták és a pSC-11 plazmid kódolja a magas molekulásúly formát.

A 6A és 6B ábrák mutatják a poli-Ig receptor mRNS szekvenciáját és az ebből meghatározható aminosav szekvenciát, melyről Mostov et al számoltak be. A 6A és 6B ábrákon való jellemzésük a következő. A maradékokat az 5' végtől a 3' vég irányában számoztuk a p2153-ban levő poli(dG) farok utáni első nukleotiddal kezdve. A nukleotid számokat a jobb szélén jelöltük. A teljes szekvencia 3517 bázis hosszúságú és tartalmazza a szokatlan poli(A) hozzáadott szekvenciát, az AUUAA-t, mely a poli(A) faroktól 26 maradékkal upstream helyezkedik el és minden maradék alatt egy háromszög jelzi a maradékot. A várható aminosav szekvenciát a nukleotid szekvencia fölött mutatjuk. A jelpeptidet -18-tól -1-ig számoztuk. Az érett poli-Ig receptor első aminosava (Gln) az 1. számu. Az Asn-kötött glikoziláció lehetséges helyét fe-

lülhuzással jelöltük. A várható membránt áthidaló régiót szaggatott felülhuzás jelzi. Az 5 domén cisztein párjait akárcsak a 6. domén megfelelő első ciszteinjét a domének első ciszteinje fölött levő teli körök és üres körök az egyes domének második ciszteinje fölött *jelölik*.

A poli-Ig receptor gént klónozva, manipulálni lehet a kívánt stabilizáló fehérje direkt expressziója céljából. Specifikusan az SC bizonyos poli-Ig-kötő doménjeit tartalmazó rekombináns fehérjék stabilizálni fogják a polimer-Ig-t a proteolitikus hasítással szemben lényegében nem okozva kárt a polimer IgA specifikus kötésében és védő funkciójában. Különösen a 4. és 5. ábra doménjei az elsődleges poli-Ig kötő domén (I) a két spacer elsődleges II és III domének és C-terminális IV és V domének, melyek a poli-Ig stabilizását segítik.

A poli-Ig receptort a C-terminusnál csonkitottuk, hogy eltávolítsuk a fehérje transzmembránt és intracelluláris részét, melyek nem nélkülözhetetlenek a stabilizáláshoz vagy a védelemhez. A csonkitott poli-Ig receptor hasznos a találmányban ezért magába foglalja (minimum) az N-terminális poli-Ig kötő I-es domént.

A két specifikus csonkitott poli-Ig receptor következő megvitatását a találmány illusztrálására és nem korlátozására szántuk. A tudomány e területén jártas szakemberek könnyen elfogadják, hogy az itt nyújtott fehérje szekvenciák olyan konzervatív helyettesítésekkel és deléciókkal módosíthatók, melyek megőrzik a találmány funkcióját és szellemét.

A 7. ábra a poli-Ig receptor két nyul alléljának klóno-

zott cDNS-ából következtetett aminosav szekvenciát írja le. Az egyik allélt No1-nek jelöltük és a Mostov et al. Nature **308:37-43** (1984) közleményben szereplő és a 6A és a 6B ábrán bemutatott cDNS-nak felel meg. A másik allélt Kraehenbuhl klónoztta a laboratóriumban a fent leírt technikával és ezen allél szekvenciáját No2-nek jelöltük a 7. ábrán. A 7. ábrán egy kettőspontot ":" használunk az azonos maradékok jelölésére; "." sorozatot használunk a hasonló maradékok jelölésére - pl. A, S, T; D, E, N, Q; R, K; I, L, M, V; F, V.

A 8A-8C ábrák ezen klónok scDNS szekvenciáját írják le. Egy oszlop itt is az azonos bázisokat mutatja "N" az ismeretlen bázisokat jelöli.

A poli-Ig receptor szekvencián belüli 7 domén a következő (a számok a 6. ábrára utalnak):

Domén	Szegment
I	10-118
II	119-223
III	224-332
IV	333-441
V	442-552
VI	553-652
VII	653-755

Az I-es domén mindkét allélra specifikus szekvenciáját (ideértve az 1-9 aminosavakat) melyek nem alapvetőek a poli-Ig kötéshez és ezért nem kritikusak a jelen találmányhoz, a 9. ábra mutatja.

A poli-Ig receptor szekvencia konzervatív aminosav helyettesítésekkel, deléciókkal és addíciókkal módosítható,

melyek nem változtatják meg a poli-Ig kötést. Valóban, amint azt a 9. ábra mutatja a 2 I-es domén szekvencia összehasonlítása csupán 3 aminosav eltérést mutat a 38, 70 és 76 pozíciókban. A találmány többi kérdéses doménjében (II-V) 2-6 aminosav változás van a IV-es doménnek a 337 és 358 maradékánál, az V-ös doménnek a 448, 460 és 513 maradékainál van aminosav eltérése.

Összegzésként 80%-nál jóval nagyobb homológia van aminosav szinten és a szekvenciák mind az 5 doménben aminosav helyettesítésekkel vagy domén deléciókkal módosíthatók.

Előnyösen a megfelelő homológiát meg kell őrizni az I-es doménben a poli-Ig kapcsoláshoz, a megfelelő elhelyezkedést (pl. 100-500 aminosav) meg kell őrizni az I-es és V-ös doménben és az V-ös domén alkalmas kell legyen a kovalens diszulfid stabilizáció megőrzésére. Így igen jelentős módosítások tolerálhatók a II-IV-es doménekben.

Igen kívánatos, hogy a csonkitott poli-Ig receptor tartalmazza az V-ös domént is, mely egy szulfhidril kapcsolódáson keresztül a komplex kovalens stabilizációjáért felelős. Lásd általánosan Eiffert et al., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. 365:1489-1495 (1984), ahol a poli-IgA (humán) diszulfid hidak képzésében részt vevő cisztein maradékokat azonosítják. Továbbá fontos beépíteni a II-V-ös doméneknek megfelelő spacer-t az 5. ábrán bemutatott diszulfid hid létrehozásához az V-ös domént pozícionálni és erősíteni a proteolízis elleni védelmet.

A csonkítás megfelelő helyének kiválasztásához a membránt átfogó szegment a teljes receptor VI-os doménjében ugyan azonosítható mint egy töltés nélküli első sorban hidrofób maradékok szakasza (pl. 610-652 a 6. ábrán), melyet töltéssel

rendelkező maradék (pl. Lys 629) előz meg és egy kiemelkedően bázikus szekvencia (pl. Arg-Ala-Arg-His-Arg a 6. ábrán) követ. A molekula ezen membránt átfogó részét, akár csak a C-terminális citoplazmás farkat csonkítással eltávolítjuk.

Egy specifikus megvalósításban a csonkítást 16 tagu oligonukleotid szintézisével értük el: ACTAGTCTAGACTAG, TAG volt a stop kódon mindhárom leolvasási keretben. Az oligonukleotid egy palindróma és magával hibridizál. A kapott duplexet a fent leírt poli-Ig cDNS-ba (DNS pozíció 1834, aminosav 554) inzertáltuk.

Még specifikusabban az oligomer által kódolt 4 aminosavat (T-S-L-D) hozzáadjuk az V-ös domén C-terminális végéhez így a csonkítás éppen az V-ös és VI-os domének közötti átmenetnél következik be. Az oligomer inzertálásához szelektált restriktációs endonukleáz hely a SalI hely mely egyedi és közel van a vélt természetes hasítási helyekhez (56597 és 605 aminosavak). Más megfelelő inzertálási helyek az V-ös doménben az Asp-nál (1827); a KpnI-nél (1831); az AccI-nél (1835) vannak. Nincs megfelelő egvedi hely a VI-os doménben, lásd az 1. ábrát.

A fent leírt klónozott poli Ig receptor cDNS vagy a manipulált (pl. csonkított poli Ig receptor cDNS általában expresszálnak a tudomány e területén jártas szakemberek számára, jól ismert bármely expressziós rendszer valamelyikében. Például kívánatos expressziós rendszerek a professzionális szekréciós seitek (olyan seitek, melyek természetes módon nagy mennyiségű fehérjét választanak ki, mint pl. a fibroblaszt sejtek ideértve a Chinese Hamster Ovary (Kinai

hőrcsőg ovárium) expressziós rendszereket. Endokrin tumor sejt expressziós rendszerek, mint az ATt 20 sejtek (ATCC CRL89 és CRL1795, vagy a PC-12 sejtek is használhatók. Madin-Darby Kutya Vese (Madin-Darby Canine Kidney =MDCK) sejtek szintén kívánatos gazdasejtek. Lásd Mostov et al., (1984) a fentiekben említettük. Az expressziós eszköz kiválasztása a szelektált gazdasejttől függ.

Egy megvalósításban a csonlitott poli-Ig receptort folyamatosan IgA-t termelő sejtekben, mint amilyenek a limfocita-mielóma fúziók - lehet expresszálni. Ezen esetben az előnyben részesített expressziós eszköz olyan, hogy magába foglal egy erős vagy egy indukálható promótert, erősítő elemet (pl. egy B limfocita specifikus erősítőt, mint amilyen a μ -erősítő, vagy egy vírus eredetű erősítőt) egy a poli-Ig R-cDNS-be juttatott manipulált stop kódot - abból a célból, hogy elkerüljük az I-V-ös domének proteolitikus szeparálásának szükségességét a sejt membrán rögzítéstől (VI-VII domén). Specifikus expressziós rendszereket a továbbiakban írtunk le.

Ahogy általánosan a 10. ábrán bemutattuk az expressziós eszköz egy olyan vektor lehet, melyet a glükokortikoid érzékeny elemeket tartalmazó pLK-neoval vagy higroval vagy a pLM-neoval vagy higroval szemléltethetjük példaként, vagy ugyanezekkel a vektorokkal, melyekben a glükokortikoid érzékeny elemet eltávolítottuk és egy μ -erősítő elemmel helyettesítettük, vagy egy pAKR- μ -neoval és pSV40- μ -neoval. A vektor a következő elemeket tartalmazhatja.

1) A cDNS transzkripciójának iniciálásához való megfelelő promótert. A retrovirusokból származó LTR-ek megfelelőek, beleértve a Williger et al. J. Virol. 60:1-11 (1986)

szerint leírt vese adrenokarcinómából izolált LTR-t. A vese LTR homológiát mutat az emlő tumorokból izolált LTR-rel valamennyi eltéréssel az U_3 régióban. Mindkét LTR-nek van egy glükokortikoid érzékeny eleme, mely lehetővé teszi a transzkripció hormonális stimulálását. Például a glükokortikoidok (dexametazon, Sigma Corp. St. Luis, MO) 10-50-szeresre növelik a csonkitott poli-Ig receptor transzkripcióját. Egy klónozó vektorból egymást követő pSt1, S1 és BamHI emésztéssel (pLK vagy pLM, Dr Heidi Disselmann biztosította, Swiss Institute for Cancer Research, akinek a csoportjában hozták létre a plazmidot, lásd Williger et al., fent említettük) nyert vese vagy tejmirigy LTR-t inzertáltunk egy pSV₂ neo vektorba (a Biolabs-en készültül a kereskedelembe beszerezhető), melyet előzően és egymás után EcoRI-gyel S1-gyel és BamHI-gyel emésztettük (hogyan az SV40 promótert eltávolítsuk és az LTR promótert tegyük a helyére) (6B ábra). A pLK-higro vagy a pLM-higro vektort úgy hoztuk létre, hogy a higromicin rezisztencia gént (LB) helyeztük a neomicin rezisztencia gén helyére. A pLK-neo PIR11 plazmidot az ATCC-nél (Rockville, Maryland) deponáltuk az ATCC 40787 katalógusszámon. Ez a plazmid a 10. ábrán bemutatott pLK-neo plazmid, a plazmid BamHI helyére inzertált csonkitott polimer immunoglobulin receptort kódoló DNS-val (8. ábra).

2) Erősítő elemeket a transzkripció fokozására és így a csonkitott poli-Ig receptor termelésére. Az ilyen elemek magukba foglalják a virális elemeket (SV40 az MMTV glükokortikoid érzékeny elemeit vagy az emlős specifikus erősítőket, mint amilyen a B sejtekben lévő Ig magas expressziójáért felelős μ erősítő. A μ nehézláncú lokuszt (Mercola, M.,

Wang, X. F., Olsen, Y. and Calame, K., 1983, Science, 221: 663-665) körülvevő egér genom klónból nyert μ erősítő számos promótertől upstream irányban inzertálható.

3) Egy vektor gerincet, ideértve szelektálható markereket (pl. egy neomicin vagy higromicin rezisztens gént) egy *E. coli*-ban levő replikációs origót egy antibiotikum rezisztencia génnel.

4) A poli-Ig receptort kódoló cDNS-at

5) Minden leolvasási kere tben stop kódokat tartalmazó szintetikus oligomert, pl. ACTAGTCTAGACTAGT.

Ilyen vektorok megszerkesztéséhez további részleteket a 11. ábrában biztosítottunk. A pSC-1-hez a cDNS-at a Southern and Berg által leírt (J. Mol. Appl. Gen. 1:227-241 (1982)) pSV-2 expressziós vektorba juttattuk be. A szerkezetre, mint pSV-2-SC1-re utalunk.

A kapott vektort mielőtt sejtekbe transzformáltuk és a sejteket izoláltuk a csonkított poli-Ig receptor hatékony expressziójának kimutatása céljából. Standard elektroporációs technikákat használtunk a transzfekció létrehozásához.

Specifikusan a sejteket a tenyésztő tápközegből gyűjtjük össze (2×10^6 /minta) és lecentrifugáltuk (5×1000 rpm). A sejtek a tenyésztőből 30-70%-os konfluencia állapotban kell kikerüljenek és a tápközeget a megelőző 24 órában ki kellett cserélni. Hűtött hőmérsékleten (jégfürdő) a sejteket elektroporációs tápközeggel mostuk (RPMI 2mM glutamin és 0,5% magzati borjú szérum PenStrp^R-vel). A sejteket megszámoltuk és az elektroporációs tápközegben 2×10^6 /0,75 ml mennyiségben reszuszpendáltuk. Linearizált DNS kb. 45-50 μ l mennyiségét (10 μ g linearizált és 45 μ l foszfát pufferes só-

oldatban reszuszpendált) adtuk a sejtszuszpénzió azonos mennyiségéhez (0,75 ml) az evaporációs küvettában. A küvet-tát 15 percig hagyjuk jégen és az elegyet pulzáljuk. A sejteket ezután kiszélesztjük kondicionált RPMI vagy Eagle-féle tápközegre és szelektáljuk.

A transzfektált mielóma sejtek expresszálják és kiválasztják a csonkitott poli-Ig receptort. Ezzel szemben a mielóma sejtek nem képesek a teljes receptort hasítani és szekretálni. A csönkitott poli-Ig receptort a mielóma tenyészsűrletből izoláljuk és tisztítjuk ammónium szulfátos kicsapatással és gélszűréssel.

Egy különösen előnyben részesített megvalósításban, melyet részletesen az alábbiakban írunk le, a csonkitott poli-Ig receptort egy olyan hibridómában termeljük, melyet a kívánt poli-IgA termelése miatt szelektáltunk.

Egy ilyen rendszerben a csonkitott receptort a poli-Ig-hez kötő kovalens diszulfid kötések az élő sejtekben jönnek létre és a kapott stabil szekréciós Ig-komplext szekretálják. Ez a rendszer akár a mielóma sejtek transzfektációjával hozható létre, melyet fúziós partnerként használunk a poli-Ig termelő B-sejtek örökösen termelővé tételéhez, akár olyan hibridómák transzfektációjával, melyeket már a kívánt poli-Ig termeléshez létrehozta és szkrináltak. Bármelyik esetben a kapott kovalens diszulfid kötés termelődik.

Az SP-20 vagy p3x63/ag 8U.1 mielóma sejtek (ATCC CRL 1581, CRL8287, CRL1597) transzfektációját egy pLK expressziós vektort használva végeztük mely vektorban a poli Ig receptor cDNS transzkripciója a vese MMTV LTR promóter szabályozása alatt áll. Williger et al. J. Virology 60:1-11 (1986).

A hatékony transzkripciót a transzfektált sejtek 10^{-6} M dexamatazonnal legalább 12 óráig tartó stimulálásával értük el.

A stabilizáló protein termelésére való másik rendszer magába foglalja egy a teljes poli-Ig receptort expresszáló expressziós eszköz emlős epitel rögzítés-függő sejtvonalba való transzfektálását, mely monoréteget képez egy pórusos szubsztráton. Egy ilyen előnyös sejtvonala a poli-Ig receptor expresszálása céljából egy vektorral transzformált MDCK sejtvonala, ahogy fent leírtuk. Specifikusan a glükokortikoid LTR_k-t tartalmazó pIK-neo-ScII vektor használható. Más megfelelő monoréteget képző epiteliális gazdasejtek is alkalmazhatók. YA higromicin rezisztens gén beszerezhető, ahogy Bloechliner and Diggelmann leírták Mol. Cell. Biol. 4:2929-2934 (1984).

Általában a transzfektált sejtvonalat egy pórusos szubsztráton, mint pl. kollagénnel bevont szűrőn (pl. transwell szűrők 0,45 μ M, 4,7 cm^2) való monoréteg képzéséig szaporítjuk. Lásd Steele et al., Am. J. Physiol. 251:C126-C139 (1986). A sejtek aszimmetriásak lesznek, egy bazális és egy apikális membránnal fognak rendelkezni. A membránt és a monoréteget úgy helyezzük el, hogy egy tartályt egy bazális és egy apikális tápközegre különítsen el. Mivel a sejtek a bazális tápközegből táplálkoznak ez a tápközeg kell tartalmazza a sejtszaporodás fenntartásához szükséges tápanyagokat. Az apikális oldalon kisebb a tápanyagigény.

Előnyösen a sejtek a rekombináns poli-Ig receptort fogják használni a poli-Ig bazális tápközegből való felvételére és az apikális membránhoz való transzportoz, ahol a receptor enzimatikusan lehasad, mely a stabilizáló proteinhez

kovalensen kapcsolódó stabilizált poli-IgA-t eredményezi.

A poli-IgA-t a bazális tápközegbe ebben a tápközegben levő IgA-t termelő hibridómák tenyésztésével juttatjuk. Másik megoldásként egy elkülönült hibridóma tenyészetből kinyert (pl. affinitási tisztítás) poli-Ig adható a tápközeghez.

A stabilizált poli-IgA ugyancsak affinitás tisztítással vagy más standard antitest szeparálási módszerekkel nyerhető ki az apikális tápközegből. Az apikális tápközeg fenntartható lényegében proteines szennyeződésektől mentesen, hogy egyszerűsítsük a tisztítást.

Az IgA-t termelő hibridómák megszerkesztése és szkrinelése

A találmány egy másik aspektusa a poli-Ig antitestek könnyű létrehozásának és a szelektált fertőzésekkel - különösen azon virális és bakteriális patogének fertőzésével szemben melyek a testbe a nyálkahártya felszínén keresztül jutnak be - szemben védelmet biztosító poli-Ig (különösen az IgA) antitestek szkrinelésének képessége. A találmány ezen aspektusa magába foglalja a spermatozoa felszíni komponenseivel szembeni poli-Ig antitestek létrehozásának valamint olyan antitestek utáni szkrinelés képességét, melyek a terhességgel szemben nyújtanak védelmet. Továbbá magába foglalja az élelmiszer és a légköri eredetű allergének elleni poli-Ig antitestek létrehozását és szkrinelését.

A találmány ezen aspektusában a poli-Ig antitesteket egy ellenőrtött adagolással juttatjuk egy gazdaállatba; pl. poli-Ig-t szekretáló hibridómákat ültetünk be egy gazdaállatba, ahol azok tumorra fejlődnek. Az ezen tumor által ter-

melt és felszabadított poli-Ig belép a keringési rendszerbe és a keringő dimer minoklonális IgA az áteresztő kapillárisokból keresztül jut a nyálkahártya szövetébe, ahol az epiteliális receptorok felismerik és megkötik és a váladékba transzportálódik endogén szekréciónak komponensek hozzáadása mellett. Hibridóma sejtek peritoneális (=hasbélhártya) (ascites=hasvízkór) tumorjai (melyek ismertek) nem kívánatos patológiai változásokat okozhatnak a bélcsatornában és abnormálisan magas nem szekréciónak IgA szintet a beleket körülvevő peritoneális folyadékban. Ennek megfelelően az IgA-t szekretáló tumorok számára előnyös hely szubkután, pl. a hát felső részén található.

Az IgA-t termelő hibridómát egy antigén szintetizáló B limfocita örökké termelővé tételével hozzuk létre, pl. a szájon át vagy a nyálkahártyán keresztül történő immunizálás után gyűjtünk sejteket a Peyer-féle foltokból. Weltzin et al., J. Cell. Biol. 108:1672-1685 (1989). Az IgA-t termelő sejtek örökké termelőkké tételéhez használt mielóma sejteket könnyű beszerezni. Standard fúziós eljárások alkalmazhatók.

Specifikusan, hibridómákat hozunk létre és tesztelünk a specifikus IgA termelésre a következő specifikus példának megfelelően.

Különböző standard módszerek alkalmazhatók az állatok antigén-szintetizáló B sejtek termelésére való készítésére a hibridóma létrehozása céljából. Lásd Weltzin et al. fenti hivatkozását. Egy előnyben részesített módszer az orálisan adagolt antigén hordozójaként hidroxipatit (HA) mikrorészecskék alkalmazását foglalja magába. A nyálkahártya

immunizáláshoz alkalmas antigén-HA konjugátumok előállításí eljárásainak részleteit egy ezzel az alkalmazással azonos időben Amerongen, Neutra, Weitzin és Kræhenbuhl által iktatott közös tulajdonu szabadalmi alkalmazás ir le, melynek címe: HYDROXIAPATITE-ANTIGEN CONJUGATES AND METHODS FOR GENERATING A POLY-IG IMMUNE RESPONSE. Ezt az alkalmazást a hivatkozás révén beépítettük a találmányba.

Az epitéliumon keresztüli transzportra alkalmas HA mikrokristályokat (általában $0,1\ \mu\text{m}$ -nél kisebbek) a telítődésig bevontuk antigénnel és a nyálkahártyán való adagolásra alkalmas hordozóval kevertük össze (pl egy sóoldattal). Egy 25 g-os egér orális immunizálásához egy $200\ \mu\text{l}$ PBS-ben levő fehérje kis mennyiségét (eNgN, $30\ \mu\text{g}$) kevertük pre-szonikált és mosott HA megfelelő mennyiségével (pl. 1 mg HA $30\ \mu\text{g}$ fehérjéhez). A keveréket 1 órán át 4°C hőmérsékleten ráztattuk, majd 2 percig 10000 rpm való mikrofugában centrifugálással pelletizáltuk. A pelletet mossuk és kavargatjuk vagy szonikáljuk $200\ \mu\text{l}$ $0,1\ \text{M}$ vagy kevesebb NaHCO_3 -t (nátrium bikarbonát az gyomorsav semlegesítésére) tartalmazó vízben való reszuszpendálás céljából. Az orális immunizáláshoz az adagolási oldatot beállítjuk a magas sótartalmu körülmények elkerülése céljából, melyek felszabadítják a HA-ból a fehérjét.

Az emlős állatból való nyálkahártya immun válasz kiváltására más megfelelő módszerek ismeretesek a tudomány e területén jártas szakemberek számára és ezek alkalmasak a jelen találmányban való alkalmazásra.

Egy az IgA-t szekretáló hibridómák termelésének speci-

fikus eljárássában PP mononukleáris sejteket izoláltunk egy immunválaszt adó állatból. Specifikusan 8-10 PPs mukózáját és szubmukózáját távolítottuk el és 0,1% kollagenázt tartalmazó teljes RPMI-ben inkubáltuk 1 órán át 37°C hőmérsékleten. A szövetet szétmorzsoztuk steril fagyasztott végű mikroszkóp tárgylemezek két vége között és a felszabadult sejteket kétszer mostuk teljes RPMI-ben. Megközelítően 2×10^7 életképes PP mononukleáris leukocitát nyertünk 1 egérből.

A mielóma sejteket és az egér mononukleáris sejteket kétszer mostuk szérummentes RPMI-ben és 37%-os polietilén glikol 4000-ben (E. Merk, Darmstadt, FRG) fuzionáltattuk 5:1 leukocita:mielóma seitaránynál. A fuzió után a sejteket 1×10^6 sejt/ml értékre hígítottuk teljes RPMI-ben majd 96 üregű szövettenyésztő lemezekre osztottuk szét őket, melyeket 24 órával korábban 2×10^4 besugárzott (800 rad) egér peritoneális váladék sejtekkel oltottunk be üregenként. A hibridómákat hipoxantin-aminopterin és timidin tápközegben standard módszereket használva szelektáltuk.

A célzott kívánt antigének vagy sejtek elleni IgA antitesteket termelő hibridómákat standard szkrinelési módszereket használva azonosítottuk.

A nyert hibridóma sejteket pl. RPMI 1640 tenyésztápközegben szaporítjuk, pelletizáljuk, foszfát.pufferelt sóoldatban reszuszpendáljuk és számoljuk. A sejtsűrűséget $10^6/0,5$ ml értékre állítjuk be. A szuszpendált sejteket (10^6 0,1-0,5 ml-ben) szubkután injektáljuk BALB-C egerek hátának felső részébe. Apró csomók jelennek meg az injektálás után 1-3 héttel. Szérum mintát veszünk a farok véreztetésével, amikor a csomók eléri a becsült 3-5 mm-es átmérőt. ELISA-t

használunk a szérum IgA méréséhez. A becsült hibridómával azonos specifitású váladék IgA-t szintén ELISA-t használva mérjük a bélmucosadékokban és a tejben. Más nyálkahártya váladékok (pl. a száj, orrüreg epiteljei és mirigyei a légzőszervi és genitális rendszerek epitelje) feltételezhetően szintén tartalmazzák a specifikus szekréción IgA-t.

Ezeket a tumor hordozó egereket azután olyan kísérletnek vetjük alá, melyben virális vagy bakteriális patogént juttatunk orálisan vagy más nyálkahártya felszínre, vagy melyekben spermát vagy spermatozoát juttatunk a vaginába. A hasznos IgA-kat szekretáló hibridómákat azokból az egerekből azonosítjuk, melyek védettséget mutatnak a kísérlet során. Ilyen tesztek alkalmazhatók a szekréción IgA-k specifikus azonosításához, melyek a legmegfelelőbbek a passzív védelemhez vagy a fogamzásgátláshoz embernél, vagy más fajoknál (lásd lentebb). Például a megfelelő anti-V. cholerae-t szekretáló hibridómák azonosításában egér ujszülötteket implantálnak a születésük napján a szkrinelés vezetéséhez, mielőtt a z ujszülöttek automatikusan rezisztenciát fejlesztenének ki a kolerával szemben.

A fenti teszt ujszülött védelmi kísérletekhez is adaptálható, melyekben a hibridómákat vemhes BALB/C egerekbe ültetik be a 3 hetes vemhességi idő 1. vagy 2. hetében. A tumor növekedés a vemhesség alatt zajlik és a tumorból származó keringő dimer IgA-t a tejmirigy epitel sejtjei hatékonyan transzportálják és választják ki szekréción IgA-ként a kolosztrumba és a tejbe. Az ujszülöttek születésüktől fogva fogyasztják a SIgA-t. Ahol szükség van az IgA meghosszabbított ideig tartó adagolására, több tejtermelő nőtény al-

kalmazható.

Ha az IgA monoklonális antitesteket védő antitestekként azonosítottuk a fent leírt in vivo kísérletekben, akkor teszteljük védelmi képességüket a nyálkahártya felszínén direkt vagy passzív alkalmazás esetén. Ezekeben a tesztekben a stabilizáló proteinnel együtt vagy anélkül a poli-Ig tenyészetben termeltethető (ahogy fent leírtuk) és a fent felsorolt szervrendszerek nyálkahártya felszínén alkalmazhatók.

A találmány ezen aspektusának egy különösen fontos jellemzője az IgA hatása a recipiens testén kívüli nyálkahártya felszínére. Így az IgA nem kell, hogy immunológiai-lag kompatibilis legyen a recipiens rendszerével, csupán el kell érje a recipiens nyálkahártya felszínét és hatékonyan blokkolnia kell a patogének bejutását.

A találmány különösen hasznos a Pseudomonas aeruginosa, Hemophilus influenzae, Vibrio cholerae, Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Salmonella typhi és typhimurium, Clostridium perfringens és más enterikus kósztridiumok, Shigella dysenteriae, Shigella flexnerii, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas, Entameba histolytica, Giardia lamblia, Streptococcus, respirációs "syncytial" vírus, rotavírus, reovírus Humán Immunodeficiency Virus, Humán T-sejt Limfotróf Vírus I-es és II-es típus, polio vírus, Rhinovírus influenza vírus, herpes vírusok, humán papilloma vírus, AIDS 2^o patogének mint pl. a Pneumocystis, és élesztők, mint pl. a monília elleni védekezésben. A találmány hasznos a respirációs vagy emésztőrendszer nyálkahártya felszíneivel kapcsolatba lépő allergének elleni védekezésben is. Hasznos a kereszt-

kötődésű spermatozoa által okozott terhesség ellen a vaginában és ezek cervixen és méhen keresztüli mozgásának megakadályozásában.

Minden esetben egy megfelelő ismert antigént - pl. a teljes patogént vagy **specifikus külsőleg jelen levő antigéneket**, mint pl. a vírus burok fehérjét vagy bakteriális sejt felszíni proteineket, pilus fehérjét, lipopoliszacharidokat, virális kapszidot vagy köpenyfehérjét, protozoa plazma membránokat, plazma membrán felszíni összetevőt, spermatozoa felszín fehérjét, vagy respirációs allergéneket - használunk. Toxoidok, pl. CRM-197 és inaktivált Uchida et al. J. Biol. Chem. 24 : 833- 844 (1973) által leírt diphtheria toxin is alkalmazható. Az antigént a fent leírt eljárás szerint alkalmazzuk a kívánt védő antitesteket szekretáló hibridómák létrehozása céljából. Csak néhány példaként a WO88/08437 (a hivatkozás révén beépítettük) egy az anti-V. cholerae monoklonális poli-Ig antitestek termelésére alkalmas tcPA pilus fehérjét ír le. Az US Pat. 4,725,669 az anti HIV poli-Ig monoklonális antitestek termelésére alkalmas HIV (HTLV-IU) köpeny glükoproteint írja le. A következő szabadalmak és szabadalmi alkalmazások a Streptococcus fertőzés, különösen a Streptococcus B csoport elleni védekezésre szolgáló antigének előállítását írják le: US Pat. 4,367,221; 4,367,222; 4,367,223; 4,356,263; 4,207,414 (RE 31,672); és WO 87/06267.

Egy a V. cholerae lipopoliszacharid ellen alkalmas IgA monoklonális antitestet a 2D6 ATCC-nél (Rockville, MD) HB10420 katalógusszámon deponált hibridóma termeli.

Más alkalmas antigének a Bacterial Vaccines and Local Immunity Proceedings of the Sclavo International Conf.,

Siena, Italy 17-19 Nov. 1986-ban kerültek leírásra. A HIV antigénekhez megfelelő specifikus reagenseket az AIDS Research and Reference Reagent Program National Institute of Health 1989 júniusában írták le. Például a gp120-at a Microgene Sys. Inc. árulja. Spermatozoa sejt-felszín antigének, mint az LDH-C4 szintén ismertek. Lásd pl. Shaha et al és Talwar et al., Vaccine 7:97-100 (1989) és Shaha et al. Int. J. Androl. 11:479 (1988).

A találmány alkalmazásához az antigének szelekciójában különösen fontos az, hogy a nyálkahártya védelembe beletartozik a kereszt kötés, a testbe való bejutás kivédése és ez a mechanizmus nem igényli, hogy a polimer antitest elpusztítsa vagy semlegesítse a patogént. Ezzel szemben a szisztémás ((IgG; védekezés olyan kötést jelent, mely ahhoz, hogy hatékony legyen általában semlegesítenie kell a patogént. Így nem minden a patogénhez kötődő IgG antitest védő hatású, ahogy azt a specifikusan Vibrio cholerae kötő de azt nem semlegesítő - olyan értelemben, hogy véd a megtelepedéstől, szaporodástól és a gazdában manifesztálódó klinikai tünetektől - monoklonális antitest létezése illusztrálja. A védő hatású IgA antitestek termelésére felhasználható antigének és determinánsok köre így jelentősen megnőtt.

Passzív védelem

A protektív poli-Ig monoklonális antitesteket kiválasztóként a fent leírt módszerrel azonosított hibridómákat ismert technikákkal tenyésztjük és az antitestet pl. specifikus immunoabszorpcióval szeparáljuk és kinyerjük.

A csonkitott Ig receptor komplexet akár a fent leírtak szerint egy expressziós vektorral transzformált hibridómával biztosítjuk, akár úgy, hogy az Ig receptort külön expresszáljuk és a fent leírt monorétegű tenyésztési technikával hozzáadjuk a monoklonális antitesthez.

A kapott stabilizált monoklonális antitestet passzív vakcinává alakítjuk, melyet közvetlenül a nyálkahártya felszínre alkalmazunk, melyet valószínűleg a kérdéses patogén is megtámad.

A komplex alkalmazásának specifikus szállítója és utja a patogéntől függően változik. Az orális alkalmazást általában puffertolt sóoldattal vagy kapszulázással végezzük, hogy védjük a komplexet a gyomorsav és pankreatikus proteázokkal szemben, ha kívánatos. A nazális alkalmazást aeroszol formájában végezzük. Az okuláris alkalmazás sóoldattal történik. A genitális vagy rektális alkalmazáshoz gélt használunk, habokat vagy kupot.

A tudomány e területén jártas szakember tudja, hogyan kell az ismert eljárásokkal ilyen eszközöket formulázni.

Aktív vakcinálás

Hidroxiapatithoz kapcsolódó antigének, mint a hibridóma fuzió partner sejtek donorainak provokálására fent leírtuk, szintén alkalmazhatók az aktív vakcinálásban. Specifikusan a kapcsolt antigént közvetlenül alkalmazzuk a nyálkahártya szövetére akár orálisan (kapszulát vagy más hordozót használva) akár nazálisan (aeroszollal), rektálisan vagy vaginálisan (kuppal vagy más eszközzel).

Deponált törzsek

Az alkalmazás engedményese, a Harvard College Elnöke és és kutatói kijelentik, hogy a fent bemutatott deponált törzseket az ATCC 40787 és HB10420 a Budapesti Szerződés és az American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, feltételeinek megfelelően készítették. Továbbá kijelentik, hogy az ATCC olyan letéteményes, aki biztosítja a deponált törzsek folytonosságát és könnyű hozzáférhetőségét az igénylő számára, a szabadalom megadása esetén. A deponált anyag hozzáférhetőségének összes korlátozása visszavonhatatlanul megszűnik, ha a szabadalmat megadják. Az anyag hozzáférhető a szabadalmi alkalmazás érvényessége idején azon személy számára, akit a Commissioner kinevez a 27 C.F.R. 1.15 és a 35 U.S.C. 122 alapján. A deponált anyagot legalább 5 éves időtartamig tartják fenn a deponált mikroorganizmusok mintáinak legutolsó kikérését követően és bármely esetben legalább harminc (30) évig a deponálás idejétől vagy a szabadalom érvényességi ideje alatt, mely lehet ennél hosszabb időszak is. Az alkalmazás engedményese elismeri azt a kötelezettségét, hogy pótolja a deponált anyagot abban az esetben, ha a letéteményes szerv nem tud eleget tenni a minta igénylésének a deponálási körülmények következtében.

A további megvalósulások a következő igénypontok keretein belül vannak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy alapvetően izolált komplex azzal jellemezve, hogy
a) egy szelektált antigén vagy antigének családjával szemben specifikus poli-Ig; és

b) egy rekombináns stabilizáló fehérje, mely tartalmazza egy poli-Ig receptor egy poli-Ig kötő doménjét, az említett stabilizáló fehérje alapvetően nem rendelkezik semmilyen C-terminális transzmembrán és intracelluláris poli-Ig receptor doménnel;

az említett komplex proteolitikus stabilitással jellemezett a nem komplex poli-Ig-hez viszonyítva, az említett komplex továbbá a poli-Ig specifikus kötő és immunoprotektív kereszt-kötődő tulajdonságaival jellemezett.

2. Egy alapvetően izolált komplex azzal jellemezve, hogy
a) egy szelektált antigénre vagy antigének családjára specifikus monoklonális poli-Ig és

b) egy stabilizáló fehérje, mely a poli-Ig receptor egy poli-Ig kötő doménjét tartalmazza, az említett stabilizáló fehérje alapjában véve nem rendelkezik semmilyen C-terminális transzmembrán és intracelluláris poli-Ig receptor doménnel,

az említett komplex proteolitikus stabilitással jellemezett a nem komplex poli-Ig-hez viszonyítva, az említett komplex továbbá a poli-Ig specifikus kötő és immunoprotektív kereszt-kötődő tulajdonságaival jellemezett.

3. A 2. igénypont szerinti alapvetően izolált komplex

azzal jellemzve, hogy ebben a stabilizáló fehérje egy rekombináns fehérje.

4. Az 1., 2., és 3. igénypontok alapján véve izolált komplexe azzal jellemezve, hogy ebben az említett poli-Ig és az említett stabilizáló fehérje diszulfid kötésekkel kovalensen kapcsolódik.

5. Az 1. vagy 2. igénypontok alapján véve izolált komplexe azzal jellemezve, hogy abban az említett poli-Ig poli-IgA osztályu antitest.

6. Az 1. vagy 2. igénypontok alapján véve izolált komplexe azzal jellemezve, hogy ebben az említett stabilizáló fehérje a poli-Ig receptor I-es doménjét és a IV és V-ös domének legalább egyikét tartalmazza és az említett poli-Ig stabilizáló csonkitott, lényegében a VI-os domén deléciója céljából.

7. A 6. igénypont alapján véve izolált komplexe azzal jellemezve, hogy ebben az említett stabilizáló fehérje továbbá úgy jellemezhető, hogy az említett I-es domént az említett IV-es vagy V-ös doméntől olyan távolságba helyezzük, mely megfelel kb 100-500 aminosav szekvenciának.

8. Az 1. vagy a 2. igénypontok szerinti meghatározás azzal jellemezve, hogy a komplex egy a Pseudomonas aeruginosa, Hemophilus influenzae, Vibrio cholerae, Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli,

Salmonella typhi és typhimurium, Clostridium perfringens és és más enterikus klosztridiumok, Shigella dysenteriae, Shigella flexnerii, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas, Entameba histolytica, Giardia lamblia, Streptococcus, respirációs syncytial vírus, rotavírus, reovírus, Humán Immundeficiency Virus, Humán T-sejt limfotróf vírus I-es és II-es típusok, polio vírus, Rhinovírus, influenza vírus, herpesz vírusok, humán papilloma vírus, Pneumocystis, élesztők és spermatozoa antigénjeit tartalmazó csoportból szelektált antigénre specifikus monoklonális IgA antitestet tartalmaz.

9. Rekombináns poli-Ig stabilizáló fehérje azzal jellemezve, hogy tartalmazza a poli-Ig receptor egy poli-Ig kötő doménjét. az említett stabilizáló fehérje tulajdonképpen nem rendelkezik semmilyen C-terminális transzmembrán és intracelluláris poli-Ig receptor doménnel az említett stabilizáló fehérje olyan tulajdonságokkal rendelkezik, hogy komplexet képez a poli-Ig-vel, mely proteolitikusan stabil és a poli-Ig immunoprotektív kereszt kötődő tulajdonságaival rendelkezik.

10. Módszer a 4. igénypont szerinti komplex előállítására azzal jellemezve, hogy:

a) biztosítunk egy manipulált sejtet az említett stabilizáló fehérje termelése céljából, az említett sejt képes az említett szelektált antigénekre vagy antigének családjára specifikus monoklonális poli-Ig termelésére is.

b) az említett sejtet az említett komplex termelése

céljából tenyésztjük, és

c) az említett komplexet kinyerjük.

11. Eljárás a 2. igénypont szerinti komplex előállítására, melyben az említett poli-Ig és az említett stabilizáló diszulfid kötésekkel kovalensen kapcsolódik, azzal jellemezve, hogy:

poli-Ig receptorok termelésére manipulált rögzítés függő epiteliális sejteket biztosítunk

az említett epiteliális sejteket olyan körülmények között szaporítjuk, hogy az említett sejtek egy porusos anyagon monoréteget képeznek. az említett porusos anyag és a képződő monoréteg elkülöníti a monoréteg bazális oldalán levő első tápközeget a monoréteg apikális oldalán levő második tápközegtől,

a monoréteg bazális oldalához monoklonális IgA-t juttatunk,

a monoréteg apikális oldaláról az említett komplexet kinyerjük.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy ebben az említett első tápközeg az említett epiteliális sejtek szaporodásának elősegítésére alkalmas nutrient tápközeg.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a második tápközeg alapjában véve az említett komplex kinyerését befolyásoló fehérjéket nem tartalmaz.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett monoklonális IgA-t az első tápközeghez adjuk a hibridóma sejtek említett első tápközegben való együtt-tenyésztésével.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy ebben az említett monoklonális IgA-t először hibridóma tenyészetben termeljük, majd az említett tenyészetből szeparáljuk és ezek után az említett első tápközeghez adjuk.

16. Eljárás a monoklonális poli-Ig vizsgálatára a patogénnek vagy a terhesség elleni védelem in vivo meghatározása céljából azzal jellemezve, hogy:

a) az említett monoklonális poli-Ig-t egy a patogénnel szemben fogékony emlős keringésébe juttatjuk,

b) az említett emlős nyálkahártya váladékát a poli-Ig-re vizsgáljuk,

c) az említett emlős nyálkahártya felszínét az említett patogénnel vagy spermatozoával provokáljuk,

d) a patogénnel vagy spermatozoával való provokálással szembeni védelmet meghatározzuk.

17. A 16. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy abban a monoklonális poli-Ig-t az emlősbe injekcióval vagy infúzióval a keringésbe juttatjuk.

18. A 16. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy abban a monoklonális poli-Ig-t az emlősbe egy a monoklonális poli-Ig-t termelő tumor vagy egy tumorképző sejt

szubkután implantációjával juttatjuk be.

19. Eljárás egy emlős patogénnel vagy terhességgel szembeni védelmére azzal jellemezve, hogy az 1-3 igénypontok bármelyikének komplexét az említett emlős nyálkahártyájának felszínére juttatjuk.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a komplexet orálisan, nazálisan vaginálisan, rektálisan okulárisan vagy a középfülbe adjuk.

21. A 19. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett komplexet egy első emlős nyálkahártya váladékában biztosítjuk és az említett nyálkahártya váladékot egy második emlősnek adjuk.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy orálisan adjuk az első emlősből származó, az említett komplexet tartalmazó tejet egy második emlősnek.

23. A 21. vagy 22. igénypontok szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy biztosítunk egy örökké poli-Ig-t termelő sejtet, az említett poli-Ig-t az első emlős keringésébe juttatjuk és az első emlősből összegyűjtjük a nyálkahártya váladékot.

24. Eljárás egy monoklonális poli-Ig antitestet termelő hibridóma létrehozására azzal jellemezve, hogy egy antigénnel provokálunk egy emlőst, kinyerünk egy limfoid sej-

tet a Peyer-féle folt nyálkahártyájából vagy az emlős limfoid szövetben gazdag más nyálkahártyájából és a limfoid sejtet egy mielóma sejthez fuzionáljuk a hibridóma létrehozása céljából.

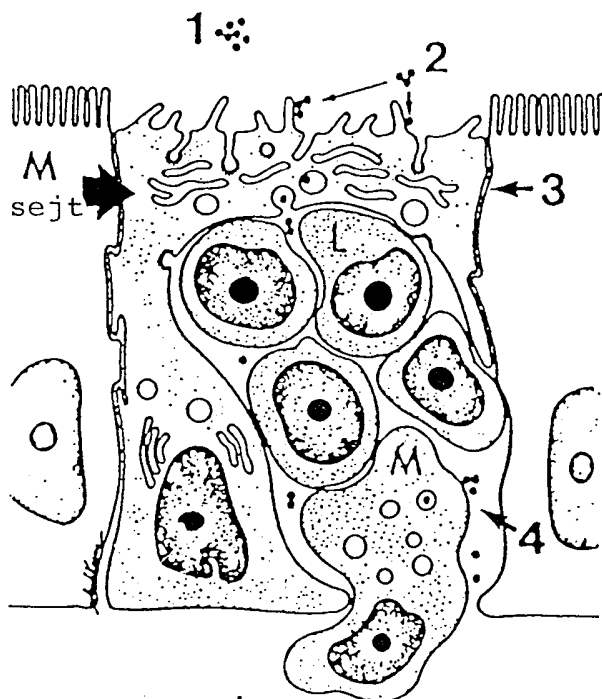
25. A 24. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy abban az emlőst az antigén ezen emlős nyálkahártya felületére való adagolásával provokáljuk.

ügyvédi és Szabados Iroda
1061 Budapest,
Dózsa u. 10.
Telefon 153-3733, 131-4200

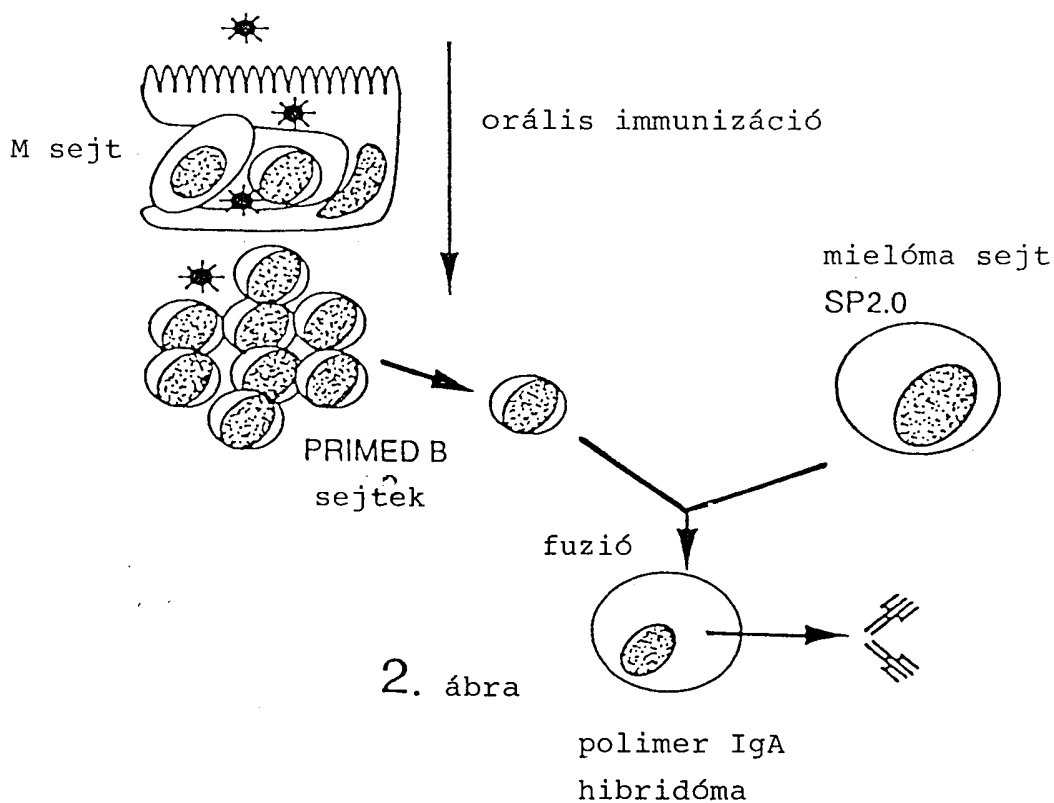
38 oldal
+ 17 ábracsoport

55 oldal

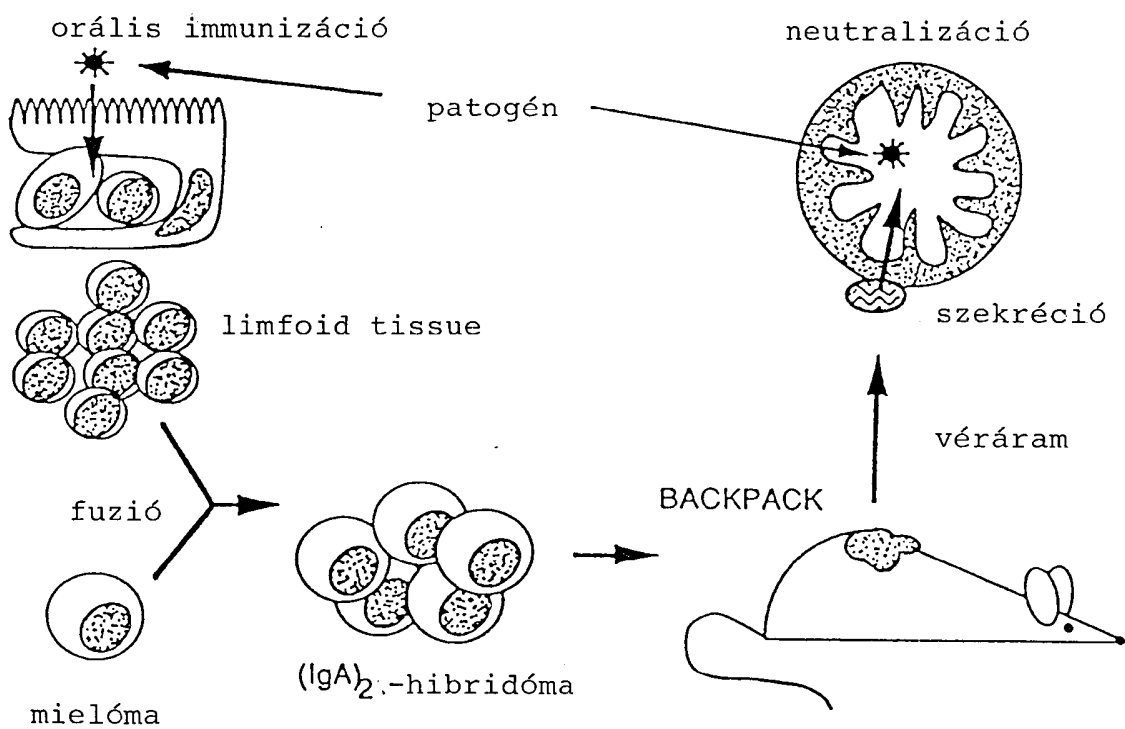
Dr. J. R. R. R.



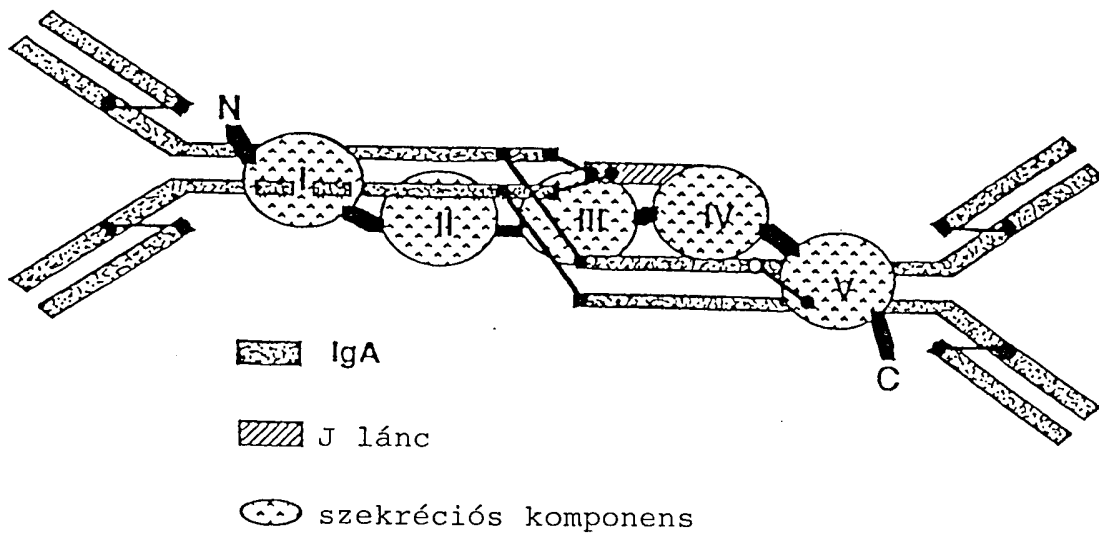
1. ábra



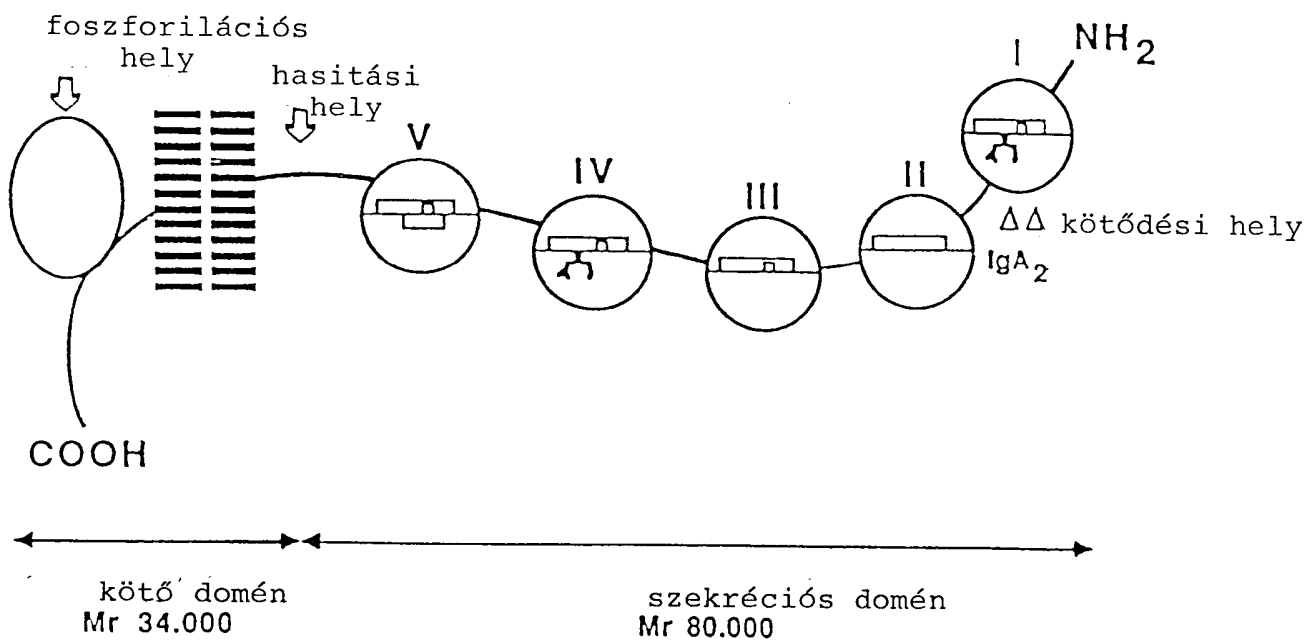
2. ábra



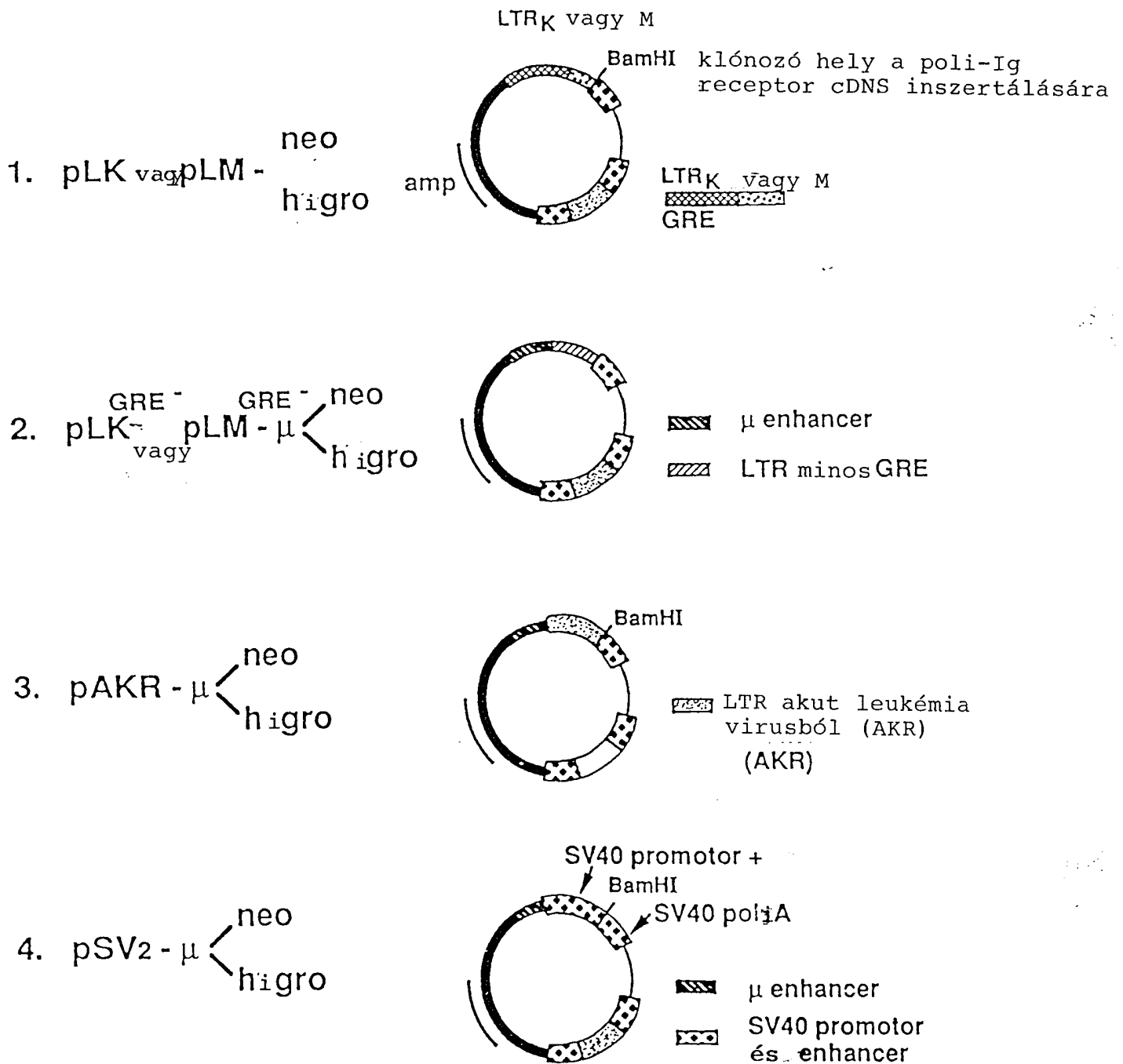
3. ábra



4. ábra



5. ábra

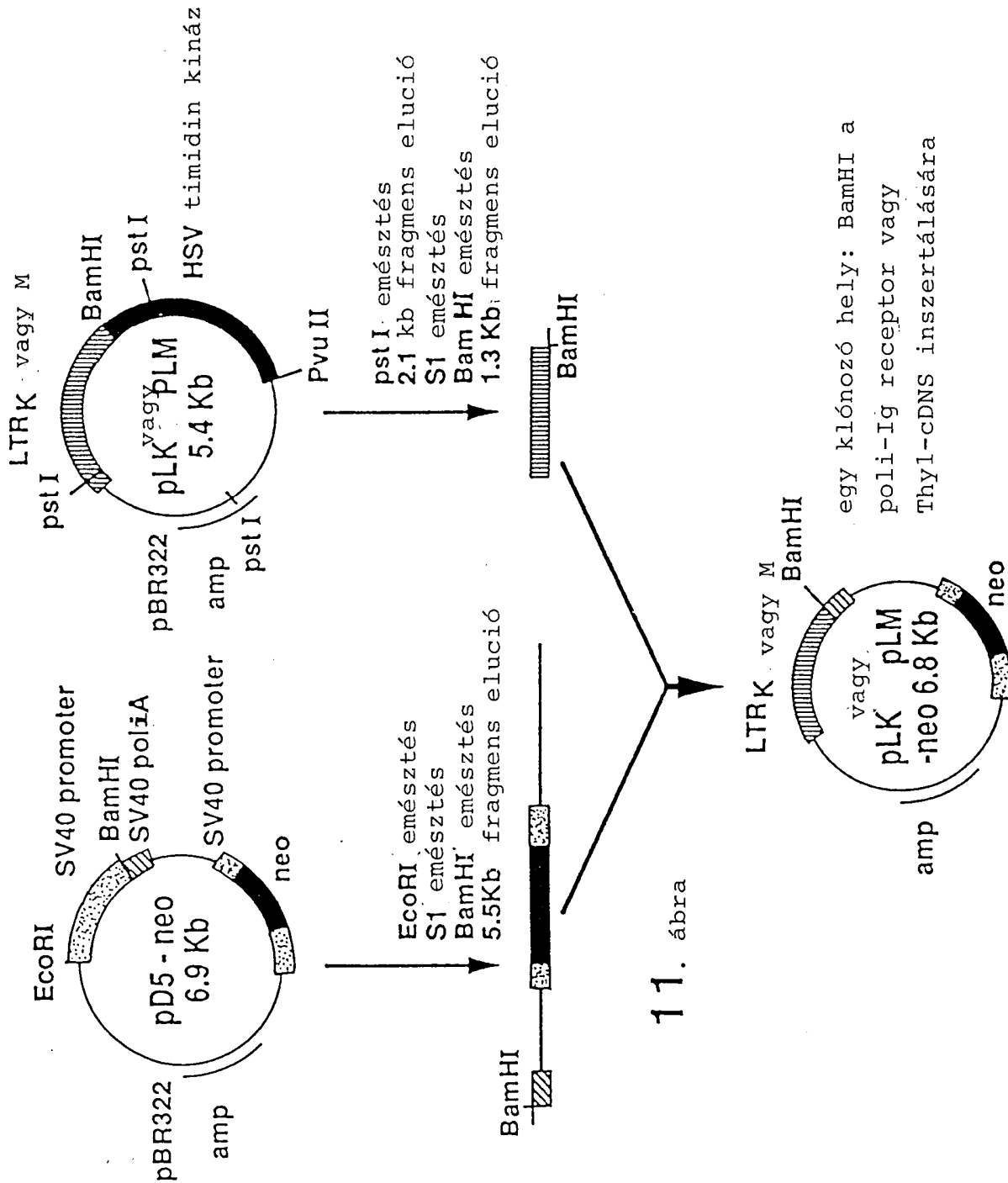


SV40 promotor + poliA hely

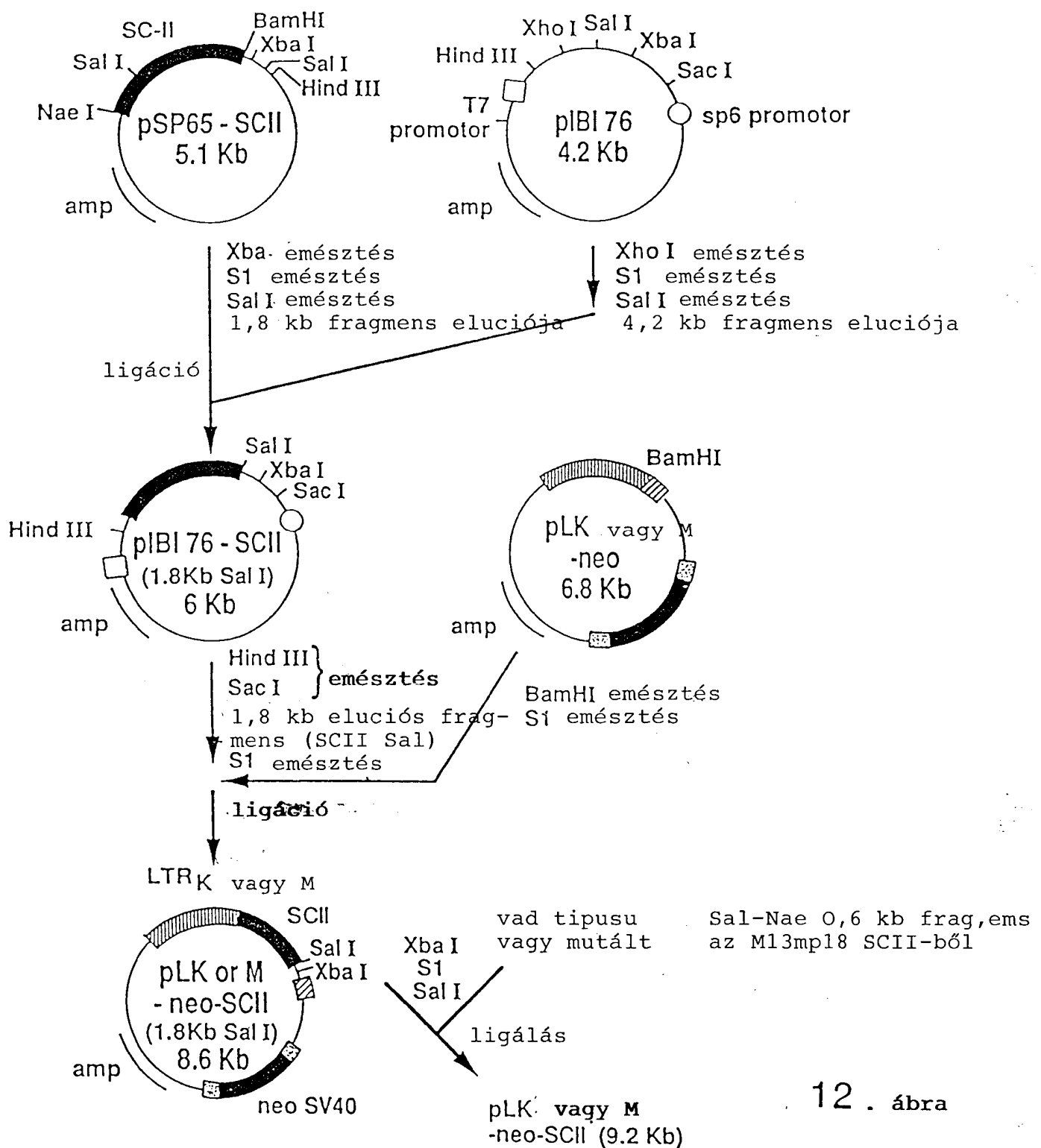
szelektálható marker (higro vagy neo)

pBR322 (amp rezisztencia, replikációs origó)

10. ábra

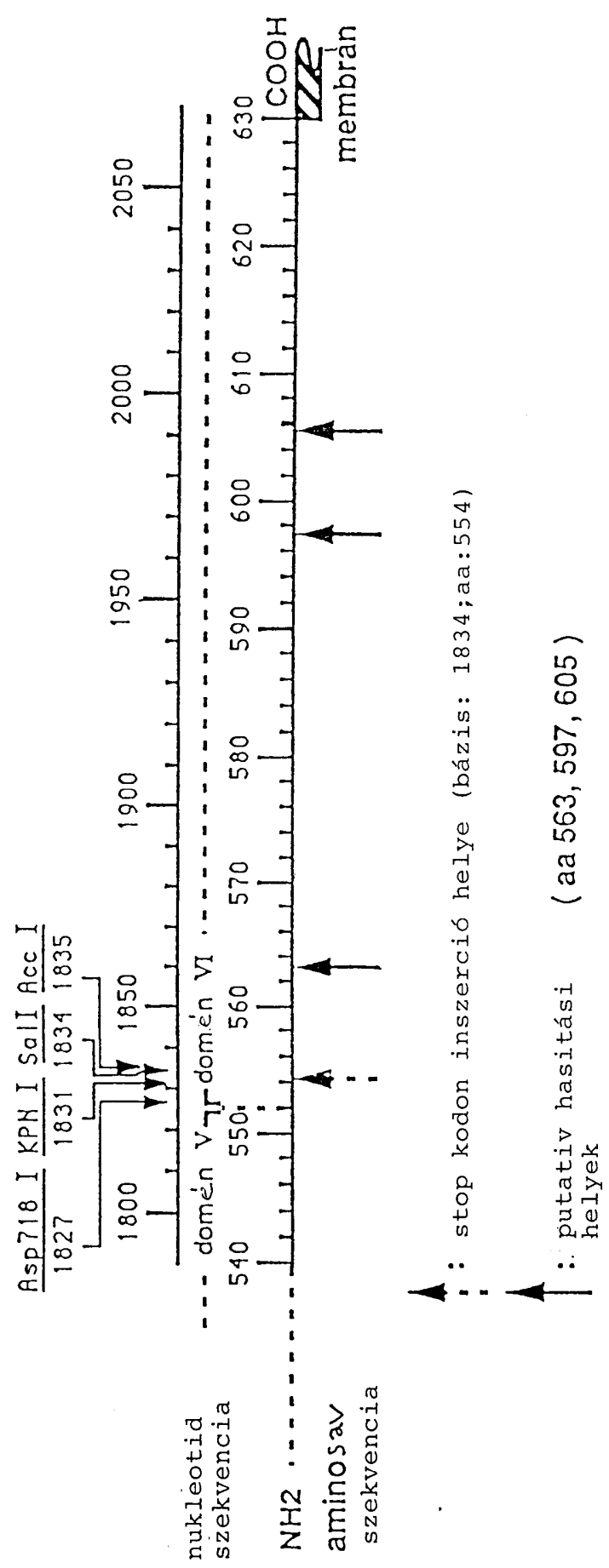


11. ábra



12. ábra

Thy I cDNS vagy kimer Thy-poli Ig receptor cDNS inszertálása
pLK vagy pLM-neo BamHI helyére



13 . ábra



CUGUGCCCCCGAGUCCGGUCAGCAGGAGGGGAAGAGUGGGCCUAAAUCUCUCCCGCAUCGGCAGCCAGGCCCUA
-18 -1
MetAlaLeuPheLeuLeuThrCysLeuLeuAlaValPheSerAlaAlaThrAla 177
GUGCCCUACCAAGCCACAGCCAUUCUUGCUCACCCUGCCUGGCGUGUUUUCAGGGCCACGGCA
+1 10 20
GlnSerSerLeuLeuGlyProSerSerIlePheGlyProGlyGluValAsnValLeuGluGlyAspSerValSer
CAAAGCUCUUUUUGGGUCCAGCUCUAAUUUGGUCUCCCGGGAGGUGAAUUGUUUGGAAGGCCGACUCGGUGUCC
● 30 40 50
IleThrCysTyrProThrThrSerValAsnArgHisSerArgLysPheTrpCysArgGluGluGluSerGly
AUCACAUGCUACUACCCAAACCCUCCGUCACCCCGGCACAGCCGGAGUUCUGGUGCCGGGAAGAGGAGAGCGGC 327
51 60 70
ArgCysValThrLeuAlaSerThrGlyTyrThrSerGlnGluTyrSerGlyArgGlyLysLeuThrAspPhePro
CGGGGCGUGACGCUUGCCUGACCCGGGCUACACGUCUCCAGGAAUACUCCGGGAGAGGCAAGCUCACCGACUUCUCCU
80 90 100
AspLysGlyGluPheValThrValAspGlnLeuThrGlnAsnAspSerGlySerTyrLysCysGlyValGly
GAUAAAGGGGAGUUUGUGGUGACUGUUGACCAACUCACCCAGAACGACUCAGGGAGGCUACAAGUGUGGCGUGGGA 477
101 110 120
ValAsnGlyArgGlyLeuAspPheGlyValAsnValLeuValSerGlnLysProGluProAspAspValValTyr
GUCAACGGCCGUGGGCCUGGACUUCGGUGUGUACACGUGCUGGUCAGCCAGAAAGCCAGAGCCUGAUGACGUGUUUUUAC
130 140 150
LysGlnTyrGluSerTyrThrValThrIleThrCysProPheThrTyrAlaThrArgGlnLeuLysLysSerPhe
AAACAUAUGAGAGUUUAACAGUAACCAUCCUUGCCUUUUCACAUUGCGGACUAGGGCAACUAAAAGAGUCCUUU 627

6A

151 160 170
TyrLysValGluAspGlyGluLeuValLeuIleIleAspSerSerLysGluAlaLysAspProArgTyrLys
UACAAGGUGGAAGACGGGGAACUUGUACUCAUUAUCCAGCAGAAAGGAGGCAAGGACCCAGGUUAUAAAG
180 190 200
GlyArgIleThrLeuGlnIleGlnSerThrThrAlaLysGluPheThrValThrIleLysHisLeuGlnLeuAsn
GGCAGAAUACGUGGAGAUCCAAAGUACCAAGACGCAAAAGAAUUCACAGUACCAUCAAGCAUUUGCGCUCUCAAU 777
201 210 220
AspAlaGlyGlnTyrValCysGlnSerGlySerAspProThrAlaGluGluGlnAsnValAspLeuArgLeuLeu
GAUGCUGGGCAGUAUGUCUGCCAGAGUGGAAGCGACCCCAACUUGAAAGACAGAAACGUAUAGACCCUCCACUUGCUA
230 240 250
ThrProGlyLeuLeuTyrGlyAsnLeuGlyGlySerValThrPheGluCysAlaLeuAspSerGluAspAlaAsn 927
ACUCCUGGUCUGCUCUAUGGAAACCUUGGGGGGCUCCGGUGACCUUUGAAUUGUGCCUUGGACUCUGAAGACGCAAAAC
251 260 270
AlaValAlaSerLeuArgGlnValArgGlyGlyAsnValValIleAspSerGlnGlyThrIleAspProAlaPhe
GUGGUAAGCAUCCUUGCGCCAGGUUAGGGUGGCAAUUGUGGUCUUAUUGACAGCCAGGGGACAAUAGAUCACGACCUUC
280 290 300
GluGlyArgIleLeuPheThrLysAlaGluAsnGlyHisPheSerValValIleAlaGlyLeuArgLysGluAsp
GAGGGCAGGAUCCUGUUCACCAAGGCUGAGAACGGCCACUUCAGUGAGUGAUCGAGGCCUGAGGAAAGGAGAC 1077
301 310 320
ThrGlyAsnTyrLeuCysGlyValGlnSerAsnGlyGlnSerGlyAspGlyProThrGlnLeuArgGlnLeuPhe
ACAGGGAACUAUCUGUGCGGAGUCCAGUCCAAUUGGUCAGUCUGGGGAUUGGGCCACCCAGCUUCGGCAACUCUUC
330 340 350
ValAsnGluGluIleAspValSerArgSerProProValLeuLysGlyPheProGlyGlySerValThrIleArg
GUCAAUGAAGAGAUCCGUGUCCCCCGAGCCCCCUGUGUUGAAGGGCUUUCAGGAGGCUCCGUGACCAUACGC 1227

6B

1719

351 360 370
 CysProTyrAsnProLysArgSerAspSerHisLeuGlnLeuTyrLeuTrpGluGlySerGlnThrArgHisLeu
 UGCCCCUACAACCCGAGAGAGAGCGACAGCCACCUGCAGCGUGUAUCUCUGGGGAGGAGUCAACCCGCCAUCUG
 380 390 400
 LeuValAspSerGlyGluGlyLeuValGlnLysAspTyrThrGlyArgLeuAlaLeuPheGluGluProGlyAsn
 CUGGUGGACAGCGGCGAGGGGCGUGGUUCAGAAAGACUACACAGGCGAGGCGGCCCCUGUUCGAGAGGCCUGGCAAU 1377
 401 410 420
 GlyThrPheSerValValLeuAsnGlnLeuThrAlaGluAspGluGlyPheTyrTrpCysValSerAspAsp
 GGCAACCUUCACAGUCGUCCUCAACCGAGCUCACUGCCGAGGAUGAAGGCUUCUACUGGUGUGUCAGCGAUGACGAU
 430 440 450
 GluSerLeuThrThrSerValLysLeuGlnIleValAspGlyGluProSerProThrIleAspLysPheThrAla
 GAGUCCCGACGACUUCGGUGAGGAGCUCAGAUUGUAGCGGAGAACCAAGCCCCACGAUCGACAAAGUUCACUGCU 1527
 460 470
 ValGlnGlyGluProValGluIleThrCysHisPheProCysLysTyrPheSerSerGluLysTyrTrpCysLys
 GUGCAGGGAGAGCCUGUUGAGAUACCCUGCCACUCCCAUGCAAAUACUUCUCCCGAGAGAAUACUGGUGCAAG
 480 490 500
 TrpAsnAspHisGlyCysGluAspLeuProThrLysLeuSerSerSerGlyAspLeuValLysCysAsnAsn
 UGGAAUGACCAUGGCGGAGGAGCCGCCCACUAAGCUCAGCUCAGCGGCGACCUUGUGAAUAGCAACAAC 1677
 510 520
 LeuValLeuThrLeuThrLeuAspSerValSerGluAspAspGlyGlyTrpTyrTrpCysGlyAlaLysAspGly
 CUGGUCCUCACCCUGACCCUUGGACUCGGUCAGCGAAGAGUAGCAGGGGCUUGGUACUGGUGGCGCGAAGACGGG
 530 540 550
 HisGluPheGluGluValAlaAlaValArgValGluLeuThrGluProAlaLysValAlaValGluProAlaLys
 CACGAGUUUGAAGAGGUUGCGGCCGUCAGGGUGGAGCUGACAGAGCCAGCCAAAGGUAGCUGUCGAGGCCAGCCAAAG 1827

6C

1860

17/10

551 560 570 ●
ValProValAspProAlaLysAlaAlaProAlaGluGluLysAlaLysAlaArgCysProValProArg
GUACCUGGACCCAGCAAGGAGCCCGCCGCGCUGCUGAGGAGAAAGGCCAAGGCCGCGGUGCCAGUGCCAGG
580 590 600
ArgArgGlnTrpTyrProLeuSerArgLysLeuArgThrSerCysProGluProArgLeuLeuAlaGluVal
AGAAGGCAGUGGUACCCAUUGUCAAGGAAGCUGAGAAACAAGUUGCCAGAACCCUGGCCUUCUUGCGGAGGAGGUA 1977
601 610 620
AlaValGlnSerAlaGluAspProAlaSerGlySerArgAlaSerValAspAlaSerSerAlaSerGlyGlnSer
GCAGUGCAGAGUGCGGAAGACCCAGCCAGUGGGAGCAGAGCGUCUGUGGAUGCCAGCAGUGCUUCGGGACAAAGC
630 640 650
GlySerAlaLysValLeuIleSerThrLeuValProLeuGlyLeuValLeuAlaAlaGlyAlaMetAlaValAla
GGAGUGCCAAAGUACUGAUCUCCACCCUGGUGCCCUUGGGGCGUGGUGCGGAGCGGGGCCCAUGGCCGUGGCCC 2127
651 660 670
IleAlaArgAlaArgHisArgArgAsnValAspArgValSerIleGlySerTyrArgThrAspIleSerMetSer
AUAGCCAGAGCCCGGCACAGGAGGAACGUGGACCGAGUUUCCAUUCGGAAGCUACAGGACAGACAUAUAGCAUGUCA
680 690 700
AspLeuGluAsnSerArgGluPheGlyAlaIleAspAsnProSerAlaCysProAspAlaArgGluThrAlaLeu
GACUUGGAGAACUCCAGGGAGUUCGGAGCCAUUGACAACCCAGCGCCUGCCCGAUGCCCGGGAGACGGCCUC 2277
701 710 720
GlyGlyLysAspGluLeuAlaThrAlaThrGluSerThrValGluIleGluGluProLysLysAlaLysArgSer
GGAGGAAAGGAUGAGUAGCGACGGCCACCCGAGAGCACCGUGGAGAUUGAGGAGCCCAAGAGGCAAAACGGUCA
730 740 750
SerLysGluGluAlaAspLeuAlaTyrSerAlaPheLeuLeuGlnSerAsnThrIleAlaAlaGluHisGlnAsp
UCCAAAGGAAGAGCCGACCCUGGGCCUACUCAGCUUUCUGCUCCAAUCCAACACCAUAGCUGCUGAGACCAAGAU 2427

6D


```

(-18)          (-1)
|              |
1 - MALFLLTCLLAVFSAATAQSSLLGPSSIFGPGEVNVLEGDSVSITCYIPT -50
   .....
2 - MALFLLTCLLAVFSAATAQSSLLGPSSIFGPGEVNVLEGDSVSITCYIPT -50

1 - TSVTRHSRKFWCREEESGRCVTLASTGYTSQEYSGRGKLTDFPDKGEFVV -100
   ...
2 - TSVNRHSRKFWCREEESGRCVTLASTGYTSQEYSGRGNLTDFPEKGEFVV -100

1 - TVDQLTQNDSGSYKCGVGNGRGLDFGVNVLVSQK----- -135
   : .....
2 - YLNRLSQSDSGSYKCGVGNGRGLDFGVNVLVSQKXXXXXXXXXXXXXXXXX -150

1 - ----- -135
2 - XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX -200

1 - -----PEPDDVYKQYESYTVTITCPFTYATRQLKKSFYK -170
2 - XXXXXXXXXXXXXXX----- -215

1 - VEDGELVLIIDSSSKEAKDPYKGRITLQIQSTTAKEFTVTIKHLQLNDA -220
   .....
2 - -----QLSDA -220

1 - GQYVCQSGSDPTAEEQNVDLRLLLTPGLLYGNLGGSVTFECALDSEDANAV -270
   : .....
2 - GHYVCQSGRNPTAEDQNVDLRLLLTPDVLGNLGGSVTFECALDSEEAKQV -270

1 - ASLRQVRGGNVVIDSQGTIDPAFEGRILFTKAENGHFSVVIAGLRKEDTG -320
   .....
2 - ASLRQVRGGNVVIDSQGTIDPAFEGRILFTKAENGHFSVVIAGLRKEDTG -320

1 - NYLCGVQSNQSGDGPTQLRQLFVNNEIDVSRSPVLKGFPGGSVTIRCP -370
   .....
2 - NYLCGVQSNQSGDGPTQLWQLFVNNEIDVSRSPVLKGFPGGSVTIRCP -370

1 - YNPKRSDSHLQLYLWEGSQTRHLLVDSGEGLVQKDYTGRLALFEEPGNGT -420
   .....
2 - YNPKKSDSHLQLYLWEGSQTRHLLVDSGEGLVQKDYTGRLALFEEPGNGT -420

1 - FSVVLNQLTAEDEGEFYWCVSDDDES LTTSVKLQIVDGEPSPTIDKFTAVQ -470
   .....
2 - FSVVLNQLTAEDEGEFYWCVSDDDES LTTSVKLQIVDGEPSPTIDEFTAVQ -470

1 - GEPVEITCHFPCKYFSSEKYWCKWNDHGCEDLPTKLSSSGDLVKCNNNLV -520
   .....
2 - GEPVEIACHFPCKYFSSEKYWCKWNDHGCEDLPTKLSSSGDLVKCNNNLV -520

1 - LTLTLDVSVSEDEGWYWCGAKDGHEFEEVA AVRVELTEPAKVAVEPAKVP -570
   .....
2 - LTLTLDVSVSEDEGWYWCGAKDGHEFEEVA AVRVELTEPAKVAVEPAKVP -570

1 - VDPKAAPAPAEK -584
   .....
2 - VDPKAAPAPAEK -584

```

8A

8 B

8C

1 10 20 30 40
 | | | | |
 2 QSSLLGPSSIFGPGEVNULEGDSUSITGYPTTSUNRHSR
 1 T
 50 60 70 80
 | | | |
 2 KFWCREEESGRCUTLASTGYTSQEYSGRGNLTDEPEKGEF
 1 K D
 90 100 110
 | | |
 2+1 UUTVDQLTQNDSGSYKCGUGUNGRGLDFGUNULUSQKP