



## SUOMI-FINLAND

(FI)

### Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT 89278

C (15) Patentti n:o 1007  
Patent publiceret 12 05 1985

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 12N 5/24, C 12P 21/08, A 61K 39/395

(21) Patentihakemus - Patentansökning	852029
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	21.05.85
(24) Alkupaivä - Löpdag	21.05.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	26.11.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.05.93
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
25.05.84 US 614184 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Genetic Systems Corporation, Delaware, US; 3005 First Avenue, Seattle, Wash. 98121, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Siadak, Anthony W., 6210 First Avenue NW, Seattle, Wash. 98107, USA, (US)  
2. Lostrom, Mark E., 6408 151st Avenue NE, Redmond, Wash. 98052, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Keijo Heinonen Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä monoklonaalisen humaanivasta-aineen valmistamiseksi gram-negatiivisten bakteereiden serotyypisiä lipopolysakkaridideterminanteja kohtaan**  
**Metod för framställning av monoklonal human antikropp mot serotypiska lipopolysackaridideterminanter på gramnegativa bakterier**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 105804 (C 12N 15/00), EP A 57107 (C 12N 15/00), EP A 101039 (A 61K 39/395)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti on valmistettu transformoituja humaanilymfosyyttisolulinjoja, jotka erittävät monoklonaalisia humaanivasta-aineita gram-negatiivisten bakteereiden LPS-molekyylien serotyypisiä determinanteja kohtaan. Näiden vasta-aineiden on havaittu suojaavan homologisten bakteereiden aiheuttamia, kuolemaan johtavia ärsyksiä vastaan. Kyseessä oleva keksintö koskee myös näitä vasta-aineita sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia sekä niiden ehkäisevää että terapeuttista käyttöä ihmisillä esiintyvän, gram-negatiivisen bakteerin aiheuttamassa sairaudessa.

Humaanilymfosyyttisolulinjat, jotka erittävät monoklonaalisia humaanivasta-aineita ja reagoivat spesifisesti Pseudomonas aeruginosan Fisher-immunotyyppien 1 (C5B7), 2(6F11), 4(C5D5), 5(13C1), 6(5G2) sekä 7(8E7) kanssa, talletettiin the American Type Culture Collectioniin ja niille annettiin vastaavat A.T.C.C. vastaanottonumerot CRL 8753, CRL 8562, CRL 8754, CRL 8796, CRL 8797 sekä CRL 8795.

Enligt den föreliggande uppfinningen har man framställt transformerade humanlymfocytcellinjer, vilka utsöndrar monoklonala humanantikroppar mot serotypa determinanter på LPS-molekyler i gram-negativa bakterier. Dessa antikroppar har visats sig skydda mot letala angrepp orsakade av homologa bakterier. Föreliggande uppfinning hänför sig även till farmaceutiska sammansättningar innehållande dessa antikroppar samt deras profylaktiska och terapeutiska bruk vid behandling av gram-negativa sjukdomar hos människor.

Humanlymfocytcellinjer, vilka utsöndrar monoklonala humanantikroppar och reagerar specifikt med Pseudomonas aeruginosa Fisher-immunotyper 1 (C5B7), 2 (6F11), 4 (C5D5), 5 (13C1), 6 (5G2) samt 7 (8E7), deponerades i the American Type Culture Collection och de erhöll motsvarande A.T.C.C. mottagningsnumror CRL 8753, CRL 8562, CRL 8754, CRL 8796, CRL 8797 samt CRL 8795.

MENETELMÄ MONOKLONAALISEN HUMAANIVASTA-AINEEN VALMISTAMISEKSI  
GRAM-NEGATIIVISTEN BAKTEEREIDEN SEROTYYPPISIÄ LIPOPOLYSAKKARIDI-  
DETERMINANTTEJA KOHTAAN

KEKSINNÖN TAUSTA

Keksinnön piiri

Gram-negatiivisen bakteerin aiheuttama sairaus ja sen vakavimmat komplikaatiot ovat syynä ihmispotilaiden huomattavaan morbiditeettiin ja kuolleisuuteen.

Kirjallisuudessa esitettyjen monien tapauksen tutkiminen osoittaa, että jotkin gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttaman infektion oireet, erityisesti kuolettavat oireet liittyvät tiettyihin alttiiksi tekeviin tekijöihin. Sellaisten infektioiden esiintymistiheys on lisääntynyt vanhemmissa potilaissa sekä potilaissa, joilla on vakavia, perimmäisiä, lääketieteellisiä tiloja, kuten esimerkiksi palohaavoja, leikkaushaavoja, hitaasti paranevia haavoja, huumausaineadiktiota tai pahanlaatuisia tiloja. Nämä infektiot saattavat olla sairaalaperäisiä (esim. sairaalassa hankittuja) potilailla, jotka on sijoitettu sairaalaan pitkäksi aikaa, ja erityisesti potilailla, joille on suoritettu leikkaus, käytetty instrumentteja suonensisäisesti, tai, joille on suoritettu käsittelyjä, kuten esimerkiksi virtsaputken katetrointi, rakon tähytys, henkitorven avaus, lannepunktio ja lääkeaineiden ja liuosten suonensisäinen infuusio tai joita on hoidettu pitkän aikaa immunosuppressiivisillä aineilla, kortikosteroideilla, antimetaboliiteilla ja/tai antibiooteilla. Säteilohoito tekee myös nisäkäsikönnän alttiiksi gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttamalle infektiolle.

Gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttamissa sairauksissa useimmin tavattavien organismien joukkoon kuuluvat Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens ja erilaiset Proteus-, Bacteroides-, Providencia- ja Citrobacter-lajit

(Sonnenwirth, "The Enteric Bacilli and Similar Gram-negative Bacteria," ss.753-790, "Microbiology", toinen painos, Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., ja McCarty, M., julkaisijat Harper ja Row (1973); McCabe, W.R., "Gram-Negative Bacteremia," Adv. Intern. Med. (1974) 19:315-158; ja Kreger et al., "Gram-Negative Bacteremia III. Reassessment of Etiology, Epidemiology and Ecology in 612 Patients," Am. J. Med. (1980) 68:332-343).  
Myös muut Pseudomonas-, ja Klebsiella-lajit sekä Aeromonas-, Salmonella-, Flavobacterium-, Erwinia-, Edwardsiella-, Pectobacterium-, Acinetobacter-, Alcaligenes- ja Shigella-sukujen lajit ovat lisäsyynä merkittävään osaan ihmisillä esiintyviä, gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttamia sairauksia (Sonnenwirth, supra; McCabe, supra; Kreger et al., supra).

Muutamien viimeisten vuosikymmenien aikana antibiootit ovat valittu hoitomuoto gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttamia tauteja vastustettaessa. Jatkuva levinneisyys ja korkea sairastuvuus sekä kuolleisuus, jotka liittyvät gram-negatiivisen bakteerin aiheuttamaan sairauteen, kuitenkin tuntuvat viittaavan antibioottihoidon rajoituksiin näiden organismien aiheuttaman sairauden hoidossa ja sitä estettäessä. Katso esim., Andriole, V.T., "Pseudomonas Bacteremia: Can Antibiotic Therapy Improve Survival?", J.Lab. Clin. Med. (1978) 94: 196-199. Tämä on antanut aihetta tutkia vaihtoehtoisia esto- ja hoitomenetelmiä.

#### Aiempiä tutkimusta koskeva kuvaus

Ihmisen tai koe-eläinten aktiivinen immunisointi kokonaisia bakteerisoluja käsittävillä rokotteilla tai puhdistetuilla bakteerien endotoksiineilla johtaa spesifisten vasta-aineiden kehittymiseen, jotka vasta-aineet kohdistuvat pääasiallisesti kemiallisesti erilaisia, toistuvia oligosakkaridideterminanteja kohtaan, jotka sijaitsevat lipopolysakkaridimolekyylien pinnalla (LSP) (Luderitz et al., "Immunochemistry of O and R Antigens of Salmonella and Related

Enterobacteriaceae, "Bacteriol. Rev. (1966) 30: 192-255; ja Luderitz et al., "Isolation and Chemical and Immunological Characterization of Bacterial Lipopolysaccharides, "Microbial Toxins, osa 4, ss. 145-233, Weinbaum, G., Kadis, S., ja Ajl, S.J., julk. Academic Press (1977), katso kuva 1). Tässä suhteessa on tärkeä huomata, että LSP-molekyylit ovat useimpien, joskaan eivät kaikkien gram-negatiivisten bakteereiden ulomman solumenbraanin päärakenneseosia (Nikaido, H., Biosynthesis and Assembly of Lipopolysaccharide." Bacterial Membranes and Walls, Leive, L., julk., Marcel Decker, (1973); katso kuva 2). Kuvassa 1 esittää gram-negatiivisen bakteerin soluseinämän mallia, josta käy ilmi lipopolysakkaridimolekyylien asema bakteerin ulomman membraanin suhteen. Tästä mallista puuttuvat sellaiset rakenteet kuten esimerkiksi kapselit, kuori- ja limakerrokset.

Lipopolysakkaridit ovat myös bakteereiden endotoksiinien olennaisia rakenneseosia, siten että LPS-molekyylien lipidi-A-osa vastaa syvällisistä patofysiologisista ominaisuuksista (esim. kuumeesta, alentuneesta verenpaineesta, hajapesäkkeisestä suonensisäisestä hyytymästä, šokista ja mahdollisesta kuolemasta), jotka kytkeytyvät endotoksiinin vapautumiseen gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttaman verenmyrkytyksen aikana tai jotka on kokeellisesti indusoitu endotoksiini-injektoiden avulla (Westphal et al., "Chemistry and Immunochemistry of Bacterial Lipopolysaccharides as Cell Wall Antigens and Endotoxins, "Prog. Allergy (1983) 33: 9-39). Kuva 2 kuvaa gram-negatiivisten lipopolysakkaridien kolmea aluetta: O-spesifinen ketjualue on pitkäketjuinen polysakkaridi, joka koostuu toistuvista lipopolysakkaridi-yksiköistä. Eri bakteerilajeilla nämä oligosakkaridiyksiköt saattavat sisältää yhdestä aina kuuteen tai seitsemään monosakkaridi-yksikköön saakka. Serotyypiset LPS:n determinantit (katso teksti) on tuotu esiin molekyylin tällä alueella. Core-alue sisältää useita monosakkarideja järjestäytyneinä siten, että ne ovat suhteellisen muuttumattomia gram-negatiivisen bakteerin kannasta toiseen. Lipidi-A-alue

on oleellisesti sama kaikissa gram-negatiivisissa bakteereissa, se on tavallisesti kiinnittynyt core-osaan keto-deoksioktoonihappo-osan välityksellä ja toimii lipopolysakkaridi-molekyylin kiinnittymiskohtana ulkomembraaniin.

Tyypispesifisten anti-LSP-vasta-aineiden induktiota ja immunoterapeuttista käyttöä on perusteellisimmin tutkittu hoidettaessa sairautta, jonka Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) aiheuttaa, tämän bakteerin korkea-asteisen antibioottiresistenssin vuoksi. Sellaisten vasta-aineiden, joko ne ovat aktiivisesti syntyneitä tai ne ovat passiivisesti siirrettyjä, on osoitettu olevan suojaavia eläinten erilaisissa infektioimalleissa. Selontekoa haluttaessa, katso Pollack, M., "Antibody-Mediated Immunity in Pseudomonas Disease and Its Clinical Application," Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations, Alving, B.M. ja Finlayson, J.S., julkaisijat, ss. 73-79, U.S. Department of Health and Human Services, (1979).

Ehkä on vielä tärkeämpää, että infektiivien kantojen LPS-molekyylin tyypispesifisten osien vasta-aineiden korkeiden tiittereiden akuuteissa seerumeissa on havaittu kytkeytyvän eloonjäämiseen potilaissa, joilla on P. aeruginosan aiheuttama bakteremia (Pollack, M. ja Young, L.S., "Protective Activity of Antibodies to Exdotoxin A and Lipopolysaccharide at the onset of Pseudomonas aeruginosa Septicemia in Man," J. Clin. Invest. (1979) 63:276-286). Tämän havainnon on tosiasiallisesti todettu ulottuvan pääosaan erilaisten gram-negatiivisten organismien aiheuttamia bakteremioita (Zinner, S.H. ja McCabe, W.R., "Effects of IgM and IgG Antibody in Patients with Bacteremia Due to Gram-Negative Bacilli," J. Infect. Dis. (1976) 133:37-45; ja Clumeck et al., "Humoral Immunity and Circulating Immune Complexes in Gram-Negative Bacteremia and Septic Shock," Bacterial Endotoxins and Host Response, ss. 79-94, Agarwal, M.K., julkaisija Elsevier, (1980).

Vaikka tarkkoja tapoja, joilla anti-LPS-vasta-aineet panevat toimeen sellaisen suojauksen, ei ole vielä kokonaan kuvattu (erityisesti gram-negatiivisten bakteereiden erilaisten sukujen suhteen), ajatellaan yleensä, että ne toimivat helpottamalla LPS-molekyylien poistumista verivirrasta retikuloendoteliaali-järjestelmän avulla tai tehden LPS:a sisältävät bakteerit herkiksi komplementin välittämälle solujen hajoamiselle ja/tai fagosytoosille (Morrison, D.C: ja Ryan, J.L., "Bacterial Endotoxins and Host Immune Responses", Adv. Immunol. (1979) 28:293-450). Mahdollisesti jokin yllä esitetystä suojausmalleista tai niiden yhdistelmä saattaa toimia vakavissa gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttamissa taudissa.

Vuonna 1975 Kohler ja Milstein tiedottivat keksinnöstään, jonka mukaisesti tietyt hiiren solulinjat voivat sulautua hiiren pernasolujen kanssa hybridoma-solujen muodostamiseksi, jotka voivat erittää puhtaita "monoklonaalisia" vasta-aineita (Kohler, G., ja Milstein, C., "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, " Nature (1975) 256:495-497).

Vuoden 1982 yhteenvedossa (=253), jonka J. Sadoff et al. ovat julkaisseet Abstracts of the 1982 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy:n sivulla 110, tiedotettiin P. aeruginosan tietyn kannan (serotyypin) LPS-molekyylien oligosakkaridi-determinantteja vastaan kohdistuvista hiiren IgM-luokan monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamisesta hybridoma-tekniikan avulla ja että nämä hiiren monoklonaaliset vasta-aineet antoivat suojan P. aeruginosa-bakteerin saman kannan (esim. homologisen kannan) kuoleman aiheuttavaa ärsykettä vastaan.

#### Keksinnön yhteenveto

Kyseessä oleva keksintö antaa käyttöön uusia transformoituja humaani lymfosyyttisolulinjoja sekä humaani monoklonaalisia

vasta-aineita, jolloin solulinjat ja vasta-aineet sitoutuvat spesifisesti tiettyihin serotyyppeihin determinantteihin, jotka sijaitsevat gram-negatiivisten bakteereiden ulkomembraani(e)n lipopolysakkaridimolekyylien pinnalla. Monoklonaalisia vasta-aineita saatetaan käyttää nisäkkäillä suojaamaan ärsykettä vastaan ja tekisi mahdolliseksi gram-negatiivisten bakteereiden ihmisissä aiheuttaman taudin patofysiologisten vaikutusten terapeuttisen ja/tai patofysiologisen käsittelyn. Vasta-aineen valmistusmenetelmä on tarkemmin selitetty patenttivaatimuksissa.

#### Piirroksia koskeva lyhyt kuvaus

Kuva 1 on gram-negatiivisen bakteerin sisäseinää ja membraaneja valaiseva diagrammi; ja

Kuva 2 on lipopolysakkaridimolekyylin kaaviomainen kuva.

#### KEKSINNÖN YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS

Kyseessä oleva keksintö antaa käyttöön transformoituja humaanilymfosyyttisoluja, jotka valmistavat spesifisiä, suojaavia monoklonaalisia humaanilymfosyyttisolujen vasta-aineita vastaanottavaisille lipopolysakkaridi-molekyyille. "Vastaanottavaisilla" tarkoitetaan, että LPS-molekyylit ovat ulkoisesti käytettävissä käyttöympäristössä monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa tapahtuvaa suoraa vuorovaikutusta varten. Tämän määrittelyn mukaisesti, LPS-molekyylit, jotka ovat irronneet gram-negatiivisistä bakteereista ympäröivään ympäristöön, olisivat vapaita suoraan vuorovaikutukseen spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa ja poistuisivat retikuloendotelialiaali-järjestelmän kautta. Tässä yhteydessä monoklonaalisten vasta-aineiden odotettaisiin olevan hyödyksi erilaisten gram-negatiivisten bakteereiden aiheuttamaa vakavaa sairautta hoidettaessa. Lisäksi, gram-negatiivisten bakteereiden ulkopinnalla sijaitsevat LPS-molekyylit olisivat saatavissa spesifisten monoklonaalisten molekyylien kanssa



tapahtuvaa suoraa kosketusta varten saaden täten aikaan komplementti-välitteisen bakteerin hajoamisen ja/tai fagosytoosin. Bakteerit, joita kyseessä oleva keksintö koskee, voidaan edelleen määritellä fagosytoivien solujen avulla hajoviksi bakteereiksi (mikäli ne opsonoituvat antikodilla ja tagosytoivat solut "sulattavat" ne) tai että ne hajoavat suoran vuorovaikutuksen avulla homologisen vasta-aineen tai seerumin komponenttien, kuten esimerkiksi komplementin kanssa, missä suhteessa näiden mekanismien tiedetään olevan ratkaisevan tärkeitä sellaisten organismien poistamisessa. Bakteerin rakenneosien, kuten esimerkiksi kapseloiden, kuorien tai limakerrosten, jotka saattavat rajoittaa tai estää suoraa lähestyttävyyttä LPS-molekyyleille, ennakoitaisiin vähentävän kyseessä olevan keksinnön käyttökelpoisuutta. Esimerkkeihin bakteereista, jotka sisältävät sellaisia rakenteita, kuuluvat kapseloidut Klebsiella-lajit ja kuoren ympäröimä Escherichia coli.

Tarkoittamatta rajoittaa kyseessä olevan keksinnön piiriä, voidaan identifioida gram-negatiivisten bakteereiden useita sukuja ja lajeja, joilla saattaa olla erityistä mielenkiintoa etiologisen kytkeytymisensä vuoksi ihmisten vakaviin sairauksiin. Ne kuuluvat laajalti gram-negatiivisten organismien kolmeen suureen heimoon, nimittäin Enterobacteriaceae-, Bacteroidaceae- ja Pseudomonadaceae-heimoihin. Enterobacteriaceaeen tyypillisiin edustajiin kuuluvat esimerkiksi Escherichia coli; Klebsiella lajeja kuten esimerkiksi K. pneumoniae, K. ozaenae sekä K. rhinoscleromatis; Enterobacter-lajeja, kuten esimerkiksi E. aerogenes, E. cloacea, E. hafniae ja E. agglomerans; Serratia marcescens; Proteus-lajeja, kuten esimerkiksi P. vulgaris, P. mirabilis, P. rettgeri ja P. morgani; Providencia stuartii; sekä Citrobacter-lajeja (Sonnenwirth, supra; McCabe, supra; ja Kreger et al., supra, liitetty viitteenä). Bacteroidaceaeen tyypillisiin edustajiin kuuluu Bacteroides-lajeja, kuten esimerkiksi B. fragilis; ja Fusobacterium-lajeja (Sonnenwirth, supra, liitetty viitteenä). Pseudomonadaceaeen tyypillisiin edustajiin kuuluvat

P. aeruginosa, P. pseudomallei, P. mallei, P. fluorescens, P. putida, P. cepacia, P. strutzeri, P. maltophilia (katso Gilardi, G.L., "Pseudomonas Species in Clinical Microbiology," Mt. Sinai J. Med. (1976) 43:710-726, liitetty viitteenä). Kyseessä olevan keksinnön avulla voidaan saavuttaa suoja myös muita vastaavia organismeja kohtaan.

Edellä luetellut Pseudomonas-lajit edustavat kyseessä olevan keksinnön edullista sovellutusta, siten että P. aeruginosan suhteen sovellutus on edullisempi.

On tunnettua, että gram-negatiivisten bakteereiden tiettyjen lajien joukossa voi olla monia immunologisesti erotettavia kantoja tai tyyppjä. Monissa tapauksissa kantojen tai tyyppien väliset erot voivat johtua muunnoksista LPS-molekyylien antigeenirakenteessa ja erityisesti rakenteellisesta vaihtelusta LPS-molekyylien O-spesifisissä sivuketjuissa (katso kuva 1). Täten rakenteellisesti erilaiset O-spesifiset sivuketjut esittävät erilaisia antigeeni-rakenteita. Sellaisen antigeenisen muunnoksen immunologisen tunnistamisen tuloksena on annettulle antigeeni-muunnokselle spesifisten vasta-aineiden syntyminen. Kun sellaisia vasta-aineita on käytetty erottamaan serologisesti (esim. agglutinaation, ELISAN, jne. avulla) yhtä antigeeni-muunnosta toisesta, näin tunnistetut antigeeni-muunnokset on nimetty serotyypeiksi ja niiden sanotaan esittävän serotyyppejä determinantteja. Täten LPS-molekyylien O-spesifiset sivuketjut esittävät serotyyppejä antigeeni-determinantteja. Aiheeseen perehtyneet arvostavat sitä, että koska kysessä oleva keksintö antaa käyttöön monoklonaalisia humanivasta-aineita LPS-molekyylien serotyyppeille determinanteille, voidaan antaa käyttöön vasta-aineita, jotka ovat tyyppispesifisiä, mikä tarkoittaa, että ne ovat spesifisiä lajien joukossa tietyn tyyppin LPS-molekyylielle.

Erilaisia serotyyppejä käsiteltäessä voidaan hyödyllisesti

käyttää erilaisia määrittelykaavioita. Esimerkkinä sellaisista määrittelykaavoista ovat P. aeruginosalle laaditut määrittelykaaviot. Fisherin määrittelykaavio P. aeruginosalle on hyvin tunnettu, ja sitä kuvataan yksityiskohtaisesti Fisherin et al.:n julkaisussa "New Immunotype Scheme for Pseudomonas aeruginosa Based on Protective Antigens", J. Bacteriol. (1969) 98:835-836, joka on sisällytetty tähän yhteyteen viitteenä. Tämän järjestelmän mukaisesti pääosa tunnetusta P. aeruginosasta luokitellaan seitsemään tyyppiin: Fisherin immunotyyppi 1; Fisherin immunotyyppi 2; Fisherin immunotyyppi 3; Fisherin immunotyyppi 4; Fisherin immunotyyppi 5; Fisherin immunotyyppi 6; sekä Fisherin immunotyyppi 7. Samalla tavalla, the International Antigenic Typing Scheme (IATS) -järjestelmä P. aeruginosalle (katso, Brokopp, C.D. ja Farmer, J.J., III, "Typing Methods for Pseudomonas aeruginosa," Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy, ss. 89-133, Doggett, R.G., julkaisija, Academic Press, 1979) antaa käyttöön noin 17 erillistä serotyyppiä, joita nimitetään IATS-tyypiksi 1, IATS-tyypiksi 2, jne. Sekä Fisherin (Hanessian, S., et al., "Isolation and Characterization of Antigenic Components of a New Heptavalent Pseudomonas Vaccine," Nature (1971) 229: 209-210) että IATS-määrittelyjärjestelmän suhteen (Brokopp ja Farmer, supra), molempia serotyyppikaavioita koskevan antigeenideterminantin on osoitettu sijaitsevan LPS-molekyylissä. Molempien määrittelyjärjestelmien vertailu ja korrelaatio esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1

P. aeruginosan kahden määrittelyjärjestelmän vertailu

<u>IATS</u> (serotyyppi)	<u>Fisher</u> (immunotyyppi)
1	4
2	3,7
3	-
4	-
5	3,7
6	1
7	6
8	6
9	-
10	5
11	2
12	-
13	-
14	-
15	-
16	3,7
17	-

Monoklonaalisia vasta-aineita valmistaa humaanit donoreilta saatujen B-lymfosyyttisolujen Epstein-Barr virus (EBV)-transformaatio, jota solu pitää yllä, ja mainitut humaanidonorit ovat tai ne ovat olleet alttiita vastaaville gram-negatiivisille bakteereille. Näin muodostuneille, vasta-ainetta eritettävälle solulinjoille on ominaista, että ne ovat jatkuvasti kasvavia lymfoblasti-soluja, joilla on diploidinen tumatyyppi, ne ovat Epstein-Barr tuma-antigeenin (EBNA) suhteen positiivisia ja erittävät joko IgG-, IgM-, IgA- tai IgD-isotyypin monoklonaalista vasta-ainetta, alatyypit IgG1, IgG2,

IgG3 ja IgG4 mukaanluettuina. Solun ylläpitämä transformaatiotapahtuma sinänsä on M.E. Lostromin keksintö, ja sitä kuvataan yksityiskohtaisesti Yhdysvaltain patentissa no 4,464,465, joka on liitetty viiteenä tähän yhteyteen. Monoklonaalaisia vasta-aineita voidaan käyttää joko koskemattomina tai palasina, kuten esimerkiksi Fab tai F(ab')<sub>2</sub>, tavallisesti koskemattomina. Joissakin tapauksissa saattaa olla toivottavaa yhdistää vasta-aineet muihin yhdisteisiin tiettyjen tulosten saavuttamiseksi. Esimerkiksi vasta-aineita voidaan konjugoida sytotoksisiin aineisiin, kuten esimerkiksi radionuklideihin, antibiootteihin, jne.

Tätä menetelmää koskevaa hakemusta, kyseessä olevien monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi, havainnollistetaan seuraavin esimerkein. Näiden esimerkkien tarkoituksena on ainoastaan valaista kyseessä olevan keksinnön tyypillisiä patentin suoritusmuotoja eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa keksinnön piiriä.

#### KOKEELLINEN OSA

##### Esimerkki 1

Esimerkki 1 havainnollistaa menetelmiä humaanin monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi P. aeruginosan Fischer-immunotyyppi 2:n (IATS-tyyppi 11) LPS-molekyylejä vastaan, ja esimerkki havainnollistaa edelleen mainitun vasta-aineen suojaavaa aktiivisuutta in vivo homologisen kannan kuolettavaa ärsykettä kohtaan.

##### A. Sopivien humaanisolujen saanti

Sopivat humaanin B-solut (lymfosyytit) olivat peräisin kuolleen henkilön pernasta, jonka henkilön tiedettiin kuolleen "cystic fibrosis" -sairauteen ja jolla tiedettiin olleen aiempia P. aeruginosan aiheuttamia infektiota. Perna, joka saatiin ruumiinavauksessa, leikattiin noin 15

mm:n paksuisiksi viipaleiksi. Solut vapautettiin kapselista ja yhdistävästä matriisista suureen petrimaljaan perfusoimalla varovaisesti kutakin viipaletta fosfaatilla puskuroidulla keittosuolaliuoksella, jossa ei ollut kalsiumia/magnesiumia (CMF-PBS) ja joka annosteltiin ruiskuun kiinnitetyn, 18-gaugen neulan kautta. Yksitumaiset solut erotettiin pernasoluvalmisteesta standardisentri-fugointitekniikoin Ficoll-Paquella (Boyum, A., "Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes From Human Blood," Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1968) 21: täydennysosa 97, 77-89) sekä pestiin kaksi kertaa CMF-PBS:llä.

Mononukleaarisisista soluista poistettiin T-solut muunnetulla, E-rosetteja muodostavalla menetelmällä. Lyhyesti sanottuna, solut lietettiin ensin  $1 \times 10^7$  solua/ml:n konsentraationa PBS:ään, joka sisälsi 20 % vasikan sikiön seerumia (FCS),  $40^\circ \text{C}$ :ssa. Yksi ml tätä suspensiota pantiin sitten  $17 \times 100$  mm:n suuruiseen, pyöreäpohjaiseen polystyreeniputkeen, johon lisättiin  $1 \times 10^9$  2-amino-etyyli-isotiouroniumbromidilla (AET) käsiteltyjä lampaan punasoluja 10 %:isesta (tilav./tilav.) liuoksesta, joka oli RPMI 1640 elatusaineessa (Madsen, M. ja Johnson, H.E.; "A Methodological Study of E-rosette Formation Using AET Treated Sheep Red Blood Cells," J. Immun. Methods (1979) 27:61-74). Suspensiota sekoitettiin varovaisesti 5-10 minuutin ajan  $40^\circ \text{C}$ :ssa, ja E-rosetteja muodostaneet solut poistettiin sentrifugoimalla Ficoll-Paquella 8 minuutin ajan  $2500 \times g$ ,  $40^\circ \text{C}$ :ssa. E-rosettien muodostamisen suhteen negatiiviset pernan mononukleaariset solut (E-Spl), jotka kerrostuivat rajapintaan, pestiin kerran RPMI 1640 elatusaineessa ja ne lietettiin uudelleen samaan elatusaineeseen, joka sisälsi 15 % (tilavuus/tilavuus) FCS:a, L-glutamiinia (2mmooli/litra), natriumpyruvaattia (1mmooli/l), penisilliiniä (100 kansainvälistä yksikköä/ml), streptomysiiniä (100  $\mu\text{g/ml}$ ), hypoksantiinia ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ), aminopteriiniä ( $4 \times 10^{-4} \text{M}$ ) sekä tymidiiniä ( $1,6 \times 10^{-5} \text{M}$ ). Tätä elatusainetta nimitetään myöhemmin tässä yhteydessä HAT-elatusaineeksi.

## B. Solun liikkeelle panema solujen transformaatio

Solun liikkeelle panema E-Spl-solujen transformaatio suoritettiin viljelemällä E-Spl-solujen yhdessä transformoivan solulinjan kanssa. Transformoiva solulinja oli Epstein-Barr tuma-antigeeni-positiivinen (EBNA) humaanilymfoblastisolulinja, joka oli peräisin GM 1500 lymfoblastisolulinjan etyyli-metaanisulfonaatti-(EMS)-mutaatiosta, jonka jälkeen oli suoritettu valinta 6-tioguaaniinin ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) läsnäollessa, jotta soluista tulisi sellaisia, että niistä puuttuu hypoksantiini-guaaniini-fosforibosyyli transferaasi (HGPRT) ja että ne täten olisivat HAT:lle herkkiä. Solulinjaa nimitetään 1A2-solulinjaksi, ja se jätettiin säilytettäväksi A.T.C.C.:een maaliskuun 29. päivänä, 1982, merkittynä A.T.C.C. no CRL 8119:ksi. 1A2-solut, jotka olivat logaritmisessa kasvuvaiheessa, suspendoitiin HAT-elatusaineeseen, ja ne yhdistettiin sen jälkeen suhteessa 30 1A2-solua yhtä E-Spl-solua kohti. Soluseos siveltiin 10 tasapohjaiselle 96 kammiota käsittävälle mikrotiitteri-levylle konsentraationa 155 000 solua/kammio,  $200 \mu\text{l}$ :n tilavuutena kammioita kohti, ja viljelmää inkuboitiin  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa, kostutetussa ilmakehässä, joka sisälsi 6 %  $\text{CO}_2$ :a. Viljelmiä ravittiin joka kolmas, neljäs päivä korvaamalla puolet supernatantista tuoreella HAT-elatusaineella. Kammioita tarkasteltiin joka toinen päivä käänteismikroskoopilla solun jakautumisen merkkien havaitsemiseksi. Kaksi viikkoa sen jälkeen kun solut oli siirrostettu levyille ja 1A2-solut olivat kuolleet HAT-valinnan johdosta, kammioiden ravitseminen uudella elatusaineformulaatiolla suoritettiin yhtäläisesti HAT-elatusaineen kanssa, paitsi että aminopteriinikomponentti puuttui. Kahdensantoista päivän kuluttua siirrostuksesta havaittiin, että noin 70 % kammioista sisälsi jakaantuvia soluja ja että useimmissa kammioissa solutiheys oli riittävä supernatanttien poistamiseksi ja tutkimiseksi anti-P. aeruginosa-vastaa-aineen suhteen.

C. Spesifistä vasta-ainetta erittävien solujen löytäminen

Supernatantit seulottiin anti-P. aeruginosa vasta-aineiden suhteen käyttämällä entsyymiin kytkettyä immunosorbenssi-määritys-(ELISA) tekniikka (Engvall, E., "Quantitative Enzyme Immunoassay (ELISA) in Microbiology," Med. Biol. (1977) 55: 193-200). Antigeenilevyt koostuivat tasapohjaisista, 96-kammioisista mikrotiitterilevyistä, joiden kammiot sisälsivät erilaisia, kokonaisia bakteereita, jotka oli etanolin avulla kiinnitetty kammion pohjaan. Levyt valmistettiin lisäämällä kammioihin 50  $\mu$ l pestyä bakteerisuspensiota ( $OD_{660}=0,2$ ), joka oli PBS:ssä, levyjä sentrifugoitiin 20 minuutin ajan nopeudella 500xg, PBS imettiin pois, lisättiin 75 l etanolia 10 minuutin ajaksi, etanoli poistettiin, minkä jälkeen kuivattiin ilmalla. Tutkimuksessa käytettyihin erilaisiin antigeenilevyihin kuuluivat: (1) P. aeruginosan Fisher-immunotyyppien 1 - 3 seos (A.T.C.C. numerot 27312, 27313, 27314); (2) P. aeruginosan Fisher-immunotyyppien 4-7 seos (A.T.C.C. numerot 27315, 27316, 27317, 27318); kliinisesti eristetty Escherichia coli; (4) Klebsiella pneumoniae (A.T.C.C. no 8047); sekä (5) mikrotiitterilevy ilman bakteereita.

ELISA-menettelmaa varten antigeeni-levyjen kammioihin lisättiin ensin 75  $\mu$ l 5 %:ista BSA:a 1 tunnin ajaksi epäspesifisen proteiinin sitoutumisen estämiseksi. Adsorboitumattoman BSA:n poistamisen jälkeen, supernatantit viljelylevyjen kammioista siirrostettiin kopsina antigeenilevyjen vastaaviin kammioihin (50  $\mu$ l/kammio), ja levyjä inkuboitiin 37°C:ssa, kosteutetuissa kammioissa, 30 minuutin ajan. Sitten supernatantit poistettiin, kammioita pestiin kolme kertaa 1 %:isella BSA-PBS:llä, ja kuhunkin kammioon lisättiin 50  $\mu$ l biotinyyliä sisältävää vuohen anti-humaani-immunoglobuliinia (Ig) (Tago =2593, laimennettu 1:1000 1 %:isessä BSA-PBS:ssä). Kostutetussa kammiossa, 37°C:ssa suoritettuna, 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen poistettiin biotinyyliä sisältävä anti-humaani Ig, kammioita pestiin kolme kertaa 1 %:isellä



BSA-PBS:llä, ja kuhunkin kammioon lisättiin 50  $\mu$ l ennalta muodostettua avidiinia: biotinyyliä sisältävä piparjuuri-peroksidaasikompleksia (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Huoneenlämpötilassa suoritettun 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen poistettiin ylimäärä Vectastain ABC-reagenssia, kammiot pestiin jälleen kolme kertaa 1 %:isella BSA-PBS:llä, ja kuhunkin kammioon lisättiin 100  $\mu$ l substratttia (0,8 mg/ml ortho-fenyleeni-diamiinin dihydrokloridia 100 mmolaarisessa sitraattipuskurissa, pH 5,0 sekä 0,03 %:ista H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:a ionittomassa H<sub>2</sub>O:ssa, yhtä suurina tilavuuksina sekoitettuina juuri ennen siirrostusta). Pimeässä suoritettun, 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen kuhunkin kammioon lisättiin 50  $\mu$ l 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:a reaktioiden lopettamiseksi. Levyillä sijaitsevia antigeeneja vastaavia vasta-aineita sisältävät viljelmä-supernatantit havaittiin positiivisen värinkehittymisen perusteella vastaavissa kammioidessa, ja reaktion voimakkuus kvantitoitiin mittaamalla absorbanssi 490 nm:ssä, Dynatech MR 580 mikro-ELISA-lukijalla.

Viljelmä-supernatanttien analyysi yllä mainitun menetelmän avulla johti kolmen kammioiden (6F11, 4G9 ja 10B2) identifiointiin, jotka sisälsivät anti-P. aeruginosa-spesifisyyttä Fisher-immunotyyppijä 1-3 koskevalla levyllä, mutta ei Fisher-immunotyyppijä 4-7 koskevalla levyllä eikä kontrollilevyillä. Tunnistetun, spesifisen Fisher-immunotyypin identifioimiseksi valmistettiin, yllä kullekin immunotyypille kuvattulla tavalla, antigeeni-levyjä, jotka sisälsivät etanolilla kiinnitettyjä bakteereita, jotka olivat ainoastaan yhtä Fisher-immunotyyppiä. ELISA-määrityksen suorittaminen, kuten yllä on esitetty, käyttämällä kammioidesta 6F11, 4G9 ja 10B2 saatuja viljelmäsupernatantteja yksittäisillä immunotyypilevyillä, ilmaisi, että nämä kolme kammiota sisälsivät vasta-ainetta, joka oli spesifinen Fisher-immunotyypille 2.

#### D. Spesifistä vasta-ainetta valmistavien solujen kloonaus

Kammioissa 6F11, 4G9 ja 10B2 sijaitsevat solut kloonattiin useita kertoja (kaksi tai kolme), kunnes kaikki kloonaus-supernatantit yllä esitetyllä ELISA-menetelmällä, Fisher-immunotyyppi 2:n antigeenilevyillä antoivat positiivisen reaktion. Solut kloonattiin rajalaimennusta käyttäen, ihmisen esinahan fibroblastien puoleksi yhtyvällä kerroksella, tasa-pohjaisissa 96-kammioisissa levyissä. Elatusaine koostui RPMI 1640:sta, joka sisälsi 15 % (tilav./tilav.) FCS:a, L-glutamiinia (2 mmoolia/l), natriumpyruvaattia (1 mmooli/l), penisilliiniä (100 kansainvälistä yksikköä/ml) sekä streptomysiiniä (100 µg/ml). Viljelmiä ravittiin joka kolmas päivä korvaamalla puolet supernatantista tuoreella elatusaineella. Tavallisesti, kammioissa oli siirrostuksen jälkeen, toisen ja kolmannen viikon välillä, riittävä lymfoblastisolu-tiheys anti-Fisher 2 immunotyyppispesifisyyden analyysiä varten.

Täten tässä kokeessa saatiin kolme kloonattua, transformoitua humaanisolulinjaa, jotka ovat **jatkuvasti viljeltävissä** ja jotka kukin erittävät monoklonaalisia humaanivasta-aineita Fisher-immunotyypin 2 P. aeruginosan LPS-molekyyleillä sijaitsevia serotyyppisiä determinantteja kohtaan. Tässä ja seuraavissa esimerkeissä solulinjalla ja vasta-aineella, jota se tuottaa, on sama nimitys.

Ennen tämän patenttihakemuksen jättämistä, jatkuva, transformoitu humaanisolulinja, jota tässä yhteydessä nimitetään 6F11:ksi, jätettiin säilytettäväksi the American Type Culture Collectioniin, Rockville, MD, A.T.C.C. no CRL 8562:na.

#### E. Monoklonaalisten vasta-aineiden luonnehtiminen

Se seikka, että kustakin kloonista peräisin olevat vasta-aineet reagoivat yksinomaan yhden ainoan (tässä tapauksessa

Fisher 2) immunotyypin kanssa, tuntui osoittavan, että vasta-aine oli suunnattu lipopolysakkaridi-antigeeniä kohtaan, koska LPS-serotyyppi korreloi Fisherin-immunotyypeiksi luokittelevan järjestelmän kanssa (Hanessian, Nature (New Biology) (1971) 229:209-210). Tämän seikan tutkimiseksi edelleen suoritettiin laajennettu ELISA-koe 6F11-, 4G9- ja 10B2-supernatanteilla, kokonaisia, kiinnitettyjä bakteereita käsittävillä levyillä, jotka sisälsivät P. aeruginosan seitsemäntoista IATS-serotyyppikantaa, P. aerofaciensin, E. coli 011:B4:n J5-mutanttin sekä Providencia stuartiin, joka oli kliinisesti eristetty. Sopien täydellisesti yhteen Fisher-immunotyyppien ja niiden vastaavien, IATS-kaavioon sisältyvien (ks. taulukko 1), LPS:ään perustuvien serotyyppien vertailun kanssa, kukin anti-Fisher-immunotyyppi 2:n kloonaussupernatanteista reagoi ainoastaan IATS-kannan 11 kanssa. Mitään reaktioita ei havaittu millään noista ei-P. aeruginosa-bakteereista.

Yhtä kolmesta anti-Fisher-immunotyyppi 2 monoklonaalisista vasta-aineista luonnehdittiin edelleen. Vasta-aineen voimakkaan reaktiivisuuden perusteella ELISA-määrityksissä ja vastaavan solulinjan parempien kasvuominaisuuksien vuoksi valittiin 6F11 monoklonaaliseksi.

Molekyylilaatujen biokemiallinen karakterisointi, jossa tunnistamiseen käytettiin 6F11-vasta-ainetta, suoritettiin immuno-täplä-analyysin avulla. Lyhyesti sanottuna, natriumdodeyyli-sulfaatti (SDS)-polyakryyliamidi-geelielektroforeesi (Hancock, R.E.W. ja Carey, A.M., "Outer Membrane of Pseudomonas aeruginosa: Heat and 2-Mercaptoethanol-Modifiable Proteins," J. Bacteriol. (1977) 140:901-910) suoritettiin 20 µg:lle raakaa LPS:a (valmistettu kuumalla fenoli-vesi-menetelmällä (Westphal, O., et al., "Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser," Z. Naturforsch (1952) 79:148-155), jotka olivat peräisin kustakin seitsemästä Fisher-immunotyypistä, 20 µg:lle kromatografisesti puhdistettua LPS:a, joka oli saatu E. coli 011:B4:stä sekä

Klebsiella pneumoniaelta (molemmat List Laboratoriesilta, Cambell, CA) sekä 50  $\mu\text{g}$ :lle Fisher-immunotyyppi 2 bakteereiden ulkomembraanivalmisteelle (Tam, M.R., et al., "Serological Classification of Neisseria gonorrhoeae With Monoclonal Antibodies," Infect. Immun. (1982) 36:1042-1053). Erotetut molekyylilajit siirrettiin geeliltä nitroselluloosamembraanille (NCM), kuten muualla on kuvattu (Towbin, H., et al., "Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications," Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 79:4350-4354) ja NCM-täplää käsiteltiin yhden tunnin ajan PBS-Tweenissä (Batteiger, B., et al., "The Use of Tween 20 as a Blocking Agent in the Immunological Detection of Proteins Transferred to Nitrocellulose Membranes, " J. Immunol. Meth. (1982) 55:297-307). Täplää inkuboitiin sitten yhden tunnin ajan huoneenlämpötilassa (RT), 30 ml:ssa PBS-Tweeniä, joka sisälsi 3 ml käytettyä viljelmäsupernatanttia, joka oli peräisin 6F11-solulinjasta. Sen jälkeen kun oli suoritettu neljä viiden minuutin mittaista huuhtelua PBS-Tweenissä, täplää inkuboitiin 1:5000 laimennuksessa (PBS-Tweenissä) kaniinin antihumaani Ig:ä, yhden tunnin ajan, huoneenlämpötilassa. Täplää huuhdottiin neljä kertaa PBS-Tweenissä, ja sitten se pantiin 30 ml:aan liuosta, joka sisälsi 1:2000 laimennuksen (PBS-Tween) proteiini A-piparjuuriperoksidaasia (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). Huoneenlämpötilassa suoritettuna, tunnin pituisen inkuboinnin jälkeen täplää huuhdottiin neljä kertaa PBS-Tweenissä, ja sitten se upotettiin 60 ml:aan substraattia, joka oli valmistettu seuraavasti: 120 mg piparjuuriperoksidaasi-värinkehitysreagenssia (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) liuotettiin 40 ml:aan kylmää metanolia; 120  $\mu\text{l}$  30 %:ista  $\text{H}_2\text{O}_2$ :a lisättiin 200 ml:aan Trisillä puskuroitua keittosuolaliuosta (TBS-20mM Tris pH 7,4, 0,5M NaCl); kaksi liuosta sekoitettiin juuri ennen täplien päälle suoritettavaa lisäämistä. Sopivan värin kehittymisen jälkeen (tavallisesti 15-45 min substraatin lisäyksen jälkeen) reaktio

tukahdutettiin huuhtomalla täplää useita kertoja ionittomalla vedellä.

Tulokset olivat seuraavat. Positiiviset reaktiot havaittiin ainoastaan vyöhykkeissä, jotka sisälsivät Fisher-immunotyyppi 2:n raakaa LPS:a sekä bakteereiden ulkomembraanivalmistetta, joka oli Fisher-immunotyyppiä 2. Näissä molemmissä vyöhykkeissä 6F11-vasta-aine näytti tunnistavan sarjan säännöllisesti sijoittuneita, itsenäisiä molekyylikokonaisuuksia, jotka muodostivat tikkaiden kaltaisen kuvion immunotäplälle. Tämä kuva oli täysin yhtäpitävä sen kuvan kanssa, joka nähtiin LPS:n polyakryyliamidi-geelielektroforeesi-analyysissä, SDS:n läsnäollessa, mikä oli havainnollistettu, että kaistaleiden osoittama heterogeeninen sivuprofiili johtuu LPS-molekyylien populaatiosta, jonka molekyylit eroavat painonlisäysten verran, jotka vastaavat kuhunkin molekyyliin sisältyvien O-antigeenisten oligosakkaridi-sivuketjuyksiköiden lukumäärää (Pavla, E.T. ja Mäkelä, P.H., "Lipopolysaccharide Heterogeneity in Salminella typhimurium Analyzed by Sodium Dodecyl Sulfate/Polyacrylamide Gel Electrophoresis," Eur. J. Biochem., (1980) 107: 137-143; sekä Goldman, R.D. ja Leive, L., "Heterogeneity of Antigenic-Side-Chain Length in Lipopolysaccharide from Escherichia coli 0111 and Salmonella typhimurium LT2, Eur. J. Biochem. (1980) 107:145-153). Yhteisesti nämä tiedot ilmaisevat, että monoklonaalisen vasta-aineen 6F11 serologinen spesifisyys kohdistuu LPS-molekyyliin, joka sijaitsee Fisher-immunotyyppi 2:een kuuluvien bakteereiden pinnalla. Edelleen, koska LPS-molekyylin immunologinen spesifisyys perustuu toistuvien oligosakkaridi-yksiköiden rakenteeseen ja/tai niiden glykosidisiin sidoksiin (Westphal et al., Prog. Allergy (1983) 33: 9-39), tulokset ilmaisevat, että monoklonaalinen vasta-aine 6F11 on spesifinen oligosakkaridi-yksikön jollekin osalle tai sellaista yksiköiden välillä sijaitsevalle sidokselle pikemmin kuin serologisesti muuttumattomina pysyville LPS:n rakenneosille, joita core-alue ja lipidi A edustavat.

6F11-monoklonaalisen vasta-aineen isotyypin määritettiin ELISA-määrityksen avulla samalla tavalla kuin aiemmin kuvattut spesifisyys-testit, paitsi että biotinyyliä sisältävä vuohen anti-humaani IgG (gamma-ketjulle spesifinen, Tago) tai biotinyyliä sisältävä vuohen anti-humaani IgM (mu-ketjulle spesifinen, Tago) käytettiin kakkosvaiheen reagenssina laajemmalti reagoivan, biotinyyliä sisältävän, vuohen anti-humaani Ig:n sijasta. Molempia reagensseja käytettiin 1:500 laimennuksena, sekä käytettiin antigeeni-levyä, joka sisälsi etanolilla kiinnitettyjä Fisher-immunotyyppi 2:n bakteereita. 6F11-vasta-aineen positiivinen reaktio Fisher-immunotyyppi 2:n bakteereiden kanssa havaittiin ainoastaan anti-IgM-reagenssin avulla, mikä havainnollisti IgM-isotyypin monoklonaaliselle vasta-aineelle. Kyseessä olevaan aiheeseen perehtyneet ymmärtävät täysin, että jos kyseessä olevan esimerkin mukainen menetelmä toistettaisiin useita kertoja ja määritettäisiin näin saadut LPS-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden isotyypit, saatettaisiin löytää joitakin IgM- ja joitakin IgG-isotyyppijä.

#### F. Aktiivisuus in vitro

6F11 monoklonaalisen vasta-aineen toiminnallinen aktiivisuus in vitro tutkittiin opsoniinifagosyyttisen menetelmän avulla, jossa verrattiin radiomerkattujen bakteereiden vastaanottoa humaanineutrofiilleillä komplementin läsnäollessa, kun 6F11 monoklonaalinen vasta-aine oli läsnä tai se puuttui.

Radiomerkatut bakteerit valmistettiin siirrostamalla 5 ml Pseudomonas-minimaali-elatusainetta (Ayerard ja Snell, kappale 7, "Biochemical Factors in Growth," Manual of Methods for General Bacteriology, Gerhardt, P. et al., julk., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1981, ss. 79-111) 100  $\mu$ l:lla (1 Ci)  $^3$ H-leusiinia (146,5 Ci/mooli, New England Nuclear, Boston, MA) sekä 30  $\mu$ l:lla Fisher-immunotyyppi 2:een kuuluvan P. aeruginosan tryptikaasi-soija-lihaliemessä

yön yli kasvatettua viljelmää. Putkea inkuboitiin 37°C:ssa, ravistelijassa, 4-6 tunnin ajan, jonka jälkeen 3H-leusiinin ylimäärä poistettiin pesemällä neljä kertaa Hankin tasapainotetussa keittosuolaliuoksessa, joka sisälsi 0,1 % gelatiinia sekä 5mM HEPES:a, (HBSS/Gel), pH 7,2. Bakteerit sentrifugoitiin nopeudella 950xg, 10 minuutin ajan, kussakin pesuvaiheessa sekä lietettiin uudelleen HBSS/Gel:iin lopulliseksi konsentraatioksi  $6,67 \times 10^6$ /ml. Humaanineutrofiilit eristettiin van Furthin ja Van Zwetin menetelmän mukaisesti ("In vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes," teoksessa Handbook of Experimental Immunology (1973) osa 12, julk. D.M. Weir, toinen painos, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 36.1-36.24) monia muunnoksia käyttäen. Ruskeankeltainen kuori 10 ml:sta heparinisoitua verta kerrostettiin Ficoll-Paugen kanssa sekä sentrifugoitiin. Punaisten verisolujen (RBC) saostuma pestiin kerran RPMI 1640-elatusaineessa ja lietettiin uudelleen yhtä suureen tilavuuteen PBS:a, 37°C:ssa. Kolme millilitraa tätä suspensiota lisättiin sitten 6 ml:aan 2 %:ista dekstraania (PBS:ssa, 37°C:ssa), ja sisältöä sekoitettiin ainoastaan kumoamalla putki varovaisesti. 37°C:ssa suoritettuna, 20 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen, mikä suoritettiin punasolujen sedimentoimiseksi, supernatantti (joka sisälsi neutrofiilit) poistettiin ja niitä pestiin kaksi kertaa 4°C:ssa PBS:ssä. Solut pestiin kerran vielä 4°C:ssa HBSS-HEPES:ssä (pH 7,2), ja ne lietettiin uudelleen samaan väliaineeseen konsentraatioksi  $5 \times 10^7$  neutrofiiliä/ml. Lyofilisoitu kanin seerumi, joka liuotettiin 0,01 M EDTA:aan (pH 7,2) sekä absorboitiin kahdesti elävien bakteereiden kanssa (Bjornson, A.B. ja Michel, J.G., "Factors in Human Serum Promoting Phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa. I. Interaction of Opsonins With the Bacterium," J. Inf. Dis. (1974) 130: täydennysosa, sivut 119-125), jotka edustivat seitsemää Fisher-immunotyyppiä, toimi komplementin lähteenä.

Määritystä varten lisättiin 300  $\mu$ l Fisher-immunotyyppi 2:n bakteerisuspensiota 100  $\mu$ l:aan 6F11-viljelmän supernatanttia (laimennettu 1:1 lämmöllä inaktivoidulla FCS:llä) 1,5 ml:n vetoisessa Eppendorf-putkessa ja inkuboitiin pyörijässä, 37°C:ssa, 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen lisättiin peräkkäin 50  $\mu$ l komplementtia ja sitten 50  $\mu$ l neutrofiilisuspensiota 30 minuutin ja 45 minuutin pituisia jaksoja pyörijässä, 37°C:ssa, kunkin vastaavan lisäyksen jälkeen. Sitten neutrofiilit pestiin kahdesti täyttämällä putki kylmällä PBS:llä, sentrifugoimalla 5 minuutin ajan 100xg:llä sekä poistamalla supernatantti. Lisättiin 250  $\mu$ l 0,1N NaOH:aa neutrofiilien liuottamiseksi, putkea inkuboitiin 15 ajan, sekoitettiin, ja inkuboitiin vielä 15 ajan, jonka jälkeen 250  $\mu$ l putken sisältöä liuotettiin 3 ml:aan tuikenestettä (Dimilume 30, United Technologies, Packard) ja iskut mitattiin käyttämällä Beckman LS 7000 nestetuikelaskijaa. Tulokset ilmaistiin syötettyjen, radiomerkattujen bakteereiden prosentuaalisena käyttönä. Iskut minuutissa, jotka kytkeytyivät käytettyihin, radiomerkattuihin bakteereihin, mitattiin laskemalla 250  $\mu$ l kontrolliputkien sisältöä, joka oli käsitelty yllä esitetyn menetelmän mukaisesti, paitsi että lisättiin lämmön avulla inaktivoitua (56°C, 30 min) normaalia kaniinin seerumia monoklonaalisen vasta-aineen asemasta eikä suoritettu mitään pesuja käyttämättömien bakteereiden poistamiseksi.

Kuten on esitetty taulukossa 2, Fisher-immunotyyppi 2:een kuuluvat bakteerit joutuivat fagosytoosin kohteeksi ainoastaan monoklonaalisen vasta-aineen 6F11 sekä komplementin aktiivisen lähteen läsnäollessa. Kun tämä koe toistettiin käyttämällä Fisher-immunotyyppi 1:n bakteereita Fisher-immunotyyppi 2:n bakteereiden sijasta, mitään bakteereiden käyttöä ei havaittu, mikä täten havainnollisti 6F11-vasta-aineen suorituskyvyn spesifisyyttä opsonisoituja bakteereita vastaan sekä fagosytoosin edistymistä. Koska opsoniinien (spesifisten vasta-aineiden) ja polymorfonukleaaristen leukosyyttien



(neutrofiilien) yhteistoiminta näyttää olevan primaarinen mekanismi immunitetille P. aeruginosaa vastaan (Pollack, supra), nämä tulokset antavat ymmärtää, että vasta-aine 6F11, sopivasti annosteltuna, antaisi suojan Fisher-immunotyyppi 2:n bakteereiden kuolettavaa ärsykettä kohtaan.

Taulukko 2

<u>6F11-vasta-aine<sup>a</sup></u>	<u>Komplementti<sup>b</sup></u>	<u>Syötettyjen, 3H-Fisher-immunotyyppi 2:a vastavien bakteereiden prosentuaalinen käyttö</u>
-	-	3.8
+	-	6.6
-	+	2.4
+	+	61.7

a(-) = elatusaine

b(-) = lämmöllä inaktivoitu komplementti

#### G. Aktiivisuus in vivo

Yllä esitetyn olettamuksen tutkimiseksi suoritettiin eläimen suojauskokeita 6F11-vasta-aineen sekä P. aeruginosan useiden Fisher-immunotyyppien avulla. Ensin 6F11-vasta-aine ensin väkevöitiin saostamalla se käytetystä viljelmä-supernatantista kyllästetyn ammoniumsulfaatin avulla (50 %:inen lopullinen konsentraatio) (Good, A.H., et al., "Purification of Immunoglobulins and Their Fragments," Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell, B.B. ja Shiigi, S.M., julk. W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 279-286 (1980)). Saostettu materiaali liuotettiin uudelleen tislattuun veteen, dialysoitiin perusteellisesti PBS:a vastaan ja suodatettiin

steriilisti. Samalla tavalla käsitelty tuore elatusaine toimi negatiivisena kontrollina. Naaraspuoliset BALB/c-hiiret, joiden paino oli 20-22 g, jaettiin kahteen kymmenen hiiren ryhmään. Yksi ryhmä siirrostettiin vatsaontelonsisäisesti (ip) 0,5 ml:lla väkivöityä 6F11-vasta-ainetta (joka sisälsi noin 50 µg vasta-ainetta radioimmunologisella menetelmällä määritettynä), kun taas toinen ryhmä sai vatsaontelonsisäisesti 0,5 ml, väkevöityä elatusainetta. Kuusi tuntia myöhemmin kaikille eläimille annettiin ärsykkeenä ip 0,3 ml elävää bakteerisuspensiota, joka sisälsi 5 LD<sub>50</sub> Fisher-immunotyyppi 2:a edustavaa P. aeruginosaa. Bakteerisuspensio oli valmistettu elatusaineesta, joka oli logaritmisessa kasvuvaiheessa ja josta bakteerit sentrifugoitiin, pestiin kaksi kertaa PBS:ssä ja lietettiin uudelleen PBS:ään sopivaksi solutiheydeksi. Bakteeriärsyke vastasi  $1,2 \times 10^8$  elävää organismia. Eläimiä tarkasteltiin viiden päivän ajan. Kahdeksantoista tunnun kuluttua ärsykkeen antamisesta kaikki eläimet, jotka olivat saaneet konsentroitua elatusainetta, olivat kuolleet. Sitä vastoin ne eläimet, jotka olivat saaneet 6F11 monoklonaalista vasta-ainetta, olivat kaikki elossa. Viimeksi mainittu ryhmä näytti jokseenkin terveeltä tässä vaiheessa, ainoastaan vähäisin bakteeri-infektion oirein (se on, vähäistä turkin pörhistymistä). Nämä oireet hävisivät 48 tunnissa ärsykkeen antamisen jälkeen ilman bakteerisairautta koskevia lisätodisteita havaintojakson jäljelle jääneenä aikana. Samanlaisia kokeita suoritettiin käyttämällä ärsykkeenä P. aeruginosan muiden Fisher-immunotyyppien 5LD<sub>50</sub>:a, joiden tuloksena ei saatu mitään suojaa 6F11-vasta-aineen avulla. Nämä tulokset havainnollistavat selvästi, että passiivisesti siirretty 6F11-vasta-aine antaa täydellisen ja spesifisen suojan P. aeruginosan kuolettavaa ärsykeannosta vastaan.

Esimerkki 2

Esimerkki 2 havainnollistaa menetelmää monoklonaalisen humaanivasta-aineen muodostamiseksi P. aeruginosan Fisher-immunotyyppiä 4 vastaan.

Käytettiin perifeerisen veren lymfosyyttejä (PBL), jotka oli saatu henkilöstä, joka oli ollut alttiina P. aeruginosalle. Kymmenen levyä siirrostettiin 2000 E- PBL:llä/kammio ja 40 000 1A2-solulla/kammio Iscove`in muuntamalla Dulbeccon elatusaineella, jota täydennettiin 15 %:iin (tilav./tilav.) FCS:n suhteen, L-glutamiinilla (2mmoolia/l), penisilliinillä (100 kansainvälistä yksikkö/ml), streptomysiinillä (100 µg/ml) sekä HAT:llä, esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Tätä elatusaineformulaatiota tässä yhteydessä myöhemmin nimitetään Iscove`in elatusaineeksi. Käytettiin esimerkissä 1 kuvattua määritysmenetelmää, paitsi että E. coli- ja K. pneumoniae-määrityslevyt poistettiin. Erääseen kammioon sisältyvä supernatantti, jota nimitettiin 9D10:ksi, oli positiivinen ainoastaan Fisher-immunotyyppi 4-7 levyillä, ja tämän jälkeen sen määritettiin olevan spesifisen Fisher 4:lle, kun se määritettiin yksittäisillä immunotyyppi-antigeeni-levyillä. Kammioista 9D10 saatujen solujen kloonauksia suoritettiin käyttämällä säteilytettyä humaanin PBL:a ( $2,5 \times 10^5$ /kammio) syöjäsoluina pinta-alaltaan 0,5, 96-kammioisilla, tasapohjaisilla levyillä, sekä Iscove`in elatusainetta ilman HAT-lisäystä, mutta menetelmä on muutoin edellä kuvatun kaltainen. Ennen kyseessä olevan patenttihakemuksen jättämistä, tässä yhteydessä kuvattu solulinja 9D10 jätettiin tallennettavaksi the American Type Culture Collectioniin CRL 8752:ksi merkittynä.

Vasta-aine 9D10 karakterisoitiin IgM:ksi aiemmin kuvatussa isotyyppimäärityksessä ja sen osoitettiin reagoivan ainoastaan IATS-kannan 1 kanssa IATS-serotyypeillä suoritettussa

spesifisyyskokeessa. Käytettäessä aiemmin kuvattuja menetelmiä immunotäplä-analyysiin, kohteena ollut vasta-aine reagoi ainoastaan Fisher-immunotyyppi 4:n LPS:n sekä ulkomembraanivalmisteen kanssa, joka oli Fisher-immunotyyppi 4:a edustavilta bakteereilta peräisin, antaen tikkaiden kaltaisen kuvan samalla tavalla kuin kuvattiin 6F11-vasta-aineen suhteen.

Käyttämällä aiempia menetelmiä aktiivisuuden määrittämiseksi in vitro ja in vivo, saatiin seuraavat tulokset.

### Taulukko 3

Opsonofagosyytti-määritys:

<u>9D10-vasta-aine<sup>a</sup></u>	<u>Komplementti<sup>b</sup></u>	Syötettyjen, 3H-Fisher-immunotyyppi 2:a vastavien bakteereiden prosentuaalinen käyttö
-	-	8.4
+	-	4.9
-	+	9.5
+	+	65.3

a(-) = elatusaine

b(-) = lämmön avulla inaktivoitu komplementti

In vivo-tuloksia varten katso sivulta 27 taulukkoa, joka koskee 9D10-vasta-ainetta.

### Esimerkki 3

Esimerkki 3 havainnollistaa menetelmää monoklonaalisten humaanivasta-aineiden valmistamiseksi P. aeruginosan Fisher-immunotyyppejä 1 ja 4 vastaan.

Käytetty lymfosyytti-lähde oli peräisin "cystic fibrosis"-potilaalta, jonka seerumi sisälsi normaalia suuremmat tiitterit useiden Fisher-immunotyyppien LPS:lle. Kyseessä olevassa esimerkissä viisi levyä siirrostettiin 15 000 PBL:llä/kammio sekä 140 000 LA2 solulla/kammio. Käytettiin samaa, esimerkissä 2 kuvattua Iscove'in elatusaineformulaatiota, mutta sitä täydennettiin 0,5 µg:lla/ml sykloporiini A:a, jolloin tarkoituksena oli inaktivoita T-solut toiminnallisesti. T-solut eivät poistuneet kyseessä olevassa kokeessa käytetyn, AET-SRBC:n kanssa tapahtuvan rosettien muodotumisen kautta. Cycloporiinin läsnäoloa pidettiin yllä pääkammioiden määrittämiseen saakka.

Viljelmäsupernatanttien tutkiminen suoritettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. C5D5:ksi merkitystä kammioista saatu supernatantti oli positiivinen ainoastaan Fisher-immunotyyppijä 4-7 vastaavilla levyillä, ja se varmistettiin spesifiseksi Fisher-immunotyyppi 4:lle yksityisillä immunotyyppi-antigeeni-levyillä, aiemmin kuvatulla tavalla. Eräs toinen supernatantti, joka oli peräisin C5B7:ksi merkitystä kammioista, reagoi ainoastaan Fisher-immunotyyppijä 1-3 vastaavilla levyillä, ja se varmistettiin spesifiseksi Fisher-immunotyyppi 1:n suhteen yksityisillä immunotyyppi-antigeeni-levyillä, aiemmin kuvatulla tavalla. Ennen tämän patenttihakemuksen jättämistä, solulinjat C5B7 ja C5D5 jätettiin talletettaviksi the American Type Culture Collectioniin ja ne merkittiin vastaavasti CRL 8753:ksi ja CRL 8754:ksi. Sekä C5D5:n että C5B7:n osoitettiin olevan IgM:a aiemmin kuvatulla isotyyppi-analyysillä määritettynä. C5D5 reagoi ainoastaan IATS-kannan 1 kanssa, kun taas C5B7 reagoi ainoastaan IATS-kannan 6 kanssa, kuten odotettiin Fisher-immunotyyppien ja IATS-serotyyppien välisen suhteen perusteella.

Limmunotäplä-analyysissä osoitettiin kohteena olevan vasta-aineen C5D5 reagoivan ainoastaan Fisher-immunotyyppi 4:a

edustavan LPS:n sekä Fisher-immunotyyppi 4:a edustavista bakteereista saadun ulkomembraanipreparaatin kanssa, mikä ilmeni tikkaiden kaltaisena kuvana, saman kaltaisena kuin on kuvattu 6F11-vasta-aineen suhteen.

Samanlaisessa immunotäplä-analyysissä vasta-aine C5B7 reagoi ainoastaan Fisher-immunotyyppi 1:a edustavan LPS:n ja Fisher-immunotyyppiä 1 edustavan kannan ulkomembraani-preparaattia kohtaan, mikä ilmeni tikkaiden kaltaisena kuvana.

Aiemmin kuvatulla tavalla suoritettut in vitro- ja in vivo-määritykset antoivat seuraavat tulokset.

Opsonofagosyyttinen määrittäminen:

<u>C5D5-vasta-aine<sup>a</sup></u>	<u>Komplementti<sup>b</sup></u>	Syötettyjen, 3H-Fisher-immunotyyppi 4:a vastavien bakteereiden prosentuaalinen käyttö
-	-	8.4
+	-	6.3
-	+	9.5
+	+	56.1

<u>C5B7-vasta-aine<sup>a</sup></u>	<u>Komplementti<sup>b</sup></u>	Syötettyjen, 3H-Fisher-immunotyyppi 1:a vastavien bakteereiden prosentuaalinen käyttö
-	-	6.3
+	-	6.9
-	+	17.7
+	+	56.3

a(-) = elatusaine

b(-) = lämmön avulla inaktivoitu komplementti

In vivo suoritettut suojaustutkimukset:C5D5 & 9D10

	<u># eläviä/kokonaismäärä</u> <u>3 päivää ärsykkeen</u> <u>antamisen jälkeen</u>
Elatusaine	0/10
C5D5 (Anti-Fisher 4)	10/10
C5B7 (Anti-Fisher 1)	1/10
9D10 (Anti-Fisher 4)	8/10

Ei muita muutoksia 3 päivän kuluttua.

Ärsykeannos: 5LD50 elävää Fisher-immunotyyppiä 4 edustavaa bakteeria.

C5B7

	<u># eläviä/kokonaismäärä</u> <u>3 päivää ärsykkeen</u> <u>antamisen jälkeen</u>
Elatusaine	0/10
C5D5 (Anti-Fisher 4)	2/10
9D10 (Anti-Fisher 4)	0/10
C5B7 (Anti-Fisher 1)	8/10

Ei muita muutoksia 3 päivän kuluttua.

Ärsykeannos: 5LD50 elävää Fisher-immunotyyppiä 1 edustavaa bakteeria.

Esimerkki 4

Esimerkki 4 havainnollistaa menetelmää monoklonaalisten humaanin vasta-aineiden valmistamiseksi P. aeruginosan Fisher-immunotyyppijä 5 ja 6 vastaan, ja se edelleen havainnollistaa mainitujen vasta-aineiden suojaavaa vaikutusta in vivo homologisen kannan kuolettavaa ärsykettä vastaan.

Näyte perifeerisestä verestä saatiin "cystic fibrosis"-potilaalta, jonka tiedettiin poteneen P. aeruginosan aiheuttamaa infektiota. Mononukleaariset solut erotettiin verestä esimerkiksi 1 kuvatulla tavalla. Herkkien B-solujen solun ylläpitämä transformaatio suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla, paitsi että 23 levyä siirrostettiin. 20 000 mononukleaarisella solulla sekä 80 000 1A2-solulla kammiota kohti pyöreäpohjaisilla, 96-kammioisilla levyillä (Costar 3799).

Viljelmäsupernatanttien seulonta spesifisien vasta-aineiden suhteen suoritettiin käyttämällä esimerkissä 1 kuvatun ELISA-määrityksen muunnosta. Antigeeni-levyt koostuivat tasapohjaisista, 96-kammioisista mikrotitterilevyistä (Immulon II, Dynatech), joiden kammiot sisälsivät erilaisia eläviä bakteereita kammion pohjaan adsorboituneina. Bakteereiden adsorption helpottamiseksi muovin pinnalle. Poly-L-lysiiniä (PLL) (1 µg/ml PBS:ssä, pH 7,2), 50 µl/kammio, inkuboitiin 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Adsorboitumaton PLL pyyhittiin pois, levyt pestiin kerran PBS:llä, kuhunkin kammioon lisättiin 50 µl pestyä bakteerisuspensiota (OD<sub>660</sub>=0,2), joka oli PBS:ssä, ja levyjä inkuboitiin yhden tunnin ajan 37°C:ssa. Adsorboitumattomat bakteerit poistettiin pesemällä levyt kolme kertaa keittosuola-Tween-seoksella (0,9 % NaCl:a, 0,05 % (tilav./tilav.) Tween-20). Levyjen bakteerikoostumus oli esimerkissä I kuvun kaltainen, paitsi että ei käytetty E. coli- tai K. pneumoniae-levyjä. ELISA aloitettiin käsittelemällä levyt ensin estopuskurilla (blocking-puskuri) (200 ul/kammio) (PBS, pH 7,2, joka sisälsi 5 % (paino/tilavuus) rasvatonta kuivamaitoa; 0,01 % (tilav./tilav.) Antifoam A:a (Sigma) sekä 0,01 % (paino/tilav.) timerosaalia) 60 minuutin ajan, huoneenlämpötilassa. Esto- (blocking) vaiheen jälkeen, levyt pestiin kolme kertaa keittosuola-Tween-seoksella. Kaikkiin kammioihin pantiin sitten 50 µl PBS:a, pH 7,2, joka sisälsi 0,1 % Tween-20:a sekä 0,2 % (paino/tilavuus) BSA:a.



Viljelmälevyjen kammioista saadut supernatantit siirrostettiin kopsioina antigeeni-levyjen vastaaviin kammioihin (50  $\mu$ l/kammio), ja levyjä inkuboitiin 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten supernatantit poistettiin, kammioita pestiin kolme kertaa keittosuola-Tween-seoksella, ja kammioihin lisättiin 50  $\mu$ l sopivasti laimennettua, piparjuuri peroksidaasiin (HRP) konjugoitua vuohen anti-humaani IgG + IgM:a (American Qualex International #1114 + # A1124). Tässä esimerkissä käytettiin HRPJ-vuohi anti-IgG:a sekä HRP-vuohi anti-IgM:a vastaavasti lopullisina laimennuksina 1:5000 sekä 1:3000, jotka valmistettiin PBS:iin, pH 7,2, joka sisälsi 0,05 % Tween-20:a ja 0,1 % BSA:a. Huoneenlämpötilassa suoritettuna, 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen ylimäärä entsyymiin konjugoituneita vuohen vasta-aineita poistettiin ja kammiot pestiin kolme kertaa keittosuola-Tween-seoksella. ELISA-menetelmän jäljelle jäävä osa, johon kuuluvat substraatin lisäys sekä sitä seuraava värin kehittyminen, suoritettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla.

Yllä esitetyllä menetelmällä suoritettu viljelmä-supernatanttien analyysi johti kahden kammion (13C1 ja 5G2) identifioitiin, jotka olivat positiivisia ainoastaan Fisher-immunotyyppien 4-7 levyillä. Tämän jälkeen määritettiin ELISA:lla, yksittäisillä immunotyyppi-antigeeni-levyillä, että vasta-aine kammiossa 13C1 oli Fisher-immunotyyppille 5 spesifinen, kun taas vasta-aine kammiossa 5G2 oli spesifinen Fisher-immunotyyppille 6. Isotyyppi-määritykset, jotka suoritettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, mutta käyttämällä ELISA-formaattia sekä HRP-anti-humaani IgG- ja HRP-anti-humaani IgM-reagensseja, joita on kuvattu kyseessä olevassa esimerkissä, havainnollistivat IgM-isotyypin kullekin yllä esitetyille, Fisher-immunotyyppin suhteen spesifisille vasta-aineille.

Spesifistä vasta-ainetta tuottavien solujen kloonaus kammioista 13C1 sekä 5G2 suoritettiin itsenäisesti suorittamalla

kustakin kammiosta saaduille soluille rajalaimennus-kloonauksen useampia kierroksia, kunnes kaikki kloonauksupernatantit jotka määritettiin yllä esitetyn ELISA-menetelmän mukaisesti, antoivat positiivisen reaktion sopivalla Fisher-immunotyypillä. Kloonaus suoritettiin 96-kammioisilla, pyöreäpohjaisilla levyillä käyttämällä syöjäsoluina  $1 \times 10^5$  säteilytettyä (2400 radia) humaani PBL:a kammiota kohti. Seitsemän päivää myöhemmin kuhunkin kammiioon lisättiin vielä  $1 \times 10^5$  säteilytettyä PBL:a. Syntyvä, kloonattu solulinja, joka valmistaa anti-Fisher-immunotyyppi 5 monoklonaalista humaani vastaainetta, on merkitty 13C1:ksi, kun taas kloonattu solulinja, joka valmistaa anti-Fischer-immunotyyppi 6 monoklonaalista humaani vastaainetta, on merkitty 5G2:ksi. Kunkin kloonauksen avulla saadun linjan valmistamaa monoklonaalista vastaainetta nimitettiin vastaavan, valmistavan linjan mukaisesti.

Ennen kyseessä olevan hakemuksen jättämistä, tässä yhteydessä kuvatut solulinjat 13C1 ja 5G2 jätettiin säilytettäväksi the American Type Culture Collectioniin ja niille annettiin vastaavasti merkinnät CRL 8796 ja CRL 8797.

Immunotäpläanalyysi suoritettiin kustakin seitsemästä Fisher-immunotyypistä saaduilla ulkomembraanipreparaateilla (OMP) monoklonaalisten vasta-aineiden 13C1 ja 5G2 kanssa, esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, seuraavia muunnoksia käyttäen. Sen jälkeen kun oli inkuboitu monoklonaalisen vasta-aineen kanssa ja tämän jälkeen oli suoritettu pesusarja PBS-Tweenissä, kutakin NCM-täplää inkuboitiiin yhden tunnin ajan 25°C:ssa, alkaliseen fosfataasiin konjugoidun vuohen anti-humaani IgG + IgA + IgM:n (Zymed) laimennoksessa 1:1000 (PBS-Tweenissä). Sitten täpliä pestiin viisi kertaa viiden minuutin ajan PBS-Tweenissä, jonka jälkeen antigeeni-vasta-aine-vuorovaikutukset tehtiin näkyviksi inkuboimalla täpliä 20-30 minuutin ajan 25°C:ssa, 30 ml:ssa nitro-sininen-tetratsolium/5-bromi-

4-kloori-3-indolyylifosfaatti (NBT-BCIP) substraattia, Learyn et al., kuvaamalla tavalla, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 4045-4049. Värin kehittyminen pysäytettiin huuhtomalla täplää useita kertoja ionittomalla vedellä.

Monoklonaaliset vasta-aineet 13C1 ja 5G2 antoivat positiivisen reaktion ainoastaan niissä tapauksissa, joissa oli kysymys homologinen vasta-aine: bakteerlien ulkomembraaniyhdistelmistä. Se merkitsee, että monoklonaalinen vasta-aine reagoi ainoastaan Fisher-immunotyyppi 5:ltä peräisin olevan OMP:n kanssa ja monoklonaalinen vasta-aine reagoi ainoastaan Fisher-immunotyyppi 6:lta saadun OMP:n kanssa. Molemmissa tapauksissa reaktio antoi säännöllisesti sijoittuneiden vyöhykkeiden muodostaman tikkaiden kaltaisen kuvan, mikä ilmaisi LPS:n olleen tunnistettuna molekyylikohteena. Vahvistukseksi sille, että LPS toimi kohde-antigeenina, pantiin merkille, että tikkaiden kaltaiset kuvat olivat muuttumattomat kussakin tapauksessa, kun OMP:itä käsiteltiin lämmöllä (100°C, 1 tunti) ja inkuboitiin sitten 60°C:ssa 2 tunnin ajan proteinaasi K:n läsnäollessa (10-20 µg/50 µg proteiinia näyttesä) ennen elektroforeesin suorittamista. Jälkimmäisten esikäsittelyjen tiedetään vaurioittavan proteiiniantigeenejä.

Monoklonaalisten humaani vasta-aineiden 13C1 ja 5G2 toiminnallista aktiivisuutta in vitro tutkittiin opsonofagosyyttisellä, bakteereja tappavalla määrityksellä. Bakteerit koottiin logaritmisessa kasvuvaiheessa viljelmästä, joka oli tryptikaasi-soija-lihaliemessä, lietettiin uudelleen Hankin tasapainotettuun keittosuolaliuokseen, joka sisälsi 0,1 mM HEPESiä (HBSS/GEL/HEPES), optiseksi tiheydeksi OD660 = 0,100, sitten suoritettiin laimennus suhteessa 1:1000 samassa puskurissa. Humaanineutrofiilit eristettiin normaalien luovuttajien verestä esimerkissä I kuvatulla tavalla ja lietettiin uudelleen tiheydeksi 5x10<sup>7</sup> neutrofiiliä/ml/ HBSS/GEL/HEPES:iin. Seerumi, joka oli peräisin normaalien luovuttajien verestä, toimi humaani komplementin lähteenä.

Ennen käyttöä, yhdeksän osaa seerumia yhdistettiin 1 osan kanssa 0,1M EDTA:a, pH 7,2, ja sitten se absorboitiin P. aeruginosan seitsemän Fisher-immunotyypin kanssa esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Komplementtikomponenttien vaihtoehtoisen tien aktivoitumisen estämiseksi absorboitunutta seerumia käsiteltiin edelleen Zymosanilla (Sigma), Bjornsonin ja Michaelin kuvaamalla tavalla, J. Inf. Dis. (1974) 130 täyden- nysosa: ss. 119-125, properdiinin poistamiseksi.

Reaktiot aloitettiin 1,5 ml:n vetoisissa, keilamaisissa polypropyleeniputkissa yhdistämällä 100  $\mu$ l bakteerisuspensiota sekä 50  $\mu$ l monoklonaalista vasta-ainetta sisältävää supernatanttia. Huoneenlämpötilassa suoritettua 30 minuutin pituisen inkuboinnin jälkeen kuhunkin putkeen lisättiin 50  $\mu$ l komplementtia, 50  $\mu$ l neutrofiilisuspensiota sekä 250  $\mu$ l HBSS/GEL/HEPES:a. Putkia inkuboitiin toisen tunnin ajan 37°C:ssa, pyörijässä, jonka jälkeen 10  $\mu$ l:n erä kustakin putkesta sekoitettiin 3 ml:n kanssa nestemäistä tryptikaasi-soija-agaria (45°C), ja sisällöt kaadettiin tryptikaasi-soija-agar-levyille. Sen jälkeen kun agarin oli annettu riittävän aikaa jähmettyä, levyt päällystettiin toisella 3 ml:n suuruisella erällä nestemäistä tryptikaasi-soija-agaria. Levyjä inkuboitiin yön yli 37°C:ssa, ja muodostuvat bakteeripesäkkeet laskettiin seuraavana päivänä Quebec-pesäkelaskijassa. Sopivat kontrollit, vasta-ainespesifisyyden ja sen seikan tutkimiseksi, oliko bakteereja tappava aktiivisuus opsonofagosytoosin tulos, määritettiin (1) lisäämällä sopimatonta monoklonaalista vasta-ainetta sopivan vasta-aineen sijasta ja (2) korvaamalla neutrofiilit vastaavasti HBSS/GEL/-HEPES:illä. Kuten alempana sijaitsevilla taulukoissa on esitetty, monoklonaaliset vasta-aineet 13C1 ja 5G2 olivat bakteereja tappavia homologisten kantojensa suhteen. Kussakin tapauksessa tulokset ilmaisevat, että opsonisoitujen bakteereiden fagosytointi humaanineutrofiileillä oli ensisijaisesti syynä bakteereiden lukumäärien laskuun. Näiden

kokeiden toistaminen käyttämällä ei-homologisia vasta-aine-bakteeri-yhdistelmiä tuotti tulokseksi sen, ettei ilmennyt bakteereiden vähenemistä, havainnollistaen täten kunkin yllä esitetyn vasta-aineen toiminnallista spesifisyyttä opsoniini-vasta-aineena.

Opsonofagosyyttisen bakteereja tappavan vaikutuksen määrittäminen:

<u>13C1-vasta-aine<sup>a</sup></u>	<u>Neutrofiilit<sup>b</sup></u>	<u>Bakteeripesäkkeiden lukumäärä<sup>c</sup></u>
-	-	844
+	-	721
-	+	756
+	+	11

a(-) = anti-Fisher-immunotyyppi 2 monoklonaalinen humaanin vasta-aine 6F11

b(-) = ainoastaan HBSS/GEL/HEPES

c = Koe suoritettiin Fisher-immunotyyppiä 5 edustavilla bakteereilla

<u>5G2 vasta-aine<sup>a</sup></u>	<u>Neutrofiilit<sup>b</sup></u>	<u>Bakteeripesäkkeiden lukumäärä<sup>c</sup></u>
-	-	451
+	-	422
-	+	570
+	+	166

a(-) = anti-Fisher-immunotyyppi 2 monoklonaalinen humaanin vasta-aine 6F11

b(-) = ainoastaan HBSS/GEL/HEPES

c(-) = koe suoritettiin Fisher-immunotyyppiä 6 edustavilla bakteereilla

Käyttämällä esimerkissä 1 yksityiskohtaisesti esitettyjä menetelmiä monoklonaalisten vasta-aineiden aktiivisuuden arvioimiseksi in vivo, saatiin seuraavat tulokset, ja ne havainnollistavat selvästi, että vasta-aineet 13C1 ja 5G2 antavat suojan homologisen kannan kuolettavaa ärsykettä vastaan.

Suojaa koskevat tutkimukset in vivo:

13C1

# eläviä/kuolleita  
3 päivän kuluttua  
ärsykkeen antamisesta

13C1 (anti-Fisher 5)	10/10
C5B7 (anti-Fisher 1)	0/10

Ei muita muutoksia 3 päivän kuluttua Ärsykeannos: 5 LD<sub>50</sub>  
eläviä, Fisher-immunotyyppiä 5 edustavia bakteereita

5G2

# eläviä/kuolleita  
3 päivän kuluttua  
ärsykkeen antamisesta

5G2 (anti-Fisher 6)	10/10 C5B7
(anti-Fisher 1)	0/10

Ei muita muutoksia 3 päivän kuluttua  
Ärsykeannos: 5LD<sub>50</sub> eläviä Fisher-immunotyyppiä 6 edustavia bakteereita

Esimerkki 5

Esimerkki 5 havainnollistaa menetelmää monoklonaalisen humaanin vasta-aineen valmistamiseksi P. aeruginosan Fisher-immunotyyppejä 7 vastaan, ja edelleen se havainnollistaa mainitun vasta-aineen suojaavaa aktiivisuutta in vivo homologisen kannan kuolettavaa ärsykettä kohtaan.

Näyte perifeerisestä verestä saatiin "cystic fibrosis"-potilaalta, jonka tiedettiin poteneen P. aeruginosan aiheuttamaa kroonista infektiota. Mononukleaariset solut erotettiin verestä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Solun ylläpitämä transformaatio herkällä B-soluilla suoritettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla, paitsi että kahdeksan levyä siirrostettiin 8000 E-BL:llä sekä 60 000 1A2-solulla kammiota kohti pyöreäpohjaisilla, 96-kammioisilla levyillä.

Viljelmäsupernatanttien seulonta spesifisten vasta-aineiden suhteen suoritettiin esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Erääseen kammioista sisältyvä supernatantti, joka merkittiin 8E7:ksi, oli positiivinen ainoastaan Fisher-immunotyyppijä 4-7 käsittävillä levyillä, ja myöhemmin sen määritettiin olevan Fisher 7:ää kohtaan spesifinen, kun se määritettiin immunotyyppi-antigeeni-levyillä. Esimerkissä 4 kuvatulla tavalla suoritettujen isotyypimääritykset havainnollistivat IgM-isotyypin Fisher-immunotyyppi 7:ää kohtaan spesifiselle vasta-aineelle.

Kammioon 8E7 sisältyvien, spesifistä vasta-ainetta valmistavien solujen kloonaukset suoritettiin noudattamalla esimerkissä 4 kuvattua menetelyä. Syntyvä kloonattu solulinja, joka valmistaa anti-Fisher-immunotyyppi 7 monoklonaalista humaanin vasta-ainetta, merkitään 8E7:ksi. Tämän linjan valmistamalla monoklonaalisella vasta-aineella on sama nimitys.

Ennen tämän patenttihakemuksen jättämistä, tässä yhteydessä kuvattu solulinja 8E7 jätettiin säilytettäväksi the American Type Culture Collectioniin ja se nimitettiin CRL 8795:ksi.

Immunotäpläanalyysi, joka suoritettiin esimerkissä 4 kuvatulla tavalla, kultakin seitsemältä immunotyypiltä saadulla ulkomembraanipreparaateilla (OMP), monoklonaalisen vasta-aineen 8E7 kanssa, antoi positiivisen reaktion ainoastaan Fisher-immunotyypiltä 7 saadulla OMP:llä. Reaktion tuloksena oli säännöllisesti sijoittuneiden vyöhykkeiden muodostama, tikkaiden kaltainen kuva, joka ilmaisi LPS:n tunnistetuksi molekyylikohteeksi. Immunotäpläanalyysin antama kuva oli muuttumaton, kun Fisher-immunotyyppi 7:n OMP:a kuumennettiin ja sitä käsiteltiin proteinaasi K:lla (katso esimerkki 4) ennen elektroforeesia, mikä edelleen puhui sen puolesta, että LPS oli kohde-antigeeni.

Käyttämällä esimerkissä 1 yksityiskohtaisesti kuvattuja menetelmiä monoklonaalisen vasta-aineen aktiivisuuden määrittämiseksi in vivo, saatiin seuraavat tulokset ja havainnollistettiin helposti, että vasta-aine 8E7 antaa suojan kuolettavaa ärsykeannosta vastaan Fisher-immunotyyppiä 7 edustavia bakteereita.

Suojaustutkimukset in vivo:

8E7

# eläviä/kuolleita  
3 päivän kuluttua  
ärsykkeen antamisesta

8E7 (anti-Fisher 7)	10/10
C5B7 (anti-Fisher 1)	1/10

Ei muita muutoksia 3 päivän kuluttua  
Ärsykeannos: 5LD50 elävää, Fisher-immunotyyppiä 7 edustavaa bakteeria



### Esimerkki 6

Esimerkki 6 havainnollistaa menetelmiä monoklonaalisten humaani vasta-aineiden valmistamiseksi *Pseudomonas*-lajien, muiden kuin *P. aeruginosa*n, LPS-molekyyleillä sijaitsevia serotyyppejä vastaan. Kyseessä oleva esimerkki havainnollistaa edelleen monoklonaalisten humaani vasta-aineiden valmistamiseksi, jotka vasta-aineet on sitten valmistettu, että ne suojaavat nisäkkäitä kuolettavaa ärsykeannosta vastaan homologisia bakteereita.

Esimerkkien 1-4 mukaiset menetelmät voidaan toistaa käyttämällä lähtöaineena lymfosyyttejä, jotka on kerätty humaaniluovuttajilta, jota ovat olleet alttiina *Pseudomonaksen* muille lajeille, kuten esimerkiksi *P. malleille*, *P. pseudomalleille*, *P. fluorescensille*, *P. putidalle*, *P. cepacialle*, *P. stutzerille* sekä *P. maltophilialle*. Mahdollisia luovuttajia voidaan seuloa esimerkissä 4 kuvatulla tavalla, henkilöiden määrittelyä, jotka ovat olleet alttiina erilaisille *Pseudomonas*-lajeille sekä näiden lajien alatyypeille. Esimerkkien 1-4 mukaisia menetelmiä käyttäen saatettaisiin **päättyä jatkuvasti viljeltäviin solulinjoihin, jotka erittävät tyypispe-**sifisiä, monoklonaalisia humaani vasta-aineita *Pseudomonaksen* näiden lajien yksityyppien LPS-molekyylejä kohtaan. Näiden monoklonaalisten vasta-aineiden lisäanalyysi, esimerkkien 1-4 mukaisesti suoritettuna, identifioisi ne vasta-aineet, jotka suojaavat homologisen kannan infektiosta johtuvia, kuolettavia seurauksia vastaan.

### Esimerkki 7

Esimerkki 7 havainnollistaa menetelmää monoklonaalisten humaani vasta-aineiden valmistamiseksi, gram-negatiivisten bakteerien kantojen, muiden kuin *Pseudomonas*-suvun, LPS-molekyyleillä sijaitsevia serotyyppejä vastaan. Kyseessä oleva esimerkki havainnollistaa edelleen

monoklonaalisten humaanin vasta-aineiden valintamenetelmiä, kun vasta-aineet ovat siten valmistetut, että ne suojaavat nisäkkäitä homologisten bakteereiden kuolettavaa ärsykeantosta vastaan.

Esimerkkien 1-4 mukaiset menetelmät voidaan toistaa käyttämällä lähtömateriaalina lymfosyyttejä, jotka on koottu humaaniluovuttajilta, jotka olivat alttiina gram-negatiivisten bakteereiden muille kannoille, kuten esimerkiksi E. colille, K. pneumoniaelle, P. vulgarikselle sekä S. marcescensille. Mahdolliset luovuttajat voidaan seuloa henkilöiden tunnistamiseksi, jotka aiemmin olivat alttiina sellaisten bakteerien erilaisille kannoille. Aiemmin kuvattujen menetelmien käyttäminen antaisi tuloksena jatkuvasti viljeltäviä solulinjoja, jotka erittävät monoklonaalisia humaanin vasta-aineita E. colin, K. pneumoniaen, P. vulgariksen sekä S. marcescensin LPS-molekyyleillä sijaitsevia serotyyppejä determinantteja kohtaan. Näiden monoklonaalisten humaanin vasta-aineiden analyysi aiemmin kuvatulla tavalla ilmaisisi, mitkä vasta-aineet suojaavat homologisten kantojen aiheuttamista infektioista johtuvilta, kuolemaan johtavilta seurauksilta, edellyttäen, että homologisen kannan LPS-kohdemolekyylit ovat "alttiita" (katso LPS-molekyylin "alttiutta" koskevaa pohdintaa yllä).

#### Farmaseuttiset formulaatiot ja käyttö

Kyseessä olevan keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita saatetaan sisällyttää komponentteina farmaseuttisiin koostumuksiin, jotka sisältävät terapeutin tai ehkäisevän määrän ainakin yhtä kyseessä olevan keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta farmaseuttisesti tehokkaan kantaja-aineen kanssa. Farmaseuttisen kantaja-aineen tulisi olla mikä tahansa yhteen sopiva, myrkytön aine, joka soveltuu monoklonaalisten vasta-aineiden luovuttajaksi potilaalle.

Steriiliä vettä, alkoholia, rasvoja, vahoja sekä inerttejä kiinteitä aineita saatetaan käyttää kantaja-aineena. Farmaseuttisesti hyväksyttäviä apuaineita (puskuroivia aineita, dispergoivia aineita) saatetaan sisällyttää farmaseuttiseen koostumukseen. Sellaiset koostumukset voivat sisältää yksinkertaisen, monoklonaalisen vasta-aineen ollakseen spesifisiä bakteerin yhtä kantaa tai tyyppiä kohtaan. Tämä tarjoaa sen edun, että materiaali on erinomaisen spesifistä eikä sisällä mitään asiaankuulumattomia vasta-aineita. Sellaisen tuotteen haittana saattaa myös olla, että se on niin spesifinen, ettei se sovellu laajalti käytettäväksi. Vaihtoehtoisesti, farmaseuttinen koostumus voi sisältää kaksi tai useampia monoklonaalisia vasta-aineita, jotta muodostuu "coctail". Esimerkiksi P.aeruginosan ollessa kysymyksessä, "coctailin", joka sisältää monoklonaalisia humaani vasta-aineita kutakin immunotyypin tai serotyypin kohtaan, tulisi olla yleistuote, jolla on aktiivisuutta tuon tietyn bakteerin tavallisten tyyppien pääosaa kohtaan. Muiden lajien tai kantojen ollessa kysymyksessä voidaan käyttää myös yksinkertaista vasta-ainetta tai vasta-aineiden seosta.

Erityistä mielenkiintoa on terapeuttisilla koostumuksilla, joissa on vähintään kaksi monoklonaalista humaani vasta-ainetta, tavallisesti vähintään kolme, tavallisemmin vähintään neljä, usein vähintään seitsemän, ja saattaa olla kymmenen tai useampia vasta-aineita. Erityistä mielenkiintoa on ainakin kahden monoklonaalisen humaani vasta-aineen yhdistelmillä, jotka spesifisesti reagoivat ainakin kahden Fisher-immunotyypin kanssa, erikoisesti ainakin kahden kanssa Fisher-immunotyypeistä 1, 2, 3, 4, 5, 6, ja 7 sekä mieluummin ainakin neljän kanssa. Edulliset koostumukset reagoivat ainakin neljän Fisher-immunotyypin kanssa. Edulliset koostumukset reagoivat ainakin neljän Fisher-immunotyypin kanssa, edullisemmin 5-6 tyyppin kanssa ja edullisimmin kaikkien seitsemän kanssa.

Erilaisten komponenttien moolisuhde ei tavallisesti vaihtelee enemmän kuin kertoimen 10 verran, tavallisesti ei enempää kuin kertoimen 5 verran, ja tavallisesti moolisuhde tulee olemaan noin 1:1-2 jokaiselle muulle komponentille.

Monoklonaaliset humaanit vasta-aineet sekä niiden farmaseuttiset koostumukset, jotka ovat tämän keksinnön mukaisia, ovat erityisen käyttökelpoisia suun kautta tai parenteraalisesti suoritettavaan annosteluun. Mieluummin saatetaan farmaseuttisia koostumuksia annostella parenteraalisesti, esim. ihonalaisesti, lihaksen- tai laskimonsisäisesti.

Täten tämä keksintö antaa käyttöön parenteraalista annostelua varten koostumuksia, jotka käsittävät monoklonaalisen humaanin vasta-aineen liuoksen tai niiden seoksen hyväksyttävän kantaja-aineen liuoksen tai niiden seoksen hyväksyttävän kantaja-aineeseen, mieluummin vettä sisältävään kantaja-aineeseen liuotettuna. Voidaan käyttää erilaisia vettä sisältäviä kantaja-aineita, esim. vettä, puskuroitua vettä, 0,4 %:ista keittosuolaliuosta, 0,3 %:ista glysiiniä yms. Nämä liuokset ovat steriilejä ja yleensä ne eivät sisällä kiinteää ainetta. Nämä koostumukset saatetaan steriloida tavantomaisilla, hyvin tunnetuilla sterilointimentelmillä. Koostumukset saattavat sisältää farmaseuttisesti hyväksyttäviä apu-aineita, joita tarvitaan, jotta olosuhteet muistuttavat fysiologisia olosuhteita, kuten esimerkiksi pH:n säätö- ja puskurointiaineita, (osmoottista) painetta säätäviä aineita yms., esimerkiksi natriumasettaattia, natriumkloridia, kaliumkloridia, natriumlaktaattia jne. Vasta-aineen konsentraatio näissä formulaatioissa voi vaihdella laajalti, esim. alle 0,5 %:ista, tavallisesti 1 %:sta aina 15 tai 20 %:iin (painoa), ja se valitaan ensisijaisesti nestetilavuuksien, viskositeettien jne. perusteella, mieluummin valittua, erityistä annostelutapaa varten.

Täten, tyypillinen, farmaseuttinen koostumus lihaksensisäistä annostelua varten voitaisiin valmistaa sisältämään 1 ml steriiliä, puskuroitua vettä sekä 50 mg monoklonaalista vasta-ainetta. Tyypillinen koostumus laskimonsisäistä ruisketta varten voitaisiin valmistaa sisältämään 250 ml steriiliä Ringerin liuosta ja 150 mg monoklonaalista vasta-ainetta. Varsinaiset menetelmät parenteraalisesti annosteltavien koostumusten valmistamiseksi ovat tunnettuja tai aiheeseen perehtyneille selviä, ja niitä kuvataan yksityiskohtaisemmin esim. Remington's Pharmaceutical Sciencessä, 15. painos, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1975), joka on viitteenä liitetty tähän yhteyteen.

Kyseessä olevan keksinnön mukaiset vasta-aineet voidaan lyofisoida varastointia varten ja muodostaa uudelleen sopivaan kantaja-aineeseen käyttöä varten. Tämän tekniikan voidaan osoittaa olevan tehokas tavanomaisten immunoglobuliinien ollessa kysymyksessä, ja voidaan käyttää tunnettuja lyofolisointi- ja uudelleenmuodostamismenetelmiä. Aiheeseen perehtyneet ymmärtävät täysin, että lyofilisointi ja uudelleenliuottaminen voivat johtaa vaihtelevassa määrin vasta-aineen aktiivisuuden häviämiseen esimerkiksi tavanomaisilla immunoglobuliineilla, IgM-vasta-aineilla on suuremmassa määrin taipumus menettää aktiivisuutta kuin IgG-vasta-aineilla) ja että tämä voidaan kompensoida käyttötasoja säätämällä.

Koostumuksia, jotka sisältävät kyseessä olevaa monoklonaalista vasta-ainetta tai niiden seosta, voidaan antaa ennalta ehkäisemään gram-negatiivisen bakteerin aiheuttamaa sairautta tai sen hoitamiseen. Terapeuttisessa käytössä koostumuksia annetaan potilaalle, joka jo potee gram-negatiivisen bakteerin aiheuttamaa infektiota, riittävässä määrin parantamaan tai ainakin osittain pysäyttämään infektio ja sen komplikaatiot. Määrä, joka on riittävä tämän toteuttamiseksi, määritellään "terapeuttisesti tehokkaana annoksena".

Tässä käytössä tehokkaat määrät riippuvat infektion vakavuudesta sekä potilaan immuunijärjestelmän yleisilasta, mutta yleensä ne ovat noin yhdestä noin 200 mg:aan vasta-ainetta kilogrammaa kohti kehon painoa siten, että yleisemmin käytetään annoksia, josta ovat 5-25 mg kilogrammaa kohti. Täytyy muistaa, että keksinnön mukaisia materiaaleja voidaan yleisesti käyttää vakavissa tautitilanteissa, se merkitsee, henkeä uhkaavissa tai mahdollisesti henkeä uhkaavissa tilanteissa, erityisesti bakteremiassa ja endotoksemiassa. Sellaisissa tapauksissa, ottaen huomioon vieraiden aineiden sekä "vieraan aineen" hylkimisen poissaolon, jotka saavutetaan kyseessä olevan keksinnön mukaisilla monokloonaalisilla humaani vasta-aineilla, on mahdollista, ja hoitava lääkärinä saattaa tuntua toivottavalta, annostella näitä vasta-aineita oleellisia ylimääriä.

Annosteltaessa ehkäisevässä mielessä, koostumuksia, jotka sisältävät kyseessä olevaa vasta-ainetta tai vasta-aineiden seoksia, annetaan potilaalle, joka ei ole vielä gram-negatiivisten bakteereiden infektoima, jpotilaan vastustuskyvyn lisäämiseksi sellaista mahdollista infektiota kohtaan. Sellainen määrä määritellään "ennalta ehkäisevästi tehokkaaksi annokseksi". Tässä käytössä tarkka määrä riippuu jälleen potilaan terveydentilasta ja immuniteetin yleisestä tasosta, mutta yleensä annoksen taso on 0,1-25 mg kilogrammaa kohti, erityisesti 0,5-2,5 mg kilogrammaa kohti.

Koostumusten yksinkertaiset ja moninkertaiset annostelut voidaan suorittaa hoitavan lääkärin valitsemin annostasoin ja -tavoin. Joka tapauksessa, farmaseuttisten formulaatioiden tulisi antaa käyttöön riittävä määrä kyseessä olevan keksinnön mukaista (mukaisia) vasta-ainetta (vasta-aineita) potilaan tehokkaaksi hoitamiseksi.

Vaikka kyseessä olevaa keksintöä on kuvattu jossain määrin yksityiskohtaisesti, valaisemalla sitä esimerkein, jotta keksintö olisi paremmin ymmärretty, on selvää, että saatetaan suorittaa tiettyjä muunnoksia ja muutoksia liitteenä seuraavien patenttivaatimusten puitteissa.

#### PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä monoklonaalisen humaanivasta-aineen valmistamiseksi, joka reagoi spesifisesti jonkun suvuista Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae tai Pseudomonadaceae peräisin olevan gram-negatiivisen bakteerin luoksepäästävien lipopolysakkaridimolekyylien pinnalla sijaitsevien serotyypisten determinanttien kanssa, t u n n e t t u siitä, että tehdään jatkuvasti viljeltäviksi gram-negatiivisille bakteeriantigeeneille altistuneelta potilaalta saadut humaan-B-solut; eristetään näistä jatkuvasti viljeltäviksi tehdyistä B-soluista ne solulinjat, jotka erittävät monoklonaalisia vasta-aineita, jotka reagoivat bakteerin lipopolysakkaridimolekyylin kanssa; tutkitaan mainituista solulinjoista peräisin olevien monoklonaalisten vasta-aineiden aktiivisuus gram-negatiivista bakteeria vastaan; ja viljellään solulinja, joka pystyy tuottamaan tätä monoklonaalista vasta-ainetta ja otetaan talteen solulinjan erittämät monoklonaaliset vasta-aineet.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että B-solut tehdään jatkuvasti viljeltäviksi Epstein-Barr-virusformaatiolla.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solulinja on hybridisolulinja.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solulinja on transformoitu imusolu.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luoksepäästäville lipopolysakkaridimolekyyille spesifiset monoklonaaliset vasta-aineet ovat IgG- tai IgM-istyyppiä.

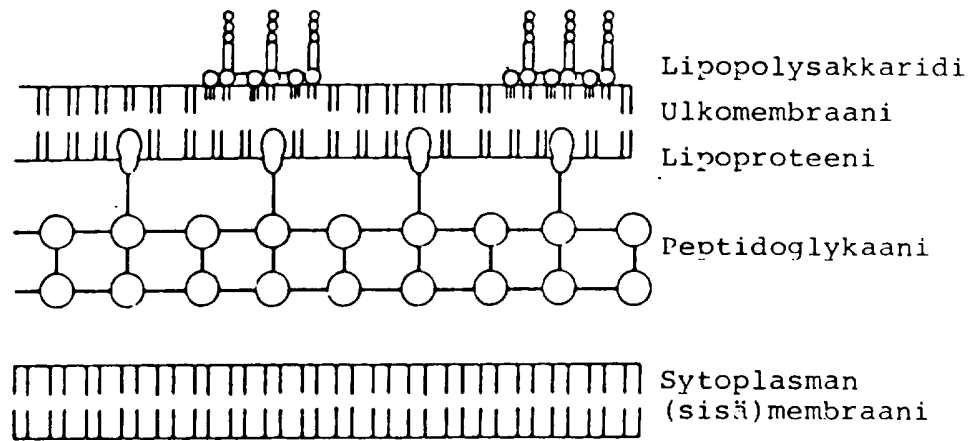
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solulinja on ATCC-talletusnumeroltaan joku seuraavista: CRL 8562, CRL 8752, CRL 8753, CRL 8754, CRL 8795, CRL 8796 tai CRL 8797.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine pystyy reagoimaan Pseudomonas aeruginosan lipopolysakkaridin kanssa.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Pseudomonas aeruginosa on Fisher-immunotyyppejä 1-7.
9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine neutraloi kyseisen bakteerin infektiivisyyden.
10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine neutraloi jonkun suvusta Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae tai Pseudomonadaceae peräisin olevan gram-negatiivisen bakteerin.
11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerilaji on Pseudomonas aeruginosa.

#### PATENTTKRAV

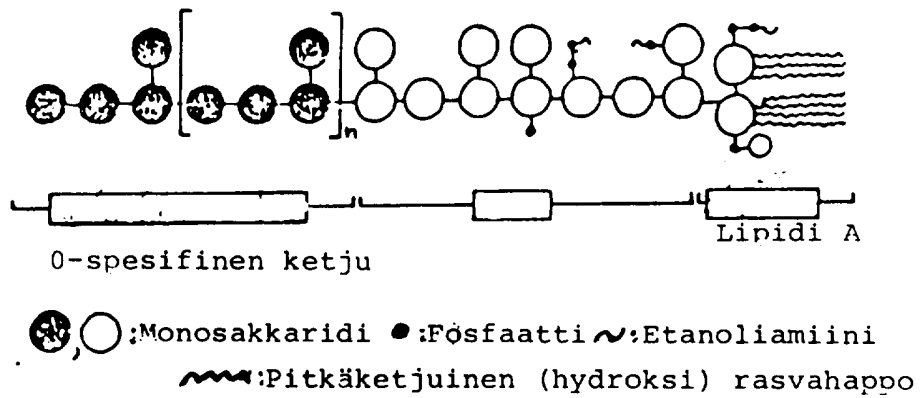
1. Metod för framställning av monoklonal human antikropp, som reagerar specifikt med de serotypiska determinanterna på lipopolysackaridmolekylernas yta, som är tillgänglig på en gram-negativ bakterie härstammande från någon av släkten Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae eller Pseudomonadaceae, vilken metod k ä n n e t e c k n a s av att man immortaliserar humana B-celler, som fåttts av patient som utsatts för gram-negativa bakterieantigener; isolerar från dessa immortaliserade B-celler de cellinjer, som avsöndrar monoklonala antikroppar, som reagerar med bakteriens lipopolysackaridmolekyl; analyserar de från sagda cellinjer härstammande monoklonala antikropparnas aktivitet mot gram-negativa bakterier; och odlar cellinjen, som förmår producera denna monoklonala antikropp och återvinner de monoklonala antikroppar, som cellinjen avsöndrar.



2. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att B-cellerna är immortaliserade med Epstein-Barr virustransformationen.
3. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att cellinjen är en hybrid cellinje.
4. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att cellinjen är en transformerad lymfocyt.
5. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att de specifika monoklonala antikropparna, som är tillgängliga på lipopolysackaridmolekylerna, är av IgG- eller IgM-isotyp.
6. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att cellinjen har något av ATCC-kodnumren: CRL 8562, CRL 8752, CRL 8753, CRL 8754, CRL 8795, CRL 8796, eller CRL 8797.
7. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen förmår reagera med *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysackarid.
8. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att *Pseudomonas aeruginosa* är av Fisher immunotyp 1-7.
9. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen neutraliserar sagda bakteries infektiösa verkan.
10. Metod enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den monoklonala antikroppen neutraliserar den infektiösa verkan av en gram-negativ bakterie tillhörande någon av släkterna *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* eller *Pseudomonadaceae*.
11. Metod enligt patentkrav 10, kännetecknad av att bakteriearten är *Pseudomonas aeruginosa*.



Kuva 1.



Kuva 2.