

Brevet N° **86938**
 du 3 juillet 1987
 Titre délivré **02 FEV. 1988**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

(1)

I. Requête

La société dite: **GENETIC SYSTEMS CORPORATION, 3005 First** (2)
Avenue, SEATTLE, Washington 98121, Etats-Unis d'Amérique,
 représentée par **Monsieur Jacques de Muysen,** agissant en
 qualité de mandataire (3)

dépose(nt) ce **trois juillet 1987** quatre-vingt sept (4)
 à **15** heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:
"Anticorps monoclonaux contre les flagelles de pseudomonas (5)
aeruginosa."

2. la description en langue **française** de l'invention en trois exemplaires:

3. **//** planches de dessin, en trois exemplaires:

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le **3 juillet 1987** :

5. la délégation de pouvoir, datée de _____ le _____ :

6. le document d'ayant cause (autorisation):

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont): (6)

voir désignation séparée: ne pas mentionner

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de (7)
 brevets déposée(s) en (8) **aux Etats-Unis d'Amérique**

le (9) **1. 3 juillet 1986, 2. 24 décembre 1986, et 3. 15 mai 1987**

sous le N° (10) **1. 881.984 2. 946.554 et 3. 048.143**

au nom de(11) inventeurs: **1. 1 + 3, 2. 1 + 3 et 3. 1, 2 + 3**

élit(élient) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg (12)
35, boulevard Royal

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,
 avec ajournement de cette délivrance à **6** mois. (13)

Le déposant / mandataire: (14)

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes,
 Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: **3 juillet 1987**

à **15** heures



Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,

p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle.

A 68007

EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT

(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal" à la demande de brevet principal N° _____ du _____ (2) inscrire les nom, prénom, profession, adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par _____ agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'invention - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivre)" lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication: "ne pas mentionner" lorsque l'inventeur signe ou signera un document de non-mention à joindre à une désignation séparée présente ou future - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE) - protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, Etats désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complet, le cas échéant: par l'indication de l'office recep-teur CBE/PCT - (11) nom ou titulaire du premier dépôt - (12) adresse du domicile effectif ou élu au Grand-Duché de Luxembourg - (13) 2, 6, 12 ou 18 mois - (14)

Brevet N° **86938**
 du 3 juillet 1987
 Titre délivré _____



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

(1)

I. Requête

La société dite: **GENETIC SYSTEMS CORPORATION, 3005 First Avenue, SEATTLE, Washington 98121, Etats-Unis d'Amérique,** représentée par **Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité de mandataire**

(2)

(3)

dépose(nt) ce **trois juillet 1987** à **15** heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

(4)

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:

"Anticorps monoclonaux contre les flagelles de pseudomonas aeruginosa."

(5)

2. la description en langue **française** de l'invention en trois exemplaires;

3. **//** planches de dessin, en trois exemplaires;

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le **3 juillet 1987**;

5. la délégation de pouvoir, datée de _____ le _____;

6. le document d'ayant cause (autorisation):

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont):

(6)

voir désignation séparée: ne pas mentionner

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de brevets déposée(s) **aux Etats-Unis d'Amérique**

(7)

le **1. 3 juillet 1986, 2. 24 décembre 1986, et 3. 15 mai 1987**

sous le N° **1. 881.984 2. 946.554 et 3. 048.143**

au nom des **inventeurs: 1. 1 + 3, 2. 1 + 3 et 3. 1, 2 + 3**

élit(élistent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

35, boulevard Royal

(12)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,

avec ajournement de cette délivrance à **6** mois.

(13)

Le déposant / mandataire: _____

(14)

II. Procès-verbal de Dépôt

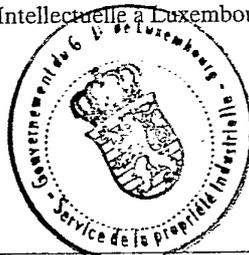
La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: **3 juillet 1987**

à **15** heures

Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,

p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle,



A 6800*

EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT

(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal" à la demande de brevet principal No du (2) inscrire les nom, prénom, profess., adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'inventeur - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivre: lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication "ne pas mentionner", lorsque l'inventeur signe ou signera un document de non-mention à joindre à une désignation séparée présente ou future - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE), protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, Etats désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complet - le cas échéant, par l'indication de l'office receveur CBE/PCT - (11) nom du titulaire du premier dépôt - (12) adresse du domicile effectif ou élu au Grand-Duché de Luxembourg - (13) 2, 6, 12 ou 18 mois - (14)

110 p
 107k
 AGIK
 Co...

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / ~~du modèle d'utilité~~

~~EX~~ Aux États-Unis d'Amérique

Du 3 juillet 1986 (No. 881.984),

du 24 décembre 1986 (No. 946.554) et

du 15 mai 1987 (No. 048.143).

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : GENETIC SYSTEMS CORPORATION

SEATTLE, Washington 98121 (Etats-Unis d'Amérique)

pour : "Anticorps monoclonaux contre les flâgelles de pseudomonas aeruginosa."

ANTICORPS MONOCLONAUX CONTRE LES FLAGELLES DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

DOMAINE DE L'INVENTION.

La présente invention concerne l'application de techniques immunologiques aux fins d'obtenir de nouvelles matières utiles pour le diagnostic et le traitement d'infections bactériennes et, plus particulièrement, la production et l'application d'anticorps monoclonaux humains qui sont capables de reconnaître les flagelles de Pseudomonas aeruginosa.

ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION.

Une maladie de type Gram-négatif et ses complications les plus sérieuses, par exemple la bactériémie et l'endotoxémie, sont la cause d'une morbidité et d'une mortalité significatives chez l'être humain. Ceci est vrai, en particulier, de l'organisme Gram-négatif Pseudomonas aeruginosa, qui a été de plus en plus associé à des maladies bactériennes, spécialement avec des infections nosocomiales, durant les cinquante dernières années.

Durant les quelques dernières décennies, les antibiotiques ont été la thérapie de choix pour la lutte contre des maladies de type Gram-négatif. La morbidité et la mortalité élevées et continuelles dues à une infection bactérienne de type Gram-négatif sont, cependant, indicatrices des limitations de la thérapie par antibiotiques, particulièrement en ce qui concerne P. aeruginosa. (Voir, par exemple, Andriole, V.G., "Pseudomonas Bacteremia : Can Antibiotic Therapy Improve Survival?", J. Lab. Clin. Med., / 1978 /, 94 : 196-199). Ceci a suscité la recherche d'autres procédés de prévention et de traitement.

Un procédé qui a été considéré est le renforcement du système immunitaire de l'hôte par immuni-

sation active ou passive. Par exemple, il a été observé que l'immunisation active de l'homme ou des animaux expérimentaux avec des vaccins constitués de cellules bactériennes entières ou d'endotoxines bactériennes purifiées provenant de P. aeruginosa conduit au développement d'anticorps opsoniques spécifiques dirigés essentiellement contre des déterminants des unités récurrentes d'oligosaccharides des molécules de lipopolysaccharides (LPS) situées sur la membrane externe de P. aeruginosa (voir Pollack, M., Immunoglobulins : Characteristics and Uses of Intravenous Preparations, Alving, B.M. et Finlayson, J.S., éd., pages 73-79, U.S. Department of Health and Human Services, 1979). De tels anticorps, qu'ils aient été engendrés activement ou transférés passivement, se sont révélés comme étant protecteurs contre les effets létaux de l'infection due à P. aeruginosa chez divers modèles d'animaux (Pollack, supra) et dans quelques recherches préliminaires chez l'être humain (voir Young, L.S. et Pollack, M., P. aeruginosa, Sabath, L., éd., pages 119-132, Hans Huber, 1980).

Les travaux ci-dessus suggèrent que les approches immunothérapeutiques pourraient être utilisées pour prévenir et traiter la maladie bactérienne due à P. aeruginosa, par exemple en administrant des immunoglobulines humaines rassemblées qui contiennent des anticorps contre la ou les souches infectantes. Les immunoglobulines humaines sont définies ici comme étant la fraction du plasma humain qui est enrichie en anticorps, parmi lesquels se trouvent des anticorps spécifiques contre des souches de P. aeruginosa. Du fait de certaines limitations dans l'utilisation des composants des immunoglobulines humaines, cette approche au traitement de la maladie due à P. aeruginosa reste à l'étude (voir, par exemple,

Collins, M.S. et Roby, R.E., Am. J. Med., 76(3A) : 168-174, [1984]), et jusqu'à présent il n'y a pas de produits commerciaux disponibles contenant ces composants.

Une telle limitation associée aux compositions d'immunoglobulines réside en ce qu'elles consistent en des rassemblements d'échantillons en provenance d'un millier de donneurs ou plus, ces échantillons ayant été présélectionnés d'après la présence d'anticorps particuliers anti-Pseudomonas. Ce rassemblement conduit à faire la moyenne des titres d'anticorps individuels, ce qui, au mieux, résulte en de modestes augmentations du titre résultant des anticorps désirés.

Une autre limitation est que le procédé de présélection lui-même requiert un tri continu, coûteux, de la population des donneurs pour assurer l'uniformité du produit. En dépit de ces efforts, les immunoglobulines obtenues peuvent encore avoir une variabilité considérable d'un lot à l'autre et parmi des produits en provenance de différentes régions géographiques.

Une autre limitation inhérente aux compositions d'immunoglobulines réside en ce que leur usage se traduit par l'administration simultanée de grandes quantités de substances protéiniques étrangères (qui peuvent inclure des virus tels que ceux dont on a montré récemment qu'ils étaient associés au Syndrome d'Immuno-Déficitaire Acquis ou SIDA), qui peuvent causer des effets biologiques néfastes. La combinaison de faibles titres des anticorps désirés et du haut contenu en substances étrangères peuvent souvent limiter au-dessous de l'optimum la quantité d'immunoglobulines spécifiques et donc bénéfiques administrables au patient.

En 1975, Kohler et Milstein ont exposé leur

découverte fondamentale que certaines lignées de cellules de souris pouvaient être fusionnées avec des cellules de rates de souris pour créer des hybridomes, dont chacun sécrète des anticorps d'une spécificité unique, c'est-à-dire des anticorps monoclonaux (Kohler, G. et Milstein, C., Nature, 256 : 495-497 [1975]). Avec l'avènement de cette technologie, il est devenu possible, dans quelques cas, de produire de grandes quantités d'anticorps murins sélectivement spécifiques à l'égard d'un déterminant particulier ou de déterminants sur des antigènes. Ultérieurement, en utilisant des technologies développées plus tard, il est devenu possible de produire des anticorps monoclonaux humains (voir, par exemple, le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4 464 465, qui est cité ici en référence).

Il est reconnu que dans quelques situations, les anticorps monoclonaux de souris ou des compositions de ces anticorps peuvent susciter des inconvénients lors de l'utilisation chez l'être humain. Par exemple, il a été rapporté que des anticorps monoclonaux de souris utilisés dans des études expérimentales pour le traitement d'une certaine maladie humaine peuvent provoquer une réponse immunitaire qui les rend inopérants (voir, Levy, R.L. et Miller, R.A., Ann. Rev. Med., 34 : 107-116 [1983]). Cependant, avec les récents progrès dans la technologie de l'ADN recombinant, tels que la production d'anticorps monoclonaux chimériques souris/homme, ces difficultés peuvent être diminuées. Aussi, des procédés pour la production d'anticorps monoclonaux humains sont actuellement disponibles (voir, Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies, Engleman, E.G. et al., éd., Plenum Publishing Corp. [1985], qui est cité ici en référence).

En utilisant la technologie de l'hybridome

et/ou de la transformation cellulaire, de nombreux groupes de chercheurs ont rapporté la production d'anticorps monoclonaux protecteurs contre des infections à P. aeruginosa. Des anticorps monoclonaux ont été produits, qui sont réactifs avec divers épitopes de P. aeruginosa, incluant des épitopes de surface spécifiques à sérotype unique et à sérotypes multiples, tels que ceux trouvés dans les molécules de lipopolysaccharides (LPS) de la bactérie (voir, par exemple, les demandes de brevets des Etats-Unis d'Amérique en cours n° 734 624 et 807 394 cédées à la Demanderesse, qui sont toutes deux citées ici en référence). Des anticorps monoclonaux protecteurs spécifiques pour l'exotoxine A de P. aeruginosa ont également été produits (voir, par exemple, la demande de brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 742 170 cédée à la Demanderesse, qui est citée ici en référence).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques pour la région LPS de P. aeruginosa, ou des exotoxines de la bactérie, peut fournir une protection suffisante dans quelques situations, mais il est généralement préférable de disposer d'une capacité de protection plus large. Par exemple, dans les traitements prophylactiques d'infections possibles chez l'homme, il serait préférable d'administrer un ou des anticorps protecteurs contre plusieurs de souches de P. aeruginosa. De même, dans des applications thérapeutiques où le ou les sérotypes de la ou des souches infectantes ne sont pas connus, il serait préférable d'administrer un anticorps ou une combinaison d'anticorps efficace contre la plupart sinon contre tous les sérotypes cliniquement importants de P. aeruginosa, idéalement en apportant des anticorps réactifs dans les schémas traditionnels de sérotypage.

Un aspect de la physiologie de P. aeruginosa

dont on a montré qu'il contribue à la virulence de l'organisme est la motilité, qui est une capacité résultant essentiellement de la présence d'un flagelle (voir, Montie, T. et al., [1982], Infect. and Immun., 38 : 1296-1298). P. aeruginosa est caractérisé par le fait qu'il a un flagelle unique à une extrémité de sa structure en bâtonnet. Des études sur modèle de souris brûlée ont montré qu'un plus grand pourcentage de souris survivait lorsque des souches de P. aeruginosa non douées de mouvement étaient inoculées dans les brûlures expérimentales que si des souches douées de mouvement étaient utilisées. (McManus, A. et al., [1980], Burns, 6 : 235-239 et Montie, T. et al., [1982], Infect. and Immun., 38 : 1296-1298). D'autres études sur la pathogénèse de P. aeruginosa ont prétendu que les animaux immunisés avec des préparations d'antigène de flagelle étaient protégés quand ils étaient brûlés et infectés avec des souches douées de mouvement de la bactérie (voir, Holder, I. et al., [1982], Infect. and Immun., 35 : 276-280).

Chose importante, les flagelles de P. aeruginosa ont été étudiés par des procédés sérologiques et décrits comme tombant dans deux groupes antigéniques majeurs désignés par H1 et H2 par B. Lanyi (1970, Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 17 : 35-48) et par type a et type b par Ansorg, R. (1978, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 242 : 228-238). Le typage sérologique des flagelles par les deux laboratoires a montré que les flagelles H1 (Lanyi, B., supra) ou flagelles de type b (Ansorg, R., supra) étaient sérologiquement uniformes, c'est-à-dire qu'aucun sous-groupe n'a été identifié. Ce type flagellaire sérologiquement uniforme est dit ci-après type b. L'autre antigène majeur, H2 (Lanyi, N., supra) ou type flagellaire a (Ansorg, R., supra) contenait cinq sous-groupes. Cet

antigène est dit ci-après type flagellaire a, avec cinq sous-groupes a₀, a₁, a₂, a₃ et a₄. Les cinq sous-groupes du type a sont exprimés dans des combinaisons variées sur différentes souches de P. aeruginosa portant le type a, à l'exception de l'antigène a₀. L'antigène a₀ a été trouvé sur tous les flagelles de type a, mais avec un degré d'expression variable parmi les souches.

Un schéma de sérotypage basé sur les antigènes majeurs somatiques stables à la chaleur de P. aeruginosa est dit schéma Habs, qui a été récemment incorporé dans l'International Antigenic Typing System. (Voir, Liu, Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 256, [1983].) Les souches de référence Habs des types flagellaires de P. aeruginosa ont été caractérisées par immunofluorescence avec des sérums polyclonaux par R. Ansorg (1978, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 242 : 228-238) ou par coagglutination sur lame (Ansorg, R et al, 1984, J. Clin. Microbiol., 20 : 84-88). Les souches Habs 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11 et 12 sont des souches portant des flagelles de type b et les souches Habs 1, 6, 8 et 9 portent des flagelles de type a. Un grand nombre de souches de P. aeruginosa pourrait donc probablement être reconnu par un petit nombre d'anticorps monoclonaux spécifiques pour les protéines flagellaires.

En conséquence, il existe un besoin significatif d'anticorps monoclonaux capables de réagir avec des épitopes sur des protéines flagellaires, et dans quelques cas, de fournir également une protection contre de multiples sérotypes de P. aeruginosa. De plus, certains de ces anticorps pourraient convenir pour le traitement prophylactique et thérapeutique d'infections à P. aeruginosa, ainsi que pour le diagnostic de telles infections. La présente invention

répond à ces besoins.

RESUME DE L'INVENTION.

L'invention a pour objet de nouvelles lignées de cellules qui peuvent produire des anticorps monoclonaux capables de se lier aux flagelles présents sur la plupart des souches de la bactérie P. aeruginosa. Les anticorps monoclonaux réagissent spécifiquement avec des épitopes sur les protéines flagellaires de P. aeruginosa et peuvent faire une distinction entre les flagelles de type a et les flagelles de type b des bactéries. De plus, elle a pour objet une composition pharmaceutique se prêtant au traitement d'un être humain susceptible d'infection ou déjà infecté par P. aeruginosa et contenant une quantité prophylactique ou thérapeutique d'au moins un anticorps monoclonal ou fragment de liaison de celui-ci capable de réagir avec les flagelles de souches de P. aeruginosa, la composition comprenant de préférence aussi un excipient physiologiquement acceptable. La composition peut également contenir l'un quelconque ou plus de ce qui suit : des anticorps monoclonaux supplémentaires capables de réagir avec l'exotoxine A de P. aeruginosa; des anticorps monoclonaux capables de réagir avec des sérotypes de déterminants sur les LPS de P. aeruginosa; une fraction de gammaglobuline du plasma de sang humain; une fraction de gammaglobuline du plasma de sang humain dont le plasma peut provenir d'un être humain ayant des taux élevés d'immunoglobulines réactives avec P. aeruginosa; et un ou plusieurs agents antimicrobiens. De plus, elle a pour objet les usages cliniques des anticorps monoclonaux, y compris la production de trousse de diagnostic.

DESCRIPTION DES FORMES DE REALISATION SPECIFIQUES.

La présente invention procure de nouvelles cellules capables de produire des anticorps monoclonaux

et des compositions comprenant de tels anticorps, lesquelles compositions sont capables de reconnaître sélectivement les flagelles présents sur plusieurs souches de P. aeruginosa, alors que les anticorps individuels reconnaissent typiquement un type de flagelles de P. aeruginosa. Les cellules en question ont des chromosomes identifiables dans lesquels l'ADN de la lignée germinale provenant d'elles ou d'une cellule précurseur s'est réarrangé pour coder pour un anticorps ayant un type de liaison pour un épitope sur une protéine flagellaire commune à certaines souches de P. aeruginosa. Pour les protéines flagellaires de type a, des anticorps monoclonaux pan-réactifs peuvent être produits; et pour les protéines flagellaires de type b, des anticorps qui sont pan-réactifs ou réagissent avec au moins 70% des souches portant des flagelles sont inclus. Ces anticorps monoclonaux peuvent être utilisés de façons très diverses, notamment pour le diagnostic et la thérapie.

Les anticorps monoclonaux ainsi fournis sont particulièrement utiles dans le traitement ou la prophylaxie d'une maladie grave par P. aeruginosa. Les protéines de surface des flagelles de P. aeruginosa seraient accessibles pour un contact direct avec les molécules d'anticorps, inhibant ainsi vraisemblablement la motilité de l'organisme et/ou facilitant les autres effets favorables pour les hôtes infectés.

La préparation d'anticorps monoclonaux peut être accomplie en immortalisant une lignée de cellules capables d'exprimer des séquences d'acide nucléique codant pour des anticorps spécifiques pour un épitope sur les protéines flagellaires de multiples souches de P. aeruginosa. La lignée de cellules immortalisées peut être une lignée de cellules de mammifère qui a été transformée par oncogénèse, transfection, mutation ou

équivalent. De telles cellules incluent les lignées de myélome, les lignées de lymphome, ou autres lignées de cellules capables de supporter l'expression et la sécrétion de l'immunoglobuline ou d'un fragment de liaison de celle-ci, in vitro. L'immunoglobuline ou le fragment peut être une immunoglobuline d'origine naturelle d'un mammifère autre que la souris ou l'homme qui sont les sources préférées, produite par transformation d'un lymphocyte, en particulier d'un splénocyte, au moyen d'un virus ou par fusion du lymphocyte avec une cellule néoplasique, par exemple un myélome, pour produire une lignée de cellules hybrides. Typiquement, le splénocyte sera obtenu à partir d'un animal immunisé contre des antigènes flagellaires ou des fragments de ceux-ci contenant un site épitopique. Les protocoles d'immunisation sont bien connus et peuvent varier considérablement tout en restant efficaces. (Voir, Golding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, Academic Press, N.Y., [1983], qui est cité ici en référence).

Les lignées de cellules hybrides peuvent être clonées et examinées suivant les techniques classiques, et les anticorps capables de se lier à des déterminants flagellaires de P. aeruginosa peuvent être détectés dans les surnageants cellulaires. Les lignées de cellules hybrides appropriées peuvent alors être cultivées à grande échelle ou injectées dans la cavité péritonéale d'un hôte approprié pour la production d'ascite.

Dans une forme d'exécution de la présente invention, les cellules sont des lymphocytes humains transformés qui produisent des anticorps monoclonaux humains, de préférence protecteurs in vivo contre des épitopes accessibles spécifiques pour au moins une protéine flagellaire. Les lymphocytes peuvent être

obtenus chez des donneurs humains qui sont ou ont été exposés aux souches appropriées de P. aeruginosa portant des flagelles. Un procédé préféré de transformation cellulaire est décrit en détail dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4 464 465, qui est cité ici par référence.

Du fait qu'ils contiennent les anticorps de la présente invention, qui sont connus pour être spécifiques pour les protéines flagellaires, les surnageants d'expériences suivantes peuvent, dans certains cas, être examinés par analyse de compétition avec des anticorps monoclonaux en question, comme moyen pour identifier des exemples supplémentaires d'anticorps monoclonaux antiflagellaires. Dès lors, des lignées de cellules hybrides peuvent être aisément produites à partir d'une variété de sources, sur base de la disponibilité des anticorps spécifiques pour des antigènes flagellaires particuliers présents.

Alternativement, quand des lignées de cellules hybrides, qui produisent des anticorps spécifiques pour les types épitopiques en question, sont disponibles, ces lignées de cellules hybrides peuvent être fusionnées avec d'autres cellules B néoplasiques, ces autres cellules B pouvant servir de destinataires pour de l'ADN génomique codant pour les récepteurs. Tandis que les cellules B néoplasiques de rongeurs, en particulier murines, sont le plus communément utilisées, d'autres espèces mammifères peuvent servir, comme les espèces lagomorphes, bovines, ovines, équines, porcines, aviaires, etc.

Les anticorps monoclonaux peuvent être de l'une quelconque des classes ou sous-classes d'immunoglobulines telles que les IgM, IgD, IgA, IgE, ou des sous-classes d'IgG connues pour chaque espèce d'animal. Généralement, les anticorps monoclonaux peuvent être

utilisés intacts ou sous forme de fragments de liaison, tels que Fv, Fab, F(ab')₂, mais habituellement intacts.

Les lignées de cellules de la présente invention peuvent trouver un usage autre que la production directe des anticorps monoclonaux. Les lignées de cellules peuvent être fusionnées avec d'autres cellules (telles que des myélomes humains convenablement marqués à l'égard d'un médicament, des myélomes de souris ou des cellules lymphoblastoïdes humaines), pour produire des hybridomes et donc assurer le transfert de gènes codant pour les anticorps monoclonaux. En variante, les lignées de cellules peuvent être utilisées en tant que sources des chromosomes codant pour les immunoglobulines, qui peuvent être isolés et transférés à des cellules par des techniques autres que la fusion. De plus, les gènes codant pour les anticorps monoclonaux peuvent être isolés et utilisés suivant les techniques d'ADN recombinant pour la production d'immunoglobulines spécifiques dans une variété d'hôtes. En particulier, en préparant des banques de cADN à partir d'ARN messager, un clone de cADN unique, codant pour l'immunoglobuline et exempt d'introns, peut être isolé et placé dans des vecteurs d'expression convenables procaryotiques ou eucaryotiques et ensuite transformé dans un hôte pour la production en masse finale. (Voir, généralement, les brevets des Etats-Unis d'Amérique n° 4 172 124; 4 350 683; 4 363 799; 4 381 292 et 4 423 147. Voir aussi, Kennett et al., Monoclonal Antibodies, Plenum, N.Y., [1980], et les références y citées, toutes ces sources étant mentionnées ici en référence).

Plus spécifiquement, suivant la technologie de l'ADN hybride, les immunoglobulines ou fragments de la présente invention peuvent être produits dans des bactéries ou une levure. (Voir, Boss et al., Nucl.

Acid. Res., 12 : 3791 et Wood et al., Nature, 314 : 446, chacun étant cité ici en référence). Par exemple, l'ARN messager transcrit à partir des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des anticorps monoclonaux produits par une lignée de cellules de la présente invention, peut être isolé par hybridation différentielle de cADN au moyen du cADN de lymphocytes BALB/c autres que le clone en question. L'ARNm qui ne s'hybride pas sera riche pour les messages codant pour les chaînes d'immunoglobulines désirées. Si nécessaire, ce processus peut être répété pour s'élever ensuite jusqu'aux taux désirés d'ARNm. La composition d'ARNm recueillie peut alors être soumise à la transcription réverse pour fournir un mélange de cADN enrichi en les séquences désirées. L'ARN peut être hydrolysé avec une ribonucléase appropriée et l'ADN simple brin peut être rendu double brin avec l'ADN polymérase I et des initiateurs agissant au hasard, par exemple de l'ADN de thymus de veau fragmenté au hasard. L'ADN double brin résultant peut alors être cloné par insertion dans un vecteur approprié, par exemple dans des vecteurs viraux tels que les vecteurs lambda, ou dans des vecteurs plasmidiens (tels que pBR322, pACYC184, etc). En développant des sondes basées sur des séquences connues pour les régions constantes des chaînes lourdes et légères, les clones de cADN ayant le gène codant pour les chaînes désirées légères et lourdes peuvent être identifiés par hybridation. Ensuite, les gènes peuvent être excisés des plasmides, manipulés pour retirer l'ADN surperflu en amont du codon d'initiation ou l'ADN de la région constante, et ensuite introduits dans un vecteur approprié pour la transformation d'un hôte et l'expression finale du gène.

D'une manière appropriée, des hôtes mammifères

(par exemple des cellules de souris) peuvent être utilisés pour traiter la chaîne (par exemple unir les chaînes lourdes et légères), afin d'obtenir une immunoglobuline intacte, et pour sécréter l'immunoglobuline exempte de séquence leader, si désiré. En variante, on peut utiliser des micro-organismes unicellulaires pour produire les deux chaînes, auquel cas une manipulation ultérieure peut être requise pour retirer les séquences d'ADN codant pour les signaux de traitement et leader de sécrétion, en fournissant un codon d'initiation à l'extrémité 5' de la séquence codant pour la chaîne lourde. De cette manière, les immunoglobulines peuvent être préparées et apprêtées de manière à être assemblées et glycosylées dans des cellules autres que des cellules de mammifères. Si cela est désiré, chacune des chaînes peut être tronquée de manière à retenir au moins la région variable, lesquelles régions peuvent alors être manipulées pour fournir d'autres immunoglobulines ou fragments spécifiques pour les épitopes flagellaires.

Les anticorps monoclonaux de la présente invention sont particulièrement utiles à cause de leur spécificité pour des antigènes contre pratiquement tous les variants de P. aeruginosa présentement connus. De plus, quelques-uns des anticorps monoclonaux sont protecteurs in vivo, permettant l'incorporation dans des produits pharmaceutiques tels que des combinaisons d'anticorps contre des infections bactériennes.

Les anticorps monoclonaux de la présente invention peuvent aussi trouver une large variété d'utilisations in vitro. Par exemple, les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour le typage des micro-organismes, pour l'isolement de souches spécifiques de P. aeruginosa, pour l'élimination sélective de cellules de P. aeruginosa dans un mélange hétérogène

de cellules, etc.

Dans des buts de diagnostic, les anticorps monoclonaux peuvent être soit marqués, soit non marqués. Typiquement, les tests de diagnostic imposent de détecter la formation d'un complexe par la liaison de l'anticorps monoclonal au flagelle de l'organisme P. aeruginosa. Quand ils ne sont pas marqués, les anticorps trouvent une utilité dans des tests d'agglutination. De plus, les anticorps non marqués peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres anticorps marqués (seconds anticorps) qui sont réactifs avec l'anticorps monoclonal, comme des anticorps spécifiques pour une immunoglobuline. En variante, les anticorps monoclonaux peuvent être directement marqués. Une large variété de marqueurs peut être utilisée, comme les radionucléides, les agents fluorescents, les enzymes, les substrats d'enzymes, les cofacteurs d'enzymes, les inhibiteurs d'enzymes, les ligands (particulièrement les haptènes), etc. De nombreux types de tests immunologiques sont disponibles et, par exemple, certains incluent ceux décrits dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique n° 3 817 827; 3 850 752; 3 901 654; 3 935 074; 3 984 533; 3 996 345; 4 034 074 et 4 098 876, tous étant cités ici en référence.

Les anticorps monoclonaux de la présente invention sont habituellement utilisés dans des tests immunologiques enzymatiques, où les anticorps en question, ou des seconds anticorps d'une espèce différente, sont conjugués à une enzyme. Quand un échantillon contenant P. aeruginosa d'un certain sérotype, tel que du sang humain ou un lysat de celui-ci, est combiné avec les anticorps en question, une liaison se fait entre les anticorps et les molécules présentant l'épitope désiré. Ces cellules peuvent alors être séparées des réactifs non liés, et un second anticorps

(marqué avec une enzyme) peut être ajouté. Ensuite, la présence d'un produit de conjugaison anticorps-enzyme spécifiquement lié aux cellules est déterminée. D'autres techniques classiques bien connues de l'homme de métier peuvent également être utilisées.

Des trousses peuvent également être fournies pour l'utilisation avec les anticorps en question pour détecter P. aeruginosa dans des solutions ou la présence d'antigènes flagellaires de P. aeruginosa. Ainsi, la composition d'anticorps monoclonal en question de la présente invention peut être présentée, habituellement sous une forme lyophilisée, soit seule, soit conjointement avec des anticorps supplémentaires spécifiques contre d'autres bactéries Gram-négatives. Les anticorps, qui peuvent être conjugués à un marqueur ou non conjugués, sont inclus dans les trousses avec des tampons, comme du Tris, du phosphate, du carbonate, etc., des stabilisateurs, des biocides, des protéines inertes, par exemple de la sérum albumine bovine, etc. Généralement, ces substances seront présentes en des quantités moindres qu'environ 5%, sur base de la quantité d'anticorps actif, et habituellement présentes en une quantité totale d'au moins environ 0,001%, sur base de la concentration d'anticorps. Fréquemment, il sera désirable d'inclure un diluant ou excipient inerte pour diluer les ingrédients actifs, auquel cas l'excipient peut être présent à raison d'environ 1% à 99% en poids de la composition totale. Quand un second anticorps capable de se lier à l'anticorps monoclonal est utilisé, celui-ci sera habituellement présent dans une fiole séparée. Le second anticorps est typiquement conjugué à un marqueur et présenté en une formulation analogue aux formulations d'anticorps décrites ci-dessus.

Les anticorps monoclonaux, en particulier les

anticorps monoclonaux humains, de l'invention, peuvent également être incorporés en tant que composants de compositions pharmaceutiques contenant une quantité thérapeutique ou prophylactique d'au moins un des anticorps monoclonaux de cette invention avec un excipient pharmaceutiquement efficace. Un excipient pharmaceutique devrait être toute substance compatible non toxique convenable pour administrer des anticorps monoclonaux à un patient. L'eau stérile, l'alcool, les graisses, les cires et les solides inertes peuvent être utilisés en tant qu'excipients. Des adjuvants pharmaceutiquement acceptables (agents tamponnants, agents dispersants) peuvent également être incorporés dans la composition pharmaceutique. De telles compositions peuvent contenir un anticorps monoclonal unique, de manière à être spécifiques pour des souches d'un type flagellaire de P. aeruginosa. En variante, une composition pharmaceutique peut contenir deux anticorps monoclonaux ou plus pour former un "cocktail". Par exemple, un cocktail contenant des anticorps monoclonaux contre les deux types de flagelles ou contre des groupes des diverses souches de P. aeruginosa (par exemple différents sérotypes) serait un produit universel ayant une activité contre la grande majorité des isolats cliniques de cette bactérie particulière.

La fraction molaire des différents anticorps monoclonaux constitutifs ne différera habituellement pas de plus d'un facteur de 10, et plus habituellement pas de plus d'un facteur de 5, et sera habituellement dans une proportion molaire d'environ 1:1-2 par rapport à chacun des autres composants d'anticorps.

Les anticorps monoclonaux de la présente invention peuvent également être utilisés en combinaison avec des produits de plasma sanguin existants, comme des gammaglobulines et immunoglobulines commer-

cialement disponibles utilisées dans le traitement prophylactique ou thérapeutique de la maladie à P. aeruginosa chez les humains. De préférence, pour les immunoglobulines, le plasma sera obtenu chez des donneurs humains ayant des taux élevés d'immunoglobulines réactives avec P. aeruginosa. (Voir à titre général : "Intravenous Immune Globulin and the Compromised Host", Amer. J. Med., 76(3a), 30 mars, 1984, pages 1-231, qui est cité ici en référence).

Les anticorps monoclonaux en question peuvent être utilisés à l'état de compositions administrées séparément, donnés conjointement avec des agents antibiotiques ou antimicrobiens. Typiquement, les agents antimicrobiens peuvent inclure une pénicilline antipseudomonale (par exemple la carbénicilline) en association avec un aminoglycoside (par exemple la gentamicine, la tobramycine, etc.), mais de nombreux autres agents (par exemple des céphalosporines) bien connus de l'homme de métier peuvent également être utilisés.

Les anticorps monoclonaux et leurs compositions pharmaceutiques de l'invention sont particulièrement utiles pour l'administration orale ou parentérale. De préférence, les compositions pharmaceutiques sont administrées par voie parentérale, c'est-à-dire sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse. L'invention a donc pour objet des compositions pour l'administration parentérale qui comprennent une solution de l'anticorps monoclonal ou un cocktail de celui-ci dissous dans un excipient acceptable, de préférence un excipient aqueux. Une variété d'excipients aqueux peut être utilisée, par exemple l'eau, l'eau tamponnée, une solution physiologique salée à 0,4%, une solution de glycine à 0,3%, etc. Ces solu-

tions sont stériles et généralement exemptes de matière particulaire. Ces compositions peuvent être stérilisées par des techniques de stérilisation classiques et bien connues. Les compositions peuvent contenir des substances auxiliaires pharmaceutiquement acceptables, requises pour approcher des conditions physiologiques, comme des agents d'ajustement du pH et des tampons, des agents d'ajustement de la toxicité, etc., par exemple l'acétate de sodium, le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le chlorure de calcium, le lactate de sodium, etc. La concentration en anticorps dans ces formulations peut varier largement, c'est-à-dire de moins d'environ 0,5%, habituellement d'environ 1% ou d'au moins environ 1% jusqu'à 15 ou 20% en poids au maximum, et sera sélectionnée essentiellement d'après les volumes de fluide, les viscosités, etc., à préférer pour le mode particulier d'administration choisi.

Dès lors, une composition pharmaceutique typique pour l'injection intramusculaire pourrait être préparée de façon à contenir 1 ml d'eau tamponnée stérile et 50 μg d'anticorps monoclonal. Une composition typique pour la perfusion intraveineuse pourrait être préparée de façon à contenir 250 ml de solution de Ringer stérile, et 150 μg d'anticorps monoclonal. Les procédés pour préparer des compositions administrables parentéralement sont connus ou évidents pour l'homme de métier et sont décrits avec plus de détails, par exemple, dans Remington's Pharmaceutical Science, 15ème éd., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, (1980), qui est cité ici en référence.

Les anticorps monoclonaux de l'invention peuvent être lyophilisés pour la conservation et reconstitués dans un excipient convenable avant usage. Cette technique s'est révélée efficace avec les immunoglobulines classiques et les techniques de lyophilisation

et de reconstitution connues dans le métier peuvent être appliquées. Il est évident pour l'homme de métier que la lyophilisation et la reconstitution peuvent conduire à des degrés divers de perte d'activité de l'anticorps (par exemple, avec les immunoglobulines classiques, les anticorps IgM ont tendance à avoir une plus grande perte d'activité que les anticorps IgG) et que les concentrations d'utilisation peuvent devoir être ajustées pour la compensation.

Les compositions contenant les anticorps monoclonaux de l'invention ou un cocktail de ceux-ci peuvent être administrées pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique des infections à P. aeruginosa. Dans une application thérapeutique, les compositions sont administrées à un patient déjà infecté par un ou plusieurs sérotypes de P. aeruginosa en une quantité suffisante pour soigner ou au moins partiellement arrêter l'infection et ses complications. Une quantité adéquate à cet effet est définie comme "dose thérapeutiquement efficace". Les quantités efficaces à cet effet dépendront de la sévérité de l'infection et de l'état général du système immunitaire du patient, mais seront généralement comprises dans une gamme d'environ 1 jusqu'à environ 200 mg d'anticorps par kg de poids du corps, mais des doses de 5 jusqu'à 25 mg par kg sont plus habituelles. Il faut garder à l'esprit que les produits de l'invention peuvent, de façon générale, être utilisés dans des états pathologiques graves, c'est-à-dire des situations menaçant la vie, ou menaçant potentiellement la vie, spécialement la bactériémie et l'endotoxémie dues à P. aeruginosa.

Dans des applications prophylactiques, les compositions contenant l'anticorps de l'invention ou un cocktail de celui-ci, sont administrées à un patient

non encore infecté par P. aeruginosa pour augmenter la résistance du patient à une telle infection possible. Une telle quantité est définie comme étant une "dose prophylactiquement efficace". Dans cet usage, les quantités précises dépendent à nouveau de l'état de santé du patient et du niveau général d'immunité, mais se situent généralement de 0,1 jusqu'à 25 mg par kg, spécialement de 0,5 à 2,5 mg par kg.

Des administrations uniques ou multiples des compositions peuvent être effectuées, les doses et le programme d'administration étant sélectionnés par le médecin traitant. Dans tous les cas, les formulations pharmaceutiques doivent apporter une quantité du ou des anticorps de l'invention suffisante pour le traitement curatif ou prophylactique efficace du patient.

EXPERIENCES.

EXEMPLE 1.-

L'exemple illustre le procédé appliqué pour préparer un anticorps monoclonal murin qui se lie spécifiquement aux flagelles de P. aeruginosa.

Des souris BALB/c âgées de trois mois ont été immunisées par voie intrapéritonéale huit fois avec des bactéries viables P. aeruginosa, immunotype Fisher 1 et immunotype Fisher 2 (A.T.C.C. n° 27312 et n° 27313), toutes les une à deux semaines, pour un total de neuf semaines. Les doses initiales de bactéries étaient 8×10^6 et 1×10^7 organismes par souris pour l'immunotype Fisher 1 et l'immunotype Fisher 2 de P. aeruginosa, respectivement, et la dose était augmentée de 30 à 60 fois au cours des immunisations.

Trois jours après la dernière injection, la rate d'une souris a été prélevée aseptiquement et une suspension cellulaire unique a été préparée par rotation douce de l'organe entre les extrémités givrées de deux lames de verre stériles. Les cellules mononu-

cléaires de rate ont été combinées dans une proportion 4:1 avec des cellules de myélome de souris en phase logarithmique (NSI-1, acquises chez le Dr. C. Milstein, Molecular Research Council, Cambridge, England) et fusionnées pour créer des hybridomes suivant le procédé décrit par Tam et al., (1982, Infect. Immun., 36 : 1042-1053). La suspension cellulaire hybride finale a été diluée à une concentration de $1,5 \times 10^6$ cellules par ml dans un milieu hybride HAT-RPMI (RPMI 1640 [Gibco, Grand Island, N.Y.] contenant 15% de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur, du pyruvate de sodium 1 mM, 100 μ g/ml de pénicilline et de streptomycine, de l'hypoxanthine $1,0 \times 10^{-4}$ M, de l'aminoptérine $4,0 \times 10^{-7}$ M et de la thymidine $1,6 \times 10^{-5}$ M), additionné de $2,0 \times 10^6$ cellules de thymus BALB/c fraîchement préparées par ml, comme cellules nourricières.

Le mélange a été mis sur plaques (200 μ litres par puits) dans des plaques à 96 puits (n° 3596, Costar, Cambridge, MA). Les cultures ont été nourries par retrait et remplacement de 50% du volume de chaque puits avec du milieu hybride HAT-RPMI frais, tous les deux ou trois jours. Les surnageants des cultures ont été testés pour la présence d'anticorps anti-P. aeruginosa par dosage d'immunosorption avec enzyme fixée (ELISA) lorsque la croissance cellulaire atteignait approximativement 40% de confluence dans les puits, habituellement dans les 7 à 10 jours.

Les surnageants des cultures des cellules hybrides ont été testés simultanément sur des préparations de membranes externes provenant de chacune des deux bactéries immunisantes. Les préparations de membranes externes ont été isolées par une modification de la technique de Tam et al. (1982, Infect. Immun., 36 : 1042-1053), qui est citée ici en référence. Des

bactéries (immunotype Fisher 1 et immunotype Fisher 2 de P. aeruginosa) ont été inoculées dans un bouillon au triptycase-soya (TSB) et cultivées de 16 à 18 heures à 34°C avec aération dans un bain remué par un agitateur giratoire. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation et lavées deux fois avec de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS, NaCl 0,14 M, KCl 3 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2) contenant 150 unités inhibitrices de trypsine (U.I.T.) d'aprotinine par ml (Sigma, St. Louis, MO).

Le culot de la centrifugation finale a été remis en suspension dans de la triéthanolamine 0,17 M et de l'acide édétic (EDTA) disodique 20 mM, et ensuite homogénéisé sur glace pendant dix minutes. Les débris ont été centrifugés hors de l'homogénat à 14.900 g et rejetés, et le surnageant a été centrifugé à nouveau comme ci-dessus. Le culot a été rejeté à nouveau et les membranes ont été centrifugées hors du surnageant à 141.000 g pendant une heure. Le surnageant a été rejeté et les culots membraneux ont été conservés durant la nuit à 4°C dans 10 ml de PBS contenant 75 U.I.T. d'aprotinine par ml. Le jour suivant, les culots ont été remis en suspension par agitation et ensuite divisés en aliquotes et stockés à -70°C. La teneur en protéine de chacune des aliquotes a été déterminée par le procédé de Lowry et al. (1951, J. Biol. Chem., 193 : 265-275).

Les plaques d'antigène pour les tests ELISA ont été préparées comme suit. Les préparations de membranes externes ont été diluées jusqu'à 5 µg de protéine par ml dans du PBS et 50 µlitres de la solution ont été mis sur plaque, dans chaque puits de plaques à 96 puits (Linbro n° 76-031-05, Flow Laboratories, Inc., McLean, VA), couvertes et incubées durant la nuit à 37°C. L'antigène non lié a été éliminé des

plaques et 100 μ litres d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) dans du PBS ont été ajoutés à chaque puits, puis les plaques ont été incubées pendant une heure à 37°C.

Après l'élimination du BSA non absorbé, les surnageants des cultures (50 μ litres) provenant de chaque puits des plaques de fusion ont été répliqués sur plaque dans les puits correspondants des plaques d'antigène et incubés 30 minutes à 37°C. L'anticorps non lié a été éliminé des puits et les plaques lavées trois fois avec 100 μ litres par puits d'une solution BSA-PBS à 1% (p/v). Ensuite, 50 μ litres par puits d'IgG de chèvre antisouris biotinylée diluée d'une manière appropriée (Tago, Inc., Burlingame, CA) ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 30 minutes à 37°C. Les plaques ont été lavées trois fois, comme décrit ci-dessus, et ensuite 50 μ litres d'un complexe préformé avidine:peroxydase de raifort biotinylée (Vectastain ABC Kit, Bector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), préparé suivant les indications du fabricant, ont été ajoutés aux puits. Après 30 minutes à température ambiante, le réactif Vectastain a été éliminé des puits, les puits ont été lavés comme ci-dessus et ensuite 100 μ litres par puits de substrat o-phénylènediamine [0,8 mg/ml dans du tampon au citrate 0,1 M à pH 5,0, en mélange avec un volume égal de H₂O₂ à 0,03% (v/v)] ont été ajoutés. Le substrat a été incubé pendant 30 minutes à la température ordinaire à l'obscurité et les réactions ont été alors arrêtées par l'addition de H₂SO₄ 3N à raison de 50 μ litres par puits.

Les hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux qui se liaient à l'une ou l'autre des deux préparations d'antigène ont été localisés en mesurant l'absorbance à 490 nm des réactions colorimétriques

dans chaque puits, sur un lecteur Dynatech Model 580 MicroELISA (Alexandria, VA). Les cellules dans un puits, désignées sous l'appellation Pa3 IVC2, produisaient un anticorps qui se liait uniquement à la plaque d'antigène immunotype Fisher 2. Ce puits a été étudié plus en détail comme décrit ci-dessous. L'anticorps monoclonal et la lignée cellulaire clonale de ce puits sont tous deux identifiés par la désignation Pa3 IVC2 dans le texte ci-après. Les cellules Pa3 IVC2 du puits original ont été miniclônées et clônées par des techniques de dilution limitantes, comme décrit par Tam et al., (1982, Infect. Immun., 36 : 1042-1053).

Une ascite contenant un anticorps monoclonal de haut titre a été préparée dans des souris CB6 F₁ (génération F₁ d'une femelle BALB/c x un mâle C57BL/6) suivant les procédés décrits par Tam et al. (1982, Infect. Immun., 36 : 1042-1053). Des mâles de souris CB6 F₁ âgés de 2 à 3 mois ont été injectés par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml de Pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) 10 à 21 jours avant une injection intrapéritonéale de cellules Pa3 IVC2 en phase logarithmique dans du RPMI. Chaque souris a été injectée avec $0,5-1 \times 10^7$ cellules dans 0,5 ml. Après approximativement deux semaines, le liquide accumulé a été prélevé sur les souris tous les deux ou trois jours. La concentration d'anticorps dans l'ascite a été déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose (Paragon, Beckman Instruments, Inc., Brea, CA) et toutes les ascites qui contenaient 5 mg/ml ou plus d'anticorps ont été rassemblées, fractionnées en aliquotes et surgelées à -70°C.

Caractérisation de la cible moléculaire liée par l'anticorps monoclonal.

Le surnageant de la culture de la lignée cellulaire clônée Pa3 IVC2 a été testé par ELISA, comme

décrit ci-dessus, sur des préparations de membranes externes provenant de chacune des sept souches immunotypes Fisher de P. aeruginosa (A.T.C.C. 27312-27318), de P. aureofaciens (A.T.C.C. 13985) et de Klebsiella pneumoniae (A.T.C.C. 8047), toutes préparées comme décrit ci-dessus. L'anticorps Pa3 IVC2 se liait aux immunotypes Fisher 2, 6 et 7 des préparations de membranes externes de P. aeruginosa et pas aux autres immunotypes Fisher, ni à P. aureofaciens ou à K. pneumoniae.

L'antigène spécifique reconnu par l'anticorps Pa3 IVC2 a été identifié par précipitation radio-immune. En résumé, cette analyse comporte l'incubation d'antigènes radiomarqués avec l'anticorps Pa3 IVC2 et une source particulière de protéines A qui conduit à la formation de complexes insolubles anticorps:antigène. Ces complexes sont lavés pour éliminer tout antigène lié non spécifiquement et ensuite les complexes sont dissociés et séparés sur gel de polyacrylamide. Les espèces radioactives prédominantes trouvées dans le gel sont identifiées de cette manière comme étant le ou les antigènes correspondants auxquels l'anticorps Pa3 IVC2 se lie.

Des aliquotes (25 μ g) de préparations solubles de membranes externes des immunotypes Fisher 2, 3, 4 et 5 de P. aeruginosa ont été radiomarquées en phase solide avec ^{125}I en utilisant de l'Iodo-gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) (Fraker et Speck, 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun., 80 : 849-857; Markwell et Fox, 1978, Biochemistry, 17 : 4807-4817). Cette technique provoque l'iodation des résidus de tyrosine exposés de la plupart, sinon de toutes les protéines contenues dans les préparations de membranes externes.

Pour diminuer la liaison non spécifique des antigènes de la membrane externe à l'anticorps

Pa3 IVC2, les préparations radiomarquées (5×10^6 coups par minute par test) ont d'abord été incubées pendant une heure à 4°C avec du sérum de souris BALB/c normales (dilution finale 1:40). Le surnageant de la culture Pa3 IVC2 (0,5 ml) contenant l'anticorps Pa3 IVC2 a alors été ajouté à chaque échantillon de membrane externe. Après incubation de l'antigène et de l'anticorps pendant une heure à 4°C, la source de protéine A, IgGSORB (0,095 ml par échantillon) (The Enzyme Center, Inc., Boston, MA) a été ajoutée et incubée pendant encore 30 minutes à 4°C (Kessler, S.W., 1975, J. Immunol., 115 : 1617-1622). IgGSORB a été préparé selon les indications du fabricant et, juste avant l'utilisation, les réactions non spécifiques ont été empêchées en bloquant des sites potentiellement réactifs avec du milieu de culture, en lavant l'IgGSORB deux fois avec du RPMI hybride (milieu hybride RPMI-HAT sans HAT).

Les complexes antigène-anticorps IgGSORB ont été centrifugés à 1.500 g pendant 10 minutes à 4°C, lavés deux fois avec du tampon RIPA phosphaté (phosphate 10 mM, pH 7,2, NaCl 0,15 M, Triton X 100 1,0% (v/v), désoxycholate de sodium 1,0% (p/v), dodécylsulfate de sodium (SDS) 0,1% (p/v) et aprotinine 1,0% (v/v); deux fois avec du tampon hautement salin (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, LiCl 0,5 M, bêta-mercaptoéthanol 1% (v/v); et une fois avec du tampon de lyse (Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5, NaCl 0,05 M et Nonidet P-40 0,05% (v/v) (Rohrschneider et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 76 : 4479-4483). L'antigène lié au complexe a été dégagé par incubation avec du tampon d'un échantillon [Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 2% (p/v)], bêta-mercaptoéthanol 2% (v/v) et glycérol 20% (v/v) à 95°C pendant dix minutes et collecté dans le surnageant après centrifugation à 1.500 g pendant 10 minutes.

Les échantillons de surnageants ont alors été

appliqués sur des gels de polyacrylamide à 14% contenant du SDS préparés suivant le procédé de B. Lugtenberg et al. (1978, FEBS Lett., 58 : 254-258), tel que modifié par Hancock et Carey (1979, J. Bacteriol., 140 : 902-910, qui est cité ici en référence), et les antigènes ont été séparés dans le gel par électrophorèse pendant la nuit sous tension constante de 50 V. Après la fixation du gel dans du méthanol 40% (v/v), de l'acide acétique 10% (v/v) et du glycérol 5% (v/v) durant la nuit, il a été séché sur du papier Whatman 3 MM à l'aide d'un sécheur de gel Biorad (Richmond, CA). Le gel séché a été couvert avec une enveloppe plastique et exposé à un film Kodak X-AR pendant 18 heures à la température ambiante.

Les résultats de cette expérience ont illustré que le Pa3 IVC2 se liait à un seul antigène de la préparation de membrane externe de l'immunotype Fisher 2 de P. aeruginosa, mais à aucun antigène présent dans les autres préparations de membranes externes. Le poids moléculaire (PM) de l'antigène dans le gel était d'environ 53.000 daltons, comme déterminé en comparant sa mobilité à celle de protéines de référence marquées au ^{14}C (phosphorylase B, PM 92.500; BSA, PM 69.000; ovalbumine, PM 46.000; anhydrase carbonique, PM 30.000; cytochrome C, PM 12.000) (New England Nuclear, Boston, MA) qui étaient séparées dans le même gel. Le poids moléculaire de cet antigène est en corrélation avec le poids moléculaire de la flagelline, la protéine comprise dans les flagelles de P. aeruginosa, comme rapporté par Montie et al. (1982, Infect. Immun., 35 : 281-288), qui est cité ici en référence.

De plus, Pa3 IVC2 a été examiné par ELISA en utilisant les souches Habs 1 à 12 de P. aeruginosa (A.T.C.C. 33348-33359) qui étaient fixées avec de

l'éthanol sur des plaques de microtitration à 96 puits. Les plaques d'antigène étaient préparées comme suit.

Des bouillons de culture d'une nuit de chaque organisme ont été centrifugés, le culot a été lavé deux fois avec du PBS et ensuite remis en suspension dans du PBS jusqu'à une densité optique de 0,2 unité pour l'absorbance à 660 nm. Les bactéries diluées ont été mises sur plaque dans des puits (50 μ litres par puits) et ensuite centrifugées à 1.500 g pendant 15 minutes à la température ambiante. Le PBS a été aspiré et ensuite de l'éthanol (95%) a été ajouté aux puits pendant 15 minutes à la température ambiante. Après l'élimination de l'éthanol des puits, les plaques ont été séchées à l'air et ensuite couvertes et stockées à 4°C jusqu'à usage.

Les résultats des tests ELISA, enregistrés comme décrit ci-dessus, ont montré que Pa3 IVC2 se liait aux souches Habs 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11 et 12 fixées par l'éthanol. Ce modèle de spécificité indiquait que Pa3 IVC2 se liait aux flagelles de type b de P. aeruginosa (Ansorg, R., 1978, Zbl. Bakt. Hyg., I., Abt. Orig. A, 242 : 228-238; Ansorg, R. et al., 1984, J. Clin. Microbiol., 20 : 84-88, tous deux cités ici en référence). Si on attribue cette spécificité au Pa3 IVC2 monoclonal, les souches de référence de P. aeruginosa, immunotype Fisher 2, immunotype Fisher 6, et immunotype Fisher 7 portent des flagelles de type b. Des données expérimentales précédentes, il a été conclu que Pa3 IVC2 se lie spécifiquement à la flagelline de type b de P. aeruginosa.

Activité protectrice de Pa3 IVC2 in vivo.

Des expériences sur des animaux ont été menées pour déterminer si l'anticorps monoclonal Pa3 IVC2 protégerait une souris injectée avec de multiples doses létales 50 (DL₅₀) de bactéries de P. aeruginosa

vivantes. Le modèle choisi était le modèle de la souris brûlée (Collins, M.S. et Roby, R.E., 1983, J. Trauma, 23 : 530-534, qui est cité ici en référence). On a fait à des groupes de souris une brûlure grave, suivant le protocole des auteurs, et on les a ensuite immédiatement injectées avec de 5 à 10 DL₅₀ de l'immunotype Fisher 7. L'anticorps monoclonal a été administré par voie intrapéritonéale sous forme d'ascite à haut titre (0,2 ml par voie intrapéritonéale) avant la brûlure et l'injection. Aucune augmentation du nombre de survivants n'a été observée chez les animaux traités avec Pa3 IVC2 par comparaison avec ceux qui n'avaient pas reçu d'anticorps.

EXEMPLE 2.-

L'exemple 2 illustre le procédé pour la préparation d'une lignée de cellules hybrides murines produisant un anticorps monoclonal murin contre la flagelline de type b de P. aeruginosa, qui est protecteur in vivo.

Des souris femelles adultes BALB/c ont d'abord été injectées par voie intrapéritonéale avec l'immunotype Fisher 6 viable de P. aeruginosa (A.T.C.C. 27317) (8×10^6 organismes), et deux semaines plus tard, elles ont reçu une injection de l'immunotype Fisher 5 viable de P. aeruginosa (A.T.C.C. 27316) (4×10^6 organismes). Durant la période suivante de deux semaines, les immunotypes Fisher 5 et Fisher 6 viables de P. aeruginosa ont été administrés simultanément en deux injections hebdomadaires. La dose de chaque organisme a été augmentée de manière que la dose finale s'élève à 10 fois la dose initiale. Une injection finale de préparations ($50 \mu\text{g}$ de protéine) de membranes externes de l'immunotype Fisher 6 de P. aeruginosa préparées suivant le procédé de R.E.W. Hancock et H. Nikaido (1978, J. Bacteriol.,

136 : 381-390) a été donnée quatre jours après la dernière injection de bactéries viables. Trois jours après la dernière immunisation, la rate a été prélevée sur une souris et les cellules de rate ont été préparées pour l'hybridation comme décrit dans l'exemple 1.

Les surnageants des cultures des hybridomes ont été testés pour la présence d'anticorps anti-P. aeruginosa par test ELISA au jour 10 après la fusion suivant le procédé indiqué dans l'exemple 1, excepté que l'antigène, pour les plaques ELISA, consistait en des bactéries viables immobilisées dans les puits des plaques de microtitration à 96 puits. Les plaques ont été préparées comme suit.

50 μ litres de poly-L-lysine (PLL) (1 μ g/ml dans du PBS) (Sigma n° P-1524, St. Louis, MO) ont été ajoutés à chaque puits des plaques à 96 puits (Linbro) et incubés pendant 30 minutes à la température ambiante. La PLL non adsorbée a été éliminée et les puits ont été lavés trois fois avec du PBS. Les cultures bactériennes cultivées pendant la nuit dans du TSB ont été lavées une fois avec du PBS et ensuite remises en suspension dans du PBS jusque $A_{660 \text{ nm}} = 0,2$ D.O. 50 μ litres des suspensions bactériennes ont été ajoutés à chaque puits de la plaque et admis à se lier à 37°C pendant une heure. Les bactéries non liées ont été éliminées des plaques, avec trois lavages des puits au moyen de Tween salin [NaCl 0,9% (p/v), Tween-20 0,05% (v/v)].

La liaison non spécifique des anticorps a été bloquée par l'addition aux puits de 200 μ litres par puits de tampon bloquant [PBS contenant du lait maigre séché 5% (p/v), de l'antimousse A 0,01% (v/v) (Sigma, St. Louis, MO) et du thimérosal 0,01% (v/v)] et par incubation pendant une heure à la température ambiante. Le tampon bloquant en excès a été expulsé et les puits

ont été lavés trois fois avec du Tween salin, comme décrit précédemment.

Les surnageants des cultures (50 μ litres) ont été répliqués dans les puits correspondants des plaques d'essai et incubés à la température ambiante pendant 30 minutes. Les surnageants de cultures ont été éliminés des plaques, avec lavage des puits cinq fois au moyen de Tween salin.

Un anticorps de seconde étape, conjugué à une enzyme (IgG de chèvre antisouris conjuguée avec de la peroxydase de raifort + IgM) (Tago, Inc., Burlingame, CA), a été dilué dans du PBS contenant du Tween-20 0,1% (v/v) et du BSA 0,2% (p/v), suivant des titrations effectuées précédemment, et ensuite 50 μ litres du réactif ont été ajoutés à chaque puits et incubés 30 minutes à la température ambiante. Le réactif en excès a été expulsé; les puits lavés cinq fois dans du Tween salin; et 100 μ litres par puits du substrat o-phénylènediamine ont été ajoutés et incubés pendant 30 minutes, comme décrit dans l'exemple 1. Les réactions ont été arrêtées comme dans l'exemple 1, et ensuite lues pour l'absorbance à 490 nm sur un lecteur de plaque Bio-Tek EL-310 Automated EIA.

Suivant les procédés décrits ci-dessus, les surnageants de cultures de la fusion ont été testés pour la présence d'anticorps qui se lient aux immunotypes Fisher 1, 2, 3 ou 4 de P. aeruginosa, mais non aux plaques de contrôle préparées par la même technique PLL et de blocage, mais sans bactéries. Les surnageants contenant l'anticorps qui se liait à l'un quelconque de ces quatre immunotypes Fisher ont été testés une seconde fois en utilisant chacun des sept immunotypes Fisher de la bactérie séparément. L'anticorps présent dans le surnageant d'un puits, PaF4 IVE8, se liait seulement aux immunotypes Fisher 2, 6 et 7 de

P. aeruginosa. Les cellules du puits PaF4 IVE8 ont été clonées par des procédés de dilution limitante, comme décrit dans l'exemple 1. L'anticorps monoclonal et la lignée cellulaire clonale de ce puits sont tous deux identifiés par la désignation PaF4 IVE8 dans le texte ci-après. Une ascite contenant de l'anticorps monoclonal à haut titre a été produite comme décrit dans l'exemple 1, excepté que des souris BALB/c ont été utilisées au lieu de CB6F₁.

Spécificité de PaF4 IVE8.

Un test réalisé pour identifier l'antigène lié par l'anticorps monoclonal PaF4 IVE8 a été l'immunofluorescence indirecte sur des organismes bactériens. Chacun des sept immunotypes Fisher de référence de P. aeruginosa plus une souche non flagellée de P. aeruginosa (PA103, A.T.C.C. n° 29260, Leifson, 1951, J. Bacteriol., 62 : 377-389) et Escherichia coli (G.S.C. A25) ont été cultivés pendant la nuit à 37°C dans du TSB. Les bactéries ont été centrifugées et ensuite lavées deux fois avec du PBS. Chaque souche a été remise en suspension dans du PBS jusqu'à une densité optique de 2,2 à 660 nm.

Les suspensions bactériennes ont alors été une fois de plus diluées dans une proportion 1:150 et des échantillons de 20 µlitres ont été placés dans des cellules individuelles sur des lames de Carlson (Carlson Scientific Inc., Peotone, IL) et séchés sur la lame à 40°C. Les surnageants de cultures (25 µlitres) de PaF4 IVE8 ont été incubés sur les échantillons bactériens séchés sur les lames en chambre humidifiée à la température ambiante pendant 30 minutes. L'anticorps non lié a été éliminé des lames en immergeant les lames dans l'eau distillée.

Après séchage des lames, une IgG de chèvre antisouris conjuguée avec de l'isothiocyanate de

fluorescéine (ITCF) plus une IgM (25 μ litres par puits d'une dilution 1:40 dans du PBS) (Tago, Burlingame, CA) ont été incubées sur les lames pendant 30 minutes à la température ambiante en chambre humidifiée dans l'obscurité. Les lames ont été lavées à nouveau dans l'eau distillée, séchées et ensuite couvertes avec une lamelle couvre-objet montée avec du glycérol dans du PBS (9:1). Les lames ont été observées avec un microscope à fluorescence.

La coloration fluorescente a été observée uniquement sur les immunotypes Fisher 2, 6 et 7 de P. aeruginosa et a été observée comme étant une sinusoïde (ligne) émanant uniquement d'une extrémité des organismes. Ceci est conforme avec la morphologie et la localisation du flagelle polaire unique de ces bactéries.

La réaction de PaF4 IVE8 avec les flagelles a été confirmée par analyse d'immunoblotting. Les antigènes de la membrane externe de l'immunotype Fisher 6 de P. aeruginosa (voir exemple 1) ont été séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 14% contenant du SDS comme décrit dans l'exemple 1, excepté que l'électrophorèse a été menée pendant cinq heures à un ampérage constant de 80 mA. Des marqueurs de poids moléculaire précolorés (lysozyme PM 14.300; bêta-lactoglobuline PM 18.400; alpha-chymotrypsinogène PM 25.700; ovalbumine PM 43.000; sérum albumine bovine PM 68.000; phosphorylase B PM 97.400 et myosine PM 200.000) (BRL, Gaithersburg, MD) ont été inclus dans le même gel de polyacrylamide.

Les antigènes ont été transférés du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose (MNC), (0,45 μ m, Schleicher and Schuell, Inc., Keen, NH) dans un tampon Tris-glycine-méthanol (Towbin et al., [1979], Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76 : 4350-

4354) contenant du SDS 0,05% (p/v) durant la nuit à 4°C à un ampérage constant de 200 mA. Après transfert, la MNC a été incubée dans du Tween-20 0,05% (v/v) dans du PBS (PBS-Tween) (Batteiger, B. et al., 1982, J. Immunol. Meth., 55 : 297-307) pendant une heure à la température ambiante. Pour cette étape et toutes les suivantes, le plateau contenant la MNC a été placé sur une plate-forme secoueuse pour assurer la distribution de la solution sur toute la MNC.

Après une heure, la solution PBS-Tween a été décantée et de l'ascite PaF4 IVE8 (diluée 1:1000 dans du PBS-Tween) a été ajoutée et incubée avec la MNC pendant une heure à la température ambiante. La MNC a alors été lavée cinq fois, chaque fois 5 minutes, avec du PBS-Tween pour éliminer l'anticorps non lié. De l'IgG de chèvre antisouris conjuguée avec de la phosphatase alcaline plus IgM (Tago, Inc.) a été diluée suivant les indications du fabricant et incubée avec la MNC pendant une heure à la température ambiante. La MNC a été lavée cinq fois comme décrit ci-dessus, puis le substrat contenant du phosphate de bromochloroindolye et du bleu de p-nitrotétrazolium (Sigma, St. Louis, MO), préparé comme décrit par Leary et al. (1983, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80 : 4045-4049), a été ajouté et incubé 10 à 20 minutes à la température ambiante. La réaction a été arrêtée en lavant le substrat avec de l'eau distillée.

Les résultats de cette expérience ont montré que PaF4 IVE8 se liait spécifiquement à un antigène unique d'un poids moléculaire de 53.000 daltons dans la préparation de membranes externes. Les résultats du test d'immunofluorescence indirecte et de l'immunoblotting démontrent que PaF4 IVE8 se lie aux flagelles de P. aeruginosa.

Le type de flagelle que PaF4 IVE8 reconnaît a

été déterminé par ELISA. Les souches Habs 1-12 (A.T.C.C. n° 33348-33359) ont été liées chacune à des puits de plaques de microtitration de 96 puits (Linbro) avec de la PLL, et l'ELISA a été réalisée comme décrit plus tôt dans cet exemple. La source de l'anticorps PaF4 IVE8 était le surnageant de la culture. Des réactions positives ont été notées dans les puits contenant les souches Habs 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11 et 12, indiquant donc que PaF4 IVE8 se lie aux flagelles de type b. Les données de la protection in vivo sont présentées ci-dessous dans l'exemple 4.

EXEMPLE 3.-

L'exemple 3 illustre le procédé pour la préparation d'une lignée de cellules hybrides murines produisant un anticorps monoclonal antflagelle de type a de P. aeruginosa, qui est protecteur in vivo.

La source de cellules lymphoïdes pour la fusion était une rate d'une souris BALB/c immunisée, qui avait été injectée quatre fois par voie intrapéritonéale pendant 6 semaines avec des flagelles purifiés de type a (10 à 20 μ g de protéine) provenant de souches Habs 6 et 8 (A.T.C.C. n° 33353 et 33355). Les flagelles ont été purifiés suivant le procédé de T.C. Montie et al. (1982, Infect. Immun., 35 : 281-288, qui est cité ici en référence) sauf que la centrifugation finale des flagelles a été menée à 100.000 g pendant une heure plutôt qu'à 40.000 g pendant trois heures. Une seconde modification adoptée pour quelques opérations a été de détacher les flagelles des bactéries pendant 30 secondes dans un mélangeur plutôt que pendant 3 minutes. (Allison et al., 1985, Infect. Immun., 49 : 770-774).

Les concentrations en protéines de chaque préparation ont été déterminées avec le test de protéine Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA) et la présence

de lipopolysaccharide (LPS) contaminant a été établie en mesurant le contenu en KDO (Karkhanis, Y.D., et al., 1978, Anal. Biochem., 85 : 595-601). Les poids moléculaires de protéines de flagelles ont été déterminés en comparant leur migration dans un gel de polyacrylamide avec SDS à la migration de protéines marquées dde référence (BRL) (voir exemple 2). Le poids moléculaire de la flagelline de la souche Habs 6 était de 51.700 daltons et celui de la flagelline de la souche Habs 8 était de 47.200 daltons. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par J.S. Allison et al. (1985, Infect. Immun., 49 : 770-774, qui est cité ici en référence).

La fusion de splénocytes provenant de souris immunisées contre la flagelline avec des cellules de myélome NS-1 a été réalisée trois jours après la dernière immunisation, comme décrit dans les exemples 1 et 2. Quand les cellules hybrides ont crû jusqu'à environ 40% de confluence (jour 7), les surnageants des cultures ont été répliqués dans des puits correspondants de trois plaques d'antigènes différentes : l'immunotype Fisher 1 de P. aeruginosa lié à de la PLL (voir exemple 2 pour la préparation) et les souches Habs 6 et Habs 9 fixées à la formaline.

Les bactéries pour les plaques d'antigènes fixés à la formaline ont été cultivées, lavées et diluées comme décrit pour les plaques d'antigènes liées à la PLL. Des bactéries diluées (0,2 unité de densité optique pour l'absorbance à 660 nm) ont été ajoutées aux puits individuels (50 μ litres par puits) de plaques de microtitration à 96 puits Linbro, et les plaques ont alors été centrifugées à 1.200 g pendant 20 minutes à température ambiante. Les surnageants ont été éliminés des puits et 75 μ litres d'une solution de formaline 0,2% (v/v) dans du PBS ont été ajoutés à chaque puits

et incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Après élimination de la formaline des puits, les plaques ont été séchées à l'air et stockées à 4°C jusqu'à usage. La formaline n'altère par l'antigénicité des flagelles, comme l'indique la capacité des anti-sérums antiflagelles d'agglutiner des organismes traités par la formaline (Lanyi, B., 1970, Acta Microbiol. Acad. Sci., Hung., 17 : 35-48). La souche immunotype Fisher 1 de P. aeruginosa a été incluse comme témoin, parce que cette souche est non flagellée, comme l'indique la coloration avec une teinture mordante (Manual of Clin. Microbiol., 1985, Lennette, éd. Amer. Soc. Microbiol., Wash., D.C., p. 1099). Les cellules hybrides dans le puits FA6 IIG5 produisaient un anticorps qui se liait à Habs 6 et Habs 9 (deux souches portant des flagelles de type a), mais pas à l'immunotype Fisher 1.

Les cellules provenant du puits FA6 IIG5 ont été sous-cultivées et clonées, comme décrit dans les exemples précédents. L'anticorps monoclonal et la lignée cellulaire clonale provenant de ce puits sont tous deux identifiés par la désignation FA6 IIG5 dans le texte ci-après. De l'ascite a été produite dans des souris BALB/c comme décrit dans l'exemple 2.

Spécificité de FA6 IIG5.

La spécificité de l'anticorps FA6 IIG5 a été déterminée par immunofluorescence indirecte et immunoblotting. L'immunofluorescence indirecte a été réalisée essentiellement comme décrit dans l'exemple 2, avec les modifications suivantes.

Des cultures de bactéries ayant crû durant la nuit sur de l'agar au trypticase-soya à 30°C ont été prélevées sur les plaques avec des écouvillons de coton et remises en suspension dans du PBS jusqu'à une valeur de l'absorbance à 660 nm de 0,2 unité D.O. De la

formaline [à une concentration finale de 0,37% (v/v) dans du PBS] a été ajoutée à la suspension sous agitation. Après une incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, les bactéries ont été diluées dans du PBS dans une proportion de 1:12 et 20 μ litres de cette suspension ont été placés dans des puits individuels de lames de Carlson. Après séchage, les lames ont été préparées pour l'observation comme décrit dans l'exemple 2. La source d'anticorps était formée de surnageants de cultures de la lignée cellulaire FA6 IIG5.

La coloration fluorescente par l'anticorps FA6 IIG5 a été observée sur les seules souches de P. aeruginosa portant des flagelles de type a, mais sur aucune de celles portant le type b. L'image fluorescente observée était une ligne sinusoïdale indiquant que FA6 IIG5 se lie aux flagelles. Le signal fluorescent était augmenté par traitement des bactéries avec de la formaline, mais ce traitement n'était pas requis pour visualiser la coloration flagellaire avec l'anticorps.

L'immunoblotting a été réalisé comme décrit dans l'exemple 2. Les sources d'antigènes de flagelles de type a étaient les préparations flagellaires purifiées (voir le présent exemple). Les antigènes ont été séparés dans des gels à 10% de polyacrylamide contenant du SDS [Laemmli, U.K., 1970, Nature (London), 227 : 680-685] et transférés sur une MNC. Les préparations de FA6 IIG5, soit le surnageant de culture, soit l'ascite diluée 1:1.000 ont été mis à réagir avec la MNC, et la réaction détectée avec un réactif approprié conjugué à une enzyme et un substrat d'enzyme, comme décrit dans l'exemple 2. L'immunoblotting a illustré que FA6 IIG5 se lie spécifiquement à la flagelline de P.M. 51.700 de Habs 6 et à la flagelline de P.M. 47.200

de Habs 8.

La confirmation du fait que FA6 IIG5 réagit seulement avec le flagelle de type a et non de type b, a été obtenue par ELISA, auxquelles fins les souches Habs 1-12 ont été liées individuellement avec PLL aux puits de plaques de microtitration à 96 puits Linbro. L'antigène se liait seulement aux souches Habs 1, 6, 8 et 9, qui sont les seules souches portant des flagelles de type a parmi les douze (voir, Ansorg, R. et al., 1984, J. Clin. Microbiol., 20 : 84-88, et cité ici en référence). Les études de protection in vivo sont présentées dans l'exemple 4 suivant.

EXEMPLE 4.-

L'exemple 4 illustre la protection de souris passivement immunisées avec les anticorps PaF4 IVE8 et FA6 IIG5 contre une infection par P. aeruginosa sur modèle de souris brûlée.

Les anticorps monoclonaux antiflagelles ont été testés sur modèle de souris brûlée suivant le procédé de M.S. Collins et R.E. Roby (1983, J. Trauma, 23 : 530-534, qui est cité ici en référence). Pour les études de protection, tous les anticorps ont été purifiés par chromatographie protéine A-Sépharose (Ey, P.L. et al., 1978, Immunochemistry, 15 : 429-436, qui est cité ici en référence) et dialysés contre du tampon PBS. La souche portant des flagelles de type a utilisée dans les essais sur animaux était P. aeruginosa PA220 (acquise chez le Dr. James Pennington, Boston, MA) et la souche à flagelles de type b était l'immunotype Fisher 2 de P. aeruginosa (A.T.C.C. n° 27313) de référence.

40 g d'anticorps monoclonal purifié ont été donnés, par voie intraveineuse par souris, une à deux heures avant la brûlure et l'injection infectante. Immédiatement après la brûlure, les animaux ont reçu

sous escarre 0,5 ml de PBS froid contenant les bactéries injectées. La dose injectée était d'environ 10 DL₅₀ pour chaque organisme. Les résultats des essais sur animaux sont présentés dans les tableaux I et II.

TABLEAU I

Etude de la protection par un anticorps monoclonal
antiflagelles type a sur modèle de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FA6 IIG5, antiflagelles a	100	100	100	100	100	90	90	80	80
PaF4 IVE8, antiflagelles b	100	20	10	10	10	10	10	10	10
Anticorps monoclonal non spécifique anti-LPS	100	40	30	20	10	10	10	10	10
PBS, sans bactéries	80	80	80	80	80	80	80	80	80

1. Les souris ont été infectées sous escarre par environ 10 DL₅₀ de P. aeruginosa PA220.
2. Le pourcentage est basé sur la survie de souris dans des groupes de dix animaux, à l'exception du groupe de contrôle recevant du PBS seulement, qui consistait en cinq souris. Les jours sont après brûlure et injection infectante.

TABLEAU II

Etude de la protection par un anticorps monoclonal
antiflagelles type b sur modèle de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PaF4 IVE8, antiflagelles b	100	100	90	90	90	90	90	90	90
FA6 IIG5, antiflagelles a	100	20	10	10	10	10	10	10	10
Anticorps monoclonal non spécifique anti-LPS	100	20	20	20	20	20	20	20	20
PBS, sans bactéries	100	100	100	100	100	100	100	100	100

1. Les souris ont été infectées sous escarre par environ 10 DL₅₀ de l'immunotype Fisher 2 de P. aeruginosa.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de dix, à l'exception du groupe de contrôle recevant du PBS seulement, qui consistait en cinq souris. Les jours sont après brûlure et injection infectante.

Une survie très significative a été observée chez les souris traitées avec l'anticorps anti-a ou l'anticorps anti-b et ensuite infectées par injection de l'antigène correspondant. Réciproquement, 80-90% des souris non traitées, mais injectées, ou des animaux traités avec un anticorps monoclonal antiflagellaire non réactif ou un anticorps non spécifique anti-LPS, mourraient. L'incapacité de l'anticorps antiflagelles de type a de protéger les souris contre une injection létale d'immunotype Fisher 2 de P. aeruginosa portant des flagelles de type b, et l'incapacité de l'anticorps antiflagelles de type b de protéger les souris contre une injection létale de P. aeruginosa PA220 du type a, corroboraient in vivo la spécificité des anticorps observée in vitro. La survie des souris brûlées, mais non infectées, indiquait que la brûlure elle-même n'était pas létale.

EXEMPLE 5.-

L'exemple 5 démontre la réactivité croisée considérable de PaF4 IVE8 et FA6 IIG5 avec des isolats cliniques de P. aeruginosa, ce qui prouve l'utilité clinique de ces anticorps dans l'immunothérapie des infections à P. aeruginosa.

Des isolats cliniques ont été obtenus dans des hôpitaux et cliniques. Les isolats provenaient de divers sites de prélèvement, notamment le sang, des plaies, l'appareil respiratoire, l'urine et les oreilles. Un total de 157 isolats a été examiné.

PaF4 IVE8 s'est lié spécifiquement à 34 isolats cliniques (22%), tandis que l'anticorps pour les flagelles de type a ou FA6 IIG5, s'est lié à 102 isolats cliniques (65%), soit un total de 136 des 157 isolats (87%). Parmi les 21 souches qui n'étaient reconnues par aucun des deux anticorps, 19 étaient non flagellées, comme l'indique la coloration avec une

teinture mordante. Dès lors, les deux anticorps en combinaison se lient avec 136 des 138 (98%) des isolats cliniques flagellés, confirmant les rapports antérieurs (voir, Ansorg, R., 1978, Zbl. Bakt, Hyg. I Abt. Orig. A, 242 : 228-238, qui est cité ici en référence).

EXEMPLE 6.-

L'exemple 6 illustre le procédé pour la production d'anticorps monoclonaux humains qui se lient aux flagelles de type b de P. aeruginosa.

Un échantillon de sang périphérique recueilli chez un individu immunisé avec une préparation de polysaccharide de haut poids moléculaire (Pier et al., 1984, Infect. Immun., 45 : 309) a servi de source de cellules B. Les cellules mononucléaires ont été séparées du sang par des techniques courantes de centrifugation sur Ficoll-Paque [Boyum (1968) Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 : 77] et lavées deux fois dans un tampon phosphaté salin exempt de calcium et de magnésium (PBS).

Les cellules mononucléaires ont été débarrassées des cellules T suivant un mode opératoire modifié pour former des rosettes E. En bref, les cellules ont d'abord été remises en suspension jusqu'à une concentration de 1×10^7 cellules par ml dans du PBS contenant 20% de sérum foetal de veau (SFV) à 4°C. 1 ml de cette suspension a ensuite été placé dans un tube à fond rond en polystyrène de 17 x 100 mm et on y a ajouté 1×10^9 globules rouges de mouton traités avec du bromure de 2-amino-isothiouronium (AET) provenant d'une solution à 10% (v/v) dans du milieu de Dulbecco modifié suivant Iscove (milieu d'Iscove) [Madsen et Johnson (1979), J. Immun. Methods, 27 : 61]. La suspension a été mélangée doucement pendant 5-10 minutes à 4°C et les cellules en rosette E ont été ensuite séparées par centrifugation sur Ficoll-Paque

durant 8 minutes à 2.500 g à 4°C. Les cellules mononucléaires du sang périphérique rosette E négatives (CMSPE⁻) se présentant en bande à l'interface ont été recueillies et lavées une fois dans du milieu d'Iscove et remises en suspension dans le même milieu contenant du SFV 15% (v/v), de la L-glutamine (2 mmoles par litre), de la pénicilline (100 Unités Internationales par ml), de la streptomycine (100 µg/ml), de l'hypoxanthine (1×10^{-4} M), de l'aminoptérine (4×10^{-7} M) et de la thymidine ($1,6 \times 10^{-5}$ M). Ce milieu est dit ci-après milieu HAT.

La transformation avec entraînement cellulaire des CMSPE⁻ a été accomplie en cocultivant ces cellules avec une lignée de cellules transformantes. La lignée de cellules transformantes était une lignée de cellules lymphoblastoïdes humaines positives pour l'antigène nucléaire d'Epstein-Barr (EBNA) dérivée par mutagénèse au méthanesulfonate d'éthyle (EMS) de la lignée de cellules lymphoblastoïdes GM 1500, suivie d'une sélection en présence de 30 µg/ml de 6-thioguanine pour rendre les cellules déficientes en hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransférase (HGPRT) et donc sensibles au HAT. Cette lignée cellulaire est dénommée lignée cellulaire IA2 et a été déposée à l'American Type Culture Collection (A.T.C.C.) le 29 mars 1982 sous le n° A.T.C.C. CRL 8119. Des cellules IA2 en phase de croissance logarithmique ont été remises en suspension dans du milieu HAT et ensuite combinées avec les CMSPE⁻ avec une proportion de 15 cellules IA2 par CMSP. Le mélange de cellules a été mis sur plaque dans 30 plaques de microtitration de 96 puits à fond rond (Costar 3799) à une concentration de 32.000 cellules par puits dans un volume de 200 µlitres par puits, et incubé à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 6% de CO₂. Les cultures ont été nourries aux jours 5 et

8 après la mise sur plaque par remplacement de la moitié du surnageant par du milieu HAT frais. Seize jours après la mise sur plaque, 100% des puits contenaient des cellules proliférantes et, dans la plupart des puits, les cellules étaient d'une densité suffisante pour la collecte et l'examen des surnageants pour des anticorps anti-P. aeruginosa.

Les surnageants ont été examinés pour la présence d'anticorps anti-P. aeruginosa en utilisant la technique ELISA telle que décrite dans l'exemple 2, avec les modifications suivantes. Un rassemblement des sept souches immunotypes Fisher de référence (A.T.C.C n° 27312-27318) ($A_{660} = 0,2$ unité D.O.) a été lié à des plaques de microtitration à 96 puits à fond plat (Immulon II, Dynatech), prétraité avec de la poly-L-lysine, incubé et lavé, comme décrit dans l'exemple 2. Après le blocage des sites de liaison non spécifiques et le lavage des plaques, 50 μ litres de PBS contenant 0,1% (v/v) de Tween-20 et 0,2% de BSA (p/v) ont été ajoutés par puits. Les surnageants de cultures (50 μ litres) ont alors été répliqués sur plaque dans les puits correspondants de plaques d'essai et dans des plaques de contrôle qui avaient été traitées avec de la PLL et bloquées, mais exemptes de bactéries. Après incubation et lavage, des anticorps de seconde étape conjugués à une enzyme (50 μ litres par puits), de l'IgG de chèvre antihumaine conjuguée avec de la peroxydase de raifort, et de l'IgM de chèvre antihumaine ou dilution appropriée dans du PBS contenant du Tween-20 0,1% (v/v) et du BSA 0,2% (p/v), ont été ajoutés aux puits et l'essai a été mené à son terme, comme décrit dans l'exemple 2.

Les surnageants contenant l'anticorps qui se liait au rassemblement d'immunotypes Fisher, mais non à la plaque de contrôle, ont été testés une seconde fois

en utilisant séparément chacune des bactéries des sept immunotypes Fisher. L'anticorps présent dans le surnageant d'un puits, 20H11, se liait uniquement aux immunotypes Fisher 2, 6 et 7 de P. aeruginosa. Les cellules ont été sous-cultivées d'une manière répétée à des densités de cellules décroissantes jusqu'à ce que tous les puits avec une croissance sécrètent de l'anticorps. La lignée cellulaire et l'anticorps monoclonal (isotope IgM) sont tous deux identifiés par la désignation 20H11 dans le texte ci-après.

Une seconde transformation a été réalisée, dans laquelle la source des cellules B était le sang périphérique d'un patient souffrant d'une fibrose kystique, connu pour avoir eu une infection chronique à P. aeruginosa. Les CMSPE⁻ ont été préparées, comme décrit ci-dessus, et cocultivées avec la lignée de cellules transformantes, 1A2, dans une proportion dans 72 cellules 1A2 par CMSPE⁻. Le mélange de cellules a été mis sur plaque dans 15 plaques de microtitration de 96 puits à fond rond à une concentration de $7,4 \times 10^4$ cellules par puits et cultivé comme ci-dessus.

Les surnageants ont été testés par ELISA pour la présence d'anticorps anti-P. aeruginosa seize jours après que la transformation ait été mise sur plaque. L'essai a été réalisé comme décrit pour la transformation précédente, excepté que le rassemblement de souches de P. aeruginosa utilisé pour l'examen initial était composé des souches immunotypes Fisher F2, F4, F6 et F7 de référence (A.T.C.C. n° 27313, 27315, 27316 et 27317), outre trois isolats cliniques provenant de la Genetic Systems Corporation Organism Bank (GSCOB) qui avaient des immunotypes LPS et types de flagelles différents. L'isolat clinique PSA 1277 (GSCOB) porte des flagelles de type a et l'immunotype Fisher 1 LPS;

le second isolat PSA G98 (GSCOB) porte des flagelles de type a et l'immunotype Fisher 3 LPS; et le troisième, PSA F625 (GSCOB), porte des flagelles de type b et l'immunotype Fisher 5 LPS. Ce mélange de souches de référence et d'isolats cliniques est appelé rassemblement de P. aeruginosa flagellé. Les surnageants contenant l'anticorps qui se liait aux plaques contenant le rassemblement de P. aeruginosa flagellé, mais non aux plaques de contrôle couvertes de PLL, ont été testés par ELISA une seconde fois sur les souches individuelles du rassemblement. Un puits, 3C1, se liait aux souches de référence F2, F6 et F7 et à l'isolat clinique F625.

Le clonage des lignées de cellules 3C1 a été accompli en sous-cultivant d'abord les cellules en deux tournées de sous-cultures à basse densité, d'abord à 20 cellules par puits de plaques à 96 puits, puis par la culture à 2 cellules par puits. Le clonage formel des cellules produisant l'anticorps spécifique a été réalisé en mettant sur plaque les cellules à une densité d'environ 1 cellule par puits dans des plaques Terasaki à 72 puits (Nunc n° 1-36538) dans un volume de 10 μ litres par puits de milieu HAT exempt d'aminoptérine (milieu HT). Les plaques ont été placées dans un incubateur pendant 2 à 3 heures pour permettre aux cellules de sédimenter au fond des puits et ensuite examinées au microscope par deux préposés pour la recherche des puits contenant une cellule unique. Les puits ont été nourris quotidiennement avec du milieu HT et, quand la croissance était suffisante, les cellules ont été transférées vers une plaque à 96 puits à fond rond. Tous les puits avec une croissance ont été testés par ELISA sur des souches de P. aeruginosa portant les flagelles de type b et tous se sont révélés produire l'anticorps approprié. La lignée de cellules et l'anti-

corps monoclonal (isotype IgM) sont tous deux identifiés par la désignation 3C1 dans le texte ci-après.

L'antigène identifié par 20H11 et 3C1 était formé par des flagelles, comme l'indiquent l'immunofluorescence indirecte et l'immunoblotting. Les techniques ont été réalisées fondamentalement comme décrit dans les exemples 2 et 3. Pour le test d'immunofluorescence indirecte, des souches de P. aeruginosa portant des flagelles de type b, immunotypes Fisher F2, F6 et F7 de référence (A.T.C.C. n° 27313, 27317 et 27318) et une souche portant des flagelles de type a, immunotype Fisher 4 de référence (A.T.C.C. n° 27315) ont été préparées comme décrit dans l'exemple 3. Le type de flagelles des souches de référence a été déterminé par typage avec les anticorps monoclonaux murins PaF4 IVE8 et FA6 IIG5. Les lames ont été préparées pour l'observation comme décrit dans l'exemple 2. Les sources des deux anticorps ont été les surnageants de cultures, et le réactif conjugué à de l'ITCF était de l'Ig de chèvre antihumaine conjuguée à de l'ITCF (polyvalent) (Tago, Burlingame, CA) en dilution 1:100 dans du PBS contenant 0,5% (p/v) de gammaglobulines bovines (Miles Scientific, Cat., n° 82-041-2, Naperville, IL) et de l'azide sodique 0,1% (p/v) comme antiputride.

La coloration fluorescente par les anticorps 20H11 et 3C1 a été observée uniquement avec les souches de P. aeruginosa portant des flagelles de type b et pas avec la souche portant des flagelles de type a, l'immunotype Fisher 4 de référence. L'image fluorescente observée était une image linéaire sinusoïdale émanant d'une extrémité de la bactérie, indiquant que les anticorps se liaient aux flagelles des bactéries.

L'immunoblotting a été réalisé comme décrit dans l'exemple 2. Les flagelles de type b purifiés à

partir de la souche immunotype Fisher 2 de référence de P. aeruginosa (A.T.C.C. n° 27313) et les flagelles de type a purifiés à partir des souches Habs 6 et Habs 8 de référence (A.T.C.C. n° 33353 et 33355) ont été préparés comme décrit dans l'exemple 3. Les antigènes ont été séparés sur un gel à 10% de polyacrylamide (voir exemple 3) et transférés sur une MNC. Les surnageants de cultures contenant les anticorps 20H11 ou 3C1, le surnageant de culture contenant un anticorps non spécifique humain et les milieux de culture ont été incubés avec la MNC et la réaction a été détectée avec une Ig de chèvre antihumaine conjuguée avec de la phosphatase alcaline (polyvalente) (Tago, Burlingame, CA) diluée dans du PBS contenant du Tween-20 0,05% (v/v). Le substrat d'enzyme a été préparé comme décrit dans l'exemple 2. L'immunoblotting a montré que les deux antigènes se liaient à la protéine flagelline de PM 53.000 de l'immunotype Fisher 2 et pas à la protéine flagelline de PM 51.700 de Habs 6, ni à la protéine flagelline de PM 47.200 de Habs 8. Aucune réaction n'a été observée ni avec l'anticorps non spécifique humain, ni avec les milieux de culture.

Une confirmation supplémentaire que les anticorps 20H11 et 3C1 se liaient seulement aux flagelles de type b et pas au type a, a été obtenue par ELISA, auxquelles fins les souches Habs 1-12 ont été liées individuellement avec de la PLL d'un puits de plaque de microtitration Immulon à 96 puits. Les anticorps se liaient seulement aux souches Habs 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11 et 12, qui sont des souches portant le type b (Ansorg et al., (1984) J. Clin. Microbiol., 20 : 84).

EXEMPLE 7.-

L'exemple 7 illustre des procédés pour la production d'un anticorps monoclonal humain qui se lie aux flagelles de type a de P. aeruginosa.

Un échantillon de sang périphérique recueilli chez un individu immunisé avec une préparation de polysaccharide de haut poids moléculaire (Pier et al. (1981) Infect. Immun., 34 : 461) a servi de source de cellules B. Les cellules mononucléaires ont été séparées à partir du sang et ensuite débarrassées des cellules T comme décrit dans l'exemple 6. Les cellules ont alors été gelées dans du SFV contenant 10% de diméthylsulfoxyde dans une cuve à vapeur d'azote liquide. A une date ultérieure, les cellules ont été dégelées rapidement à 37°C, lavées une fois dans du milieu d'Iscove et remises en suspension dans du milieu HAT. La transformation avec entraînement cellulaire a été accomplie en cocultivant les CMSPE⁻ avec des cellules 1A2 dans une proportion de 30 cellules 1A2 par CMSPE⁻. Le mélange de cellules a été mis sur plaque dans 30 plaques de culture de tissu à 96 puits à une concentration de 62.000 cellules par puits. Les cellules ont été nourries le septième jour après la mise sur plaque par remplacement de la moitié du volume par du milieu HAT. La prolifération des cellules a été observée dans 100% des puits le quatorzième jour après la mise sur plaque et les surnageants ont été extraits des puits et testés à ce moment.

Les surnageants ont été testés par ELISA pour la présence d'anticorps anti-P. aeruginosa en utilisant le rassemblement de P. aeruginosa flagellé et des plaques traitées par PLL comme contrôle de la façon décrite dans l'exemple 6. Les surnageants contenant des anticorps qui se liaient au rassemblement flagellé, mais pas aux plaques PLL de contrôle, ont été testés de nouveau sur les souches de bactéries individuelles du rassemblement flagellé. Un puits, 21B8, contenait un anticorps qui se liait à PSA I277, PSA G98 et l'immunotype Fisher 4 de référence, qui sont les trois

souches du rassemblement flagellé qui portent des flagelles de type a.

Le clonage de la lignée de cellules 21B8 a été accompli comme décrit dans l'exemple 6 pour la lignée de cellules 3C1 avec les modifications suivantes à l'étape de clonage formel. Après que les puits des plaques de Terasaki aient été notés pour la présence d'une cellule unique seulement, chaque cellule a été transférée de la plaque de Terasaki à un puits individuel d'une plaque de culture de 96 puits à fond rond, dans un volume de 100 μ litres de milieu HAT exempt d'aminoptérine (milieu HT). Des cellules lymphoblastoïdes non transformantes sensibles au HAT ont été incluses dans tous les puits à une densité de 500 cellules par puits en tant que cellules nourricières. Cinq jours après la mise sur plaque, 100 μ litres de milieu HAT ont été ajoutés aux puits pour tuer sélectivement les cellules nourricières. Les puits ont encore été nourris aux jours 7 et 9 après la mise sur plaque par remplacement de la moitié du surnageant par du milieu HAT. Les cellules ont alors été nourries avec du milieu HT jusqu'à ce que les cellules soient d'une densité suffisante pour détecter la présence d'un anticorps par ELISA. Tous les puits avec une croissance produisaient de l'anticorps qui se liait aux souches de P. aeruginosa portant des flagelles de type a. La lignée de cellules et l'anticorps monoclonal (isotype IgG₁) sont tous deux identifiés sous la désignation 21B8 dans le texte ci-après.

L'antigène identifié par 21B8 était formé des flagelles, comme l'indiquent l'immunofluorescence indirecte et l'immunoblotting (voir exemple 6 pour les descriptions des techniques). La coloration fluorescente par l'anticorps 21B8 a été observée uniquement avec la souche immunotype Fisher 4 de référence de

P. aeruginosa (A.T.C.C. n° 27315) qui porte des flagelles de type a, et pas avec la souche immunotype 2 de référence de P. aeruginosa (A.T.C.C. n° 27313) qui porte des flagelles de type a. L'image fluorescente observée était une image linéaire sinusoïdale émanant d'une extrémité des bactéries indiquant que l'anticorps se liait aux flagelles de la bactérie.

L'immunoblotting a été réalisé comme décrit dans l'exemple 2. Des flagelles de type a purifiés provenant de la souche Habs 6 de référence de P. aeruginosa (A.T.C.C. n° 33353) et des flagelles de type b provenant de la souche immunotype Fisher 2 de référence de P. aeruginosa (A.T.C.C. n° 27313) ont été préparés comme décrit dans l'exemple 3. Les antigènes ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 10% (voir exemple 3) et transférés sur une MNC. Les surnageants de cultures contenant soit 21B8, soit un anticorps humain non spécifique, et les milieux de culture ont été mis à réagir avec la MNC et la réaction a été détectée avec une Ig de chèvre antihumaine conjuguée à une phosphatase alcaline (polyvalente) et un substrat d'enzyme comme décrit dans les exemples 2 et 6. L'immunoblotting a illustré que l'anticorps 21B8 se liait seulement à la protéine flagelline de PM 51.700 de Habs 6 et pas à la protéine flagelline de PM 53.000 de l'immunotype Fisher 2. Aucune réaction n'a été observée ni avec l'anticorps humain non spécifique, ni avec les milieux de culture.

EXEMPLE 8.-

L'exemple 8 illustre la protection de souris immunisées passivement avec des anticorps humains antiflagelles 20H11, 3C1 et 21B8, contre l'injection infectante de P. aeruginosa sur modèle de souris brûlée.

Les anticorps monoclonaux humains anti-

flagelles ont été testés sur modèle de souris brûlée (voir exemple 4). Les anticorps 21B8 et 20H11 ont été préparés par précipitation de surnageants de cultures obtenus à partir des lignées de cellules respectives avec du sulfate d'ammonium (concentration finale 50%) (Good et al., Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell, B.B. et Shiigi, S.M. éd., W.J. Freeman et Co., San Francisco, CA, 1980, 279-286). Le précipité a été solubilisé dans du PBS, dialysé contre du PBS durant la nuit à 4°C et ensuite filtré d'une manière stérile avant l'administration aux animaux. La source de l'anticorps 3C1 et celle de l'anticorps non spécifique anti-LPS utilisé comme contrôle négatif dans cette étude étaient des surnageants de cultures. Le contrôle positif pour chaque étude était l'anticorps monoclonal murin purifié approprié PaF4 IVE8 ou FA6 IIG6.

La souche portant des flagelles de type a utilisée dans les essais sur animaux était l'isolat clinique PSA A522 (GSCOB) qui exprime l'immunotype Fisher 1 LPS et la souche à flagelles de type b était l'isolat clinique PSA A447 (GSCOB) qui exprime l'immunotype Fisher 6 LPS. Les anticorps humains (0,45 ml) ont été prémélangés avec les bactéries (plus de 5 DL₁₀₀ dans 0,05 ml) et inoculés sous escarre immédiatement après que la brûlure soit administrée. Les résultats des essais sur animaux sont présentés dans les tableaux III, IV et V.

TABLEAU III

Etude de la protection par l'anticorps monoclonal humain 21B8 anti-flagelles type a dans le modèle de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FA6 IIG5, murin anti-flagelles a ³	100	100	100	100	88	88	88	88	88
21B8, humain anti-flagelles a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
20H11 humain anti-flagelles b	100	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS,	100	25	12	12	12	12	12	12	12

1. Les souris ont été infectées sous escarre par plus de 5 DL₁₀₀ de P. aeruginosa PA220.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de huit animaux. Les jours sont après brûlure et injection infectante.
3. L'anticorps purifié (10 µg dans 0,45 ml PBS) a été prémélangé avec les bactéries et administré sous escarre après la brûlure et l'injection infectante.

TABLEAU IV

Etude de la protection par l'anticorps monoclonal humain 20H11 anti-flagelles type b dans le modèle de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PaF4 IVE8, murin, anti-flagelles b ³	100	100	100	100	100	100	100	100	100
20H11, humain anti-flagelles b	100	100	100	100	100	100	100	100	100
21B8 humain anti-flagelles a	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Milieux	80	0	0	0	0	0	0	0	0

1. Les souris ont été infectées sous escarre par plus de 5 DL₁₀₀ de l'isolat clinique PSA A447 de P. aeruginosa.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de cinq animaux. Les jours sont après brûlure et injection infectante.
3. L'anticorps purifié (10 µg dans 0,45 ml de PBS) a été prémélangé avec les bactéries et administré sous escarre après la brûlure et l'injection infectante.

TABLEAU V

Etude de la protection par l'anticorps monoclonal
humain 3C1 anti-flagelles type b dans le modèle
de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PaF4 IVE8, murin, anti-flagelles b ³	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3C1, humain anti-flagelles b	100	100	80	80	80	80	80	80	80
Anticorps monoclonal non spécifique anti-LPS	100	0	0	0	0	0	0	0	0

1. Les souris ont été infectées sous escarre par 5 DL₁₀₀ de PSA A447.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de cinq animaux. Les jours sont après brûlure et injection infectante.
3. L'anticorps purifié (40 µg) a été administré par voie intraveineuse deux heures avant la brûlure et l'injection infectante.

Une survie significative a été observée chez les souris traitées avec l'anticorps antifiagelles de type a ou bien avec l'un ou l'autre des anticorps antifiagelles de type b et ensuite infectées par injection de l'antigène correspondant. Réciproquement, 88-100% des souris non traitées, mais injectées, ou celles traitées avec un anticorps antifiagellaire non réactif ou avec un anticorps non spécifique anti-LPS, mourraient. Comme il a été observé avec les anticorps monoclonaux murins (voir exemple 4), les anticorps humains antifiagelles protègent spécifiquement contre une injection létale uniquement pour les organismes portant le type de flagelles correspondant, c'est-à-dire que l'anticorps humain antifiagelles de type a protège contre une injection létale de l'organisme portant des flagelles de type a et non de type b, et que les anticorps antifiagelles de type b protègent les souris injectées avec des souches portant des flagelles de type b, mais non de type a.

EXEMPLE 9.-

L'exemple 9 illustre la réactivité croisée des anticorps humains antifiagelles 20H11, 3C1 et 21B8 avec des isolats cliniques de P. aeruginosa.

Des isolats cliniques de P. aeruginosa (115) obtenus dans des hôpitaux et cliniques et isolés primitivement à partir de plaies brûlées et de sang ont été identifiés comme portant des flagelles de type a ou de type b, en typant avec les anticorps monoclonaux murins FA6 IIG5 ou PaF4 IVE8 (voir exemples 2, 3 et 5). Cinquante-cinq des isolats cliniques ont été identifiés comme portant des flagelles de type a par leur réaction avec l'anticorps monoclonal murin FA6 IIG5, et 59 ont été identifiés comme portant le type b par leur réaction avec l'anticorps monoclonal murin PaF4 IVE8.

La réactivité croisée de l'anticorps mono-

clonal humain antiflagelles de type a, 21B8, était considérable du fait que l'anticorps a reconnu 54 des 56 isolats cliniques portant des flagelles de type a (96%). La réactivité croisée de 20H11 avec les isolats portant des flagelles de type b était considérable aussi du fait que 20H11 a reconnu tous les 59 isolats (100%). Au contraire, l'autre anticorps monoclonal antiflagelles de type b, 3C1, se liait uniquement à 43 des 59 isolats (73%). Ces résultats démontrent que 20H11 se lie à un épitope pan-réactif (c'est-à-dire un épitope présent sur au moins environ 95% des souches flagellées de P. aeruginosa), tandis que 3C1 se lie à un épitope non présent sur toutes les molécules de flagelline de type b. Bien que l'antigène des flagelles de type b apparaisse sérologiquement uniforme quand il est analysé avec des antisérums polyclonaux (Lanvi, B., supra, et Ansorg R., supra), les modèles de réactivité croisée de 20H11 et de 3C1 montrent de façon surprenante que le type b des flagelles comprend au moins deux épitopes séparés qui peuvent être identifiés par anticorps monoclonaux.

La réactivité croisée considérable des anticorps 21B8 et 20H11 avec les isolats cliniques de P. aeruginosa indique l'utilité clinique particulière de ces anticorps dans l'immunothérapie des infections à P. aeruginosa.

EXEMPLE 10.-

L'exemple 10 illustre des procédés pour la production d'un autre anticorps monoclonal humain exemplaire qui se lie aux flagelles de type b de P. aeruginosa, de même que l'activité protectrice de l'anticorps contre l'infection par P. aeruginosa sur modèle de souris brûlée.

Une lignée de cellules transformées a été préparée et clonée essentiellement comme décrit dans

l'exemple 7, excepté que le mélange de cellules transformées a été mis sur plaque dans 20 plaques de culture de tissu à 96 puits, à une concentration d'environ 2250 CMSPE⁻ par puits. Les surnageants ont été initialement testés par ELISA sur le rassemblement flagellé comme décrit dans l'exemple 6, excepté que les souches immunotypes Fisher 2 et 4 de référence étaient absentes du rassemblement. Les puits positifs ont été testés ensuite sur chaque souche du rassemblement flagellé comprenant les immunotypes Fisher 2 et 4. La lignée de cellules isolées finalement et l'anticorps monoclonal (isotype IgG) sont tous deux identifiés par la désignation 12D7 dans le texte ci-après.

L'anticorps monoclonal humain 12D7 a révélé une réactivité croisée considérable avec des isolats de type a, en reconnaissant 54 des 56 isolats cliniques portant des flagelles de type a testés (96%). L'activité protectrice de l'anticorps monoclonal 12D7 ressort du tableau VI. Les études de protection ont été réalisées essentiellement comme décrit dans l'exemple 4, excepté que la dose injectée était de 1 DL₁₀₀ et que la souche injectée était I624, qui est un isolat clinique exprimant l'immunotype Fisher 2 LPS et le type a des flagelles.

TABLEAU VI

Etude de la protection par l'anticorps monoclonal humain 12D7 anti-flagelles type a dans le modèle de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
12D7, humain, anti-flagelles a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2H9, humain anti-Fisher 2 LPS	90	90	90	90	90	90	90	90	90
11G5 murin anti-flagelles a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15F4 humain, anti-flagelles b	100	37,5	25	25	25	25	25	25	25

1. Les souris ont été infectées sous escarre par 1 DL_{100} (950 CFU) de P. aeruginosa.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de dix animaux, excepté pour le groupe 15F4 où N=8. Les jours sont après brûlure et injection infectante.
3. L'anticorps purifié ($50 \mu\text{g}$ dans 0,5 ml de PBS) a été administré par voie intrapéritonéale avant la brûlure et l'injection infectante.

EXEMPLE 11.-

L'exemple 11 illustre la production d'un anticorps monoclonal humain réactif avec les flagelles de type b de P. aeruginosa et la protection de souris immunisées passivement par cet anticorps contre une infection par injection de P. aeruginosa sur modèle de souris brûlée.

Une lignée de cellules transformées a été préparée et clonée essentiellement comme décrit dans l'exemple 10, sauf que le rapport de 1A2 aux cellules B pour la transformation était d'environ 60:1 et que le mélange de cellules transformées a été mis sur plaque dans 15 plaques à une concentration d'environ 1930 CMSPE⁻ par puits. De même, les cellules ont été testées sur un rassemblement de souches de P. aeruginosa comprenant G98 (immunotype Fisher 3, flagelles de type a) et I739 (un isolat clinique de l'immunotype Fisher 5, flagelles de type b) et confirmées sur un rassemblement différent de souches de P. aeruginosa : I277, G98, I739 et les immunotypes Fisher F2, F4, F6 et F7. La lignée de cellules isolées finalement et l'anticorps monoclonal sécrété (isotype IgG₁) sont tous deux désignés sous l'appellation 2B8 dans le texte ci-après.

Un test d'immunofluorescence réalisé avec 2B8 a été positif sur une souche à flagelle de type b immunotype Fisher 2, mais négatif sur une souche de référence à flagelle de type a, immunotype Fisher 4. Dans le test d'isolats cliniques 59/59 (100%) des isolats flagellés de type b se sont révélés positifs.

L'activité protectrice de 2B8 ressort du tableau VII. Les études de protection ont été réalisées comme décrit dans l'exemple 10, excepté que l'isolat clinique F164 (immunotype Fisher 4, flagelles de type b) a été utilisé pour l'infection par injection.

TABLEAU VII

Etude de la protection par l'anticorps monoclonal
humain 2B8 anti-flagelles type b dans le modèle
de souris brûlée¹.

Traitement	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2B8, humain, anti-flagelles b ³	100	89	89	89	89	89	89	89	89
PaF4 IVE8, murin anti-flagelles b ⁴	100	100	100	100	100	100	90	90	90
VH3, murin anti-Fisher 2 LPS ⁴	90	20	20	20	20	20	20	20	20

1. Les souris ont été infectées sous escarre par 1 DL₁₀₀ (10⁵ CFU) de P. aeruginosa.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de dix animaux, excepté pour le groupe 2B8 où N=9. Les jours sont après brûlure et injection infectante.
3. L'anticorps purifié (50 µg dans 0,5 ml de PBS) a été administré par voie intrapéritonéale avant la brûlure et l'injection infectante.
4. L'anticorps purifié (5 µg dans 0,5 ml de PBS) a été administré par voie intraveineuse deux heures avant la brûlure et l'injection infectante.

EXEMPLE 12.-

L'exemple 12 démontre la production d'un autre anticorps monoclonal humain réactif avec P. aeruginosa à flagelles de type b et la protection de souris immunisées passivement par cet anticorps contre une infection par injection de P. aeruginosa sur modèle de souris brûlée. .

Une lignée de cellules transformées a été préparée et clonée essentiellement comme décrit dans l'exemple 7, avec les exceptions suivantes. Un individu différent a été immunisé [Pier et al., (1984) 45 : 309] et a servi de source de cellules B, et le nombre de CMSPE⁻ était d'environ 2.000 cellules par puits pour la mise sur plaque. L'examen a été réalisé sur les immunotypes Fisher 1 à 7 rassemblés. La lignée de cellules isolées finalement et l'anticorps monoclonal sécrété (isotype IgG₁) sont tous deux désignés sous l'appellation 14C1 dans le texte ci-après.

Au test clinique, 59/59 (100%) des isolats flagellés de type b se sont révélés positifs avec 14C1. Les études de protection ont été réalisées comme décrit à l'exemple 11 ci-dessus et sont indiquées au tableau VIII.

TABLEAU VIII

Etude de la protection de l'anticorps monoclonal humain 14C1 antifiagelles type b dans le modèle de souris brûlée¹.

Traitement ³	Pourcentage de survie par jour ²								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
14C1, humain, antifiagelles b	100	100	100	100	100	90	90	90	90
PaF4 IVE8, murin antifiagelles b	100	100	100	100	100	100	100	100	100
VH3 humain anti-Fisher 2 LPS	100	40	20	20	20	20	20	20	20

1. Les souris ont été infectées sous escarre par 1 DL₁₀₀ (90 CFU) de P. aeruginosa F164.
2. Le pourcentage de survie est basé sur le nombre de souris survivantes par groupe de dix animaux, excepté pour le groupe PaF4 IVE8 où N=9. Les jours sont après brûlure et injection infectante.
3. L'anticorps purifié (50 µg dans 0,5 ml de PBS) a été administré par voie intrapéritonéale avant la brûlure et l'injection infectante.

Il ressort de ce qui précède que les lignées de cellules de la présente invention constituent des moyens pour produire des anticorps monoclonaux et des fragments de ceux-ci qui sont réactifs avec les flagelles de P. aeruginosa et offrent la protection croisée contre diverses souches de P. aeruginosa. Chose surprenante, de nombreux anticorps monoclonaux réactifs avec des épitopes différents sur chaque type de flagelles ont été isolés. Les anticorps de la présente invention permettent de produire de façon plus aisée et économique des compositions prophylactiques et thérapeutiques pour l'utilisation contre des infections dues à la plupart des souches de P. aeruginosa. De plus, les lignées de cellules fournissent des anticorps qui trouvent des applications dans les tests immunologiques et d'autres modes opératoires bien connus.

Les lignées d'hybridomes de souris PaF4 IVE8 et FA6 IIG5 citées dans les exemples 2 et 3 ont été déposées à l'A.T.C.C. le 20 juin 1986 sous les références HB9129 et HB9130, respectivement.

Les lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines 20H11 et 21B8 citées dans les exemples 6 et 7 ont été déposées à l'A.T.C.C. le 23 décembre 1986 sous les références CRL 9300 et CRL 9301, respectivement.

Les lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines 12D7, 2B8 et 14C1 citées dans les exemples 10, 11 et 12 ont été déposées à l'A.T.C.C. le 12 mai 1987 sous les références CRL 9422, CRL 9423 et CRL 9424, respectivement.

Bien que la présente invention ait été décrite avec différents détails par voie d'illustration et d'exemples dans un but de clarté et compréhension, il est évident qu'elle est susceptible de diverses variantes et modifications sans sortir de son cadre.

R E V E N D I C A T I O N S

1.- Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal ou un fragment de liaison de celui-ci capable de réagir spécifiquement avec les flagelles des bactéries Pseudomonas aeruginosa.

2.- Composition suivant la revendication 1, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal ou le fragment de liaison de celui-ci inhibe la motilité des bactéries.

3.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal ou le fragment de liaison de celui-ci est protecteur in vivo.

4.- Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal capable de réagir spécifiquement avec un épitope d'une protéine flagellaire de Pseudomonas aeruginosa.

5.- Composition suivant la revendication 4, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est capable de bloquer la liaison avec l'épitope d'anticorps monoclonaux produit par les lignées cellulaires désignées sous les numéros d'accès A.T.C.C. HB9129, HB9130, CRL 9300, CRL 9301, CRL 9422, CRL 9423 et CRL 9424.

6.- Lignée cellulaire caractérisée en ce qu'elle produit un anticorps monoclonal capable de réagir spécifiquement avec des flagelles de type a ou de type b de Pseudomonas aeruginosa.

7.- Lignée cellulaire suivant la revendication 6, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est protecteur in vivo contre Pseudomonas aeruginosa.

8.- Lignée cellulaire suivant l'une quelconque

des revendications 6 et 7, caractérisée en ce qu'elle est une lignée cellulaire hybride.

9.- Lignée cellulaire suivant l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle produit des anticorps monoclonaux humains.

10.- Lignée cellulaire suivant la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est l'une de celles désignées sous les numéros d'accès A.T.C.C. HB9129, HB9130, CRL 9300, CRL 9301, CRL 9422, CRL 9423 et CRL 9424.

11.- Procédé de production d'anticorps monoclonaux spécifiques pour les protéines flagellaires de Pseudomonas aeruginosa et capables de traiter ou de prévenir des infections à Pseudomonas aeruginosa, caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'au moins une des lignées cellulaires suivant la revendication 10 et la collecte de ces anticorps.

12.- Composition pharmaceutique utile pour le traitement d'un être humain susceptible de bactériémie et/ou de septicémie, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité prophylactique ou thérapeutique d'anticorps monoclonaux produits suivant la revendication 11.

13.- Anticorps monoclonal de fragment de liaison de celui-ci, caractérisé en ce qu'il est réactif avec un épitope capable de se lier à un anticorps monoclonal produit suivant la revendication 11.

14.- Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal ou un fragment de liaison de celui-ci réactif avec un épitope capable de se lier à un anticorps monoclonal produit suivant la revendication 11.

15.- Composition comprenant un ou plusieurs anticorps monoclonaux, caractérisée en ce qu'un premier de ces anticorps monoclonaux est capable de réagir avec

un épitope des flagelles de type a ou de type b de Pseudomonas aeruginosa.

16.- Composition suivant la revendication 15, caractérisée en ce qu'un second de ces anticorps monoclonaux est capable de réagir avec un type de flagelles non réactifs avec le premier anticorps monoclonal.

17.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 15 et 16, caractérisée en ce que le premier anticorps est un anticorps monoclonal humain.

18.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 15 à 16, caractérisée en ce qu'au moins un des anticorps monoclonaux est protecteur in vivo.

19.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 14 à 18, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus une fraction de gammaglobuline provenant du plasma du sang humain et/ou un agent antibiotique.

20.- Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une composition suivant la revendication 19 et un excipient physiologiquement acceptable.

21.- Composition pharmaceutique utile pour le traitement ou la prévention d'une infection à Pseudomonas aeruginosa, caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal réactif avec une protéine flagellaire de Pseudomonas aeruginosa et protecteur in vivo, un agent antimicrobien, une fraction de gammaglobuline provenant du plasma de sang humain et un excipient physiologiquement acceptable.

22.- Composition pharmaceutique suivant la revendication 21, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal humain et que la fraction de gammaglobuline provenant du plasma de sang humain est recueillie chez des êtres humains ayant des taux

élevés d'immunoglobulines réactives avec des bactéries Pseudomonas aeruginosa et/ou des produits de celles-ci.

23.- Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins deux anticorps monoclonaux, dont chacun réagit spécifiquement avec un type différent de protéine flagellaire de Pseudomonas aeruginosa et est capable de traiter ou de prévenir les infections à Pseudomonas aeruginosa.

24.- Composition pharmaceutique suivant la revendication 23, caractérisée en ce qu'au moins un des anticorps monoclonaux est un anticorps monoclonal humain.

25.- Composition pharmaceutique suivant l'une quelconque des revendications 23 et 24, caractérisée en ce qu'elle comprend, en outre, au moins un anticorps monoclonal humain capable de réagir avec au moins un déterminant sérotypique sur une molécule de lipopolysaccharide de Pseudomonas aeruginosa et/ou un anticorps monoclonal réactif avec l'exotoxine A.

26.- Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un anticorps monoclonal humain réagissant spécifiquement avec un épitope présent sur les flagelles de Pseudomonas aeruginosa.

27.- Composition suivant la revendication 26, caractérisée en ce que l'épitope est présent sur les flagelles de type a ou les flagelles de type b, mais pas sur les deux.

28.- Composition suivant la revendication 26, caractérisée en ce que l'épitope est montré par au moins environ 70% des flagelles de type b.

29.- Composition suivant l'une quelconque des revendications 26 et 28, caractérisée en ce que l'épitope est montré uniquement par les flagelles de type b.

30.- Composition suivant la revendication 29, caractérisée en ce que l'anticorps est pan-réactif.

31.- Composition pharmaceutique utile pour le traitement d'un être humain susceptible d'infections bactériennes, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité prophylactique ou thérapeutique d'un anticorps monoclonal capable de se lier au flagelle de Pseudomonas aeruginosa, en combinaison avec un ou plusieurs des suivants : une quantité prophylactique ou thérapeutique d'un anticorps monoclonal capable de réagir avec l'exotoxine A de Pseudomonas aeruginosa; un anticorps monoclonal capable de réagir avec au moins un déterminant sérotypique sur une molécule de lipopolysaccharide de Pseudomonas aeruginosa; une fraction de gammaglobuline provenant du plasma de sang humain; une fraction de gammaglobuline provenant du plasma de sang humain montrant des taux élevés d'immunoglobulines réactives avec des bactéries Pseudomonas aeruginosa et/ou des produits de celles-ci; ou un agent antimicrobien.

32.- Composition d'anticorps monoclonal, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal a la même spécificité que l'un quelconque des anticorps monoclonaux désignés sous les appellations FA6 IIG5, Pa3 IVC2, PaF4 IVE8, 20H11 et 21B8.

33.- Composition d'anticorps monoclonal suivant la revendication 32, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est conjugué à un marqueur capable de fournir un signal détectable.

34.- Composition d'anticorps monoclonal suivant la revendication 33, caractérisée en ce que le marqueur est une substance fluorescente ou une enzyme.

35.- Procédé pour déterminer la présence de Pseudomonas aeruginosa dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend la combinaison de cet échantillon avec un anticorps monoclonal réactif avec les flagelles de Pseudomonas aeruginosa et la détection de la forma-

tion de complexes.

36.- Trousse utile dans la détection de la présence de bactéries Pseudomonas aeruginosa, caractérisée en ce qu'elle comprend une composition d'anticorps monoclonal comprenant au moins un anticorps monoclonal, dans laquelle cet anticorps réagit avec une protéine flagellaire d'un type spécifique de ces bactéries, et des marqueurs fournissant un signal détectable lié d'une manière covalente à cet anticorps ou lié à de seconds anticorps réactifs avec chaque anticorps monoclonal.