

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 3282/86

(51) Int.Cl.⁶ : **C12N 5/24**
G01N 33/577, C12P 21/08

(22) Anmeldetag: 10.12.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1995

(45) Ausgabetag: 27.12.1995

(30) Priorität:

10.12.1985 US 807394 zuerkannt.
24.11.1986 US 931179 zuerkannt.

(73) Patentinhaber:

GENETIC SYSTEMS CORPORATION
98121 SEATTLE (US).

(56) Entgegenhaltungen:

WO 86/03754A1

(54) ZELL-LINIEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON HUMANEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN SOWIE KIT UND VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ANWESENHEIT VON P.AERUGINOSA

(57) Es wurden Zell-Linien hergestellt, die humane monoklonale Antikörper absondern, die zu einer Bindung an die Lipopolysaccharid-Moleküle ausgewählter Pseudomonas aeruginosa IATS Serotypen befähigt sind.

Es werden Verfahren zur Herstellung dieser Zell-Linien sowie Verfahren zur Gewinnung der Antikörper angegeben. Weiters wird ein Kit und ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von P.aeruginosa angegeben.

Die kontinuierlichen transformierten humanen Zell-Linien werden bei der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung CRL 8941, 9171 und 9258 hinterlegt.

AT 400 441 B

Die vorliegende Erfindung betrifft unsterbliche transformierte Zell-Linien, die einen humanen monoklonalen Antikörper absondern, der spezifisch mit weniger als allen, jedoch zumindest mit zwei IATS Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* reagiert.

Ebenso betrifft die Erfindung einen Kit zur Feststellung der Anwesenheit von *Pseudomonas aeruginosa*.

5 Weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung sind ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von *Pseudomonas aeruginosa* in einer Probe, Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern, die zur spezifischen Reaktion mit einer Mehrzahl von, jedoch nicht allen IATS Serotypen und mit null, einem, zwei oder mehreren Fisher Immunotypen von *Pseudomonas aeruginosa* befähigt sind, sowie Verfahren zur Herstellung einer Zell-Linie, die die oben genannten monoklonalen Antikörper produziert.

10 Somit beschäftigt sich die vorliegende Erfindung mit der Anwendung immunologischer Verfahren zur Schaffung neuer, zur Diagnose und Behandlung von *P. aeruginosa* brauchbarer Materialien und betrifft insbesondere die Gewinnung und Anwendung humaner monoklonaler Antikörper, die imstande sind, mit mehreren Serotypen von *P. aeruginosa* zu reagieren.

Gram-negative Krankheiten und deren ernsteste Komplikationen, z.B. Bakteriämie und Endotoxämie, 15 sind die Ursache einer signifikanten Morbidität und Mortalität bei menschlichen Patienten. Dies gilt insbesondere für den gram-negativen Organismus *P. aeruginosa*, der während der letzten 50 Jahre in steigendem Maß mit Bakterieninfektionen, insbesondere nosokomialen Infektionen, im Zusammenhang stand.

Während der letzten Jahrzehnte waren die Antibiotika die Therapie der Wahl zur Bekämpfung gram- 20 negativer Krankheiten. Die fortgesetzte hohe Morbidität und hohe Mortalität im Zusammenhang mit gram-negativen Bakterieninfektionen ist jedoch ein Zeichen für die Grenzen der Antibiotika-Therapie, insbesondere im Hinblick auf *P. aeruginosa* (Bgl. z.B.: Andriole, V.G., "Pseudomonas Bacteremia: Can Antibiotic Therapy Improve Survival?", J. Lab.Clin. Med. (1978) 94:196-199). Dadurch wurde die Suche nach anderen Methoden der Vorsorge und Behandlung forciert.

Ein Verfahren, das in Betracht gezogen wurde, ist die Verbesserung des Immunsystems des Wirts 25 durch aktive oder passive Immunisierung. Beispielsweise wurde beobachtet, daß die aktive Immunisierung von Menschen oder Versuchstieren mit bakteriellen Ganzzellenvaccinen oder gereinigten bakteriellen Endotoxinen aus *P.aeruginosa* zur Entwicklung von spezifischen opsonischen Antikörpern führt, die in erster Linie auf Determinanten an den sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten der an der äußeren Zellmembran von *P.aeruginosa* gelegenen Lipopolysaccharid-(LPS)-Moleküle gerichtet sind (vgl. Pollack, M. Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations, Alving, B.M. und Finlayson, J.S., eds, S. 30 73-79, U.S. Department of Health and Human Services, 1979). Solche entweder aktiv gebildete oder passiv übertragene Antikörper erwiesen sich als Schutz gegen die letale Wirkung von *P.aeruginosa*-Infektionen bei den verschiedensten tierischen Modellen (Pollack, s.o.) und bei manchen Voruntersuchungen an Menschen (vgl. Young, L.S. und Pollack., M., *Pseudomonas aeruginosa*, Sabath, L., ed., S. 119-132, Hans Huber, 35 1980). Als besonders wichtig bei der Rolle dieser Antikörper im Menschen hat sich die Tatsache herausgestellt, daß bei Patienten mit *P. aeruginosa*-Bakteriämie ein Zusammenhang zwischen dem Überleben und hohen Akutserumtitern von Antikörpern für LPS-Moleküle des infizierenden Stammes gefunden wurde (vgl. Pollack, M., und Young, L.S., J. Clin Invest., 63:276-286, (1979)).

40 Die obigen Berichte legen die Verwendung immunotherapeutischer Möglichkeiten zur Verhinderung und Behandlung von Bakterieninfektionen durch *P.aeruginosa* nahe, wie etwa die Verabreichung gepoolter Human-Immunoglobuline, die Antikörper gegen den (die) infizierenden Stamm (Stämme) enthalten. Humanimmunoglobuline sind hier als der Anteil des fraktionierten Humanplasmas definiert, der an Antikörpern angereichert ist, unter denen spezifische Antikörper für Stämme von *P.aeruginosa* vorliegen. Wegen 45 bestimmter inherenter Grenzen bei der Verwendung von Humanimmunoglobulin-Zusammensetzungen ist diese Möglichkeit zur Behandlung von Krankheiten durch *P.aeruginosa* noch immer Gegenstand von Forschungen (vgl. beispielsweise Collins, M.S. und Roby, R.E., Am. J.Med., 76(3A):168-174, (1984)) und es sind bisher noch keine Produkte auf der Basis dieser Bestandteile im Handel.

Eine dieser Grenzen für die Verwendung von Immunoglobulin-Zusammensetzungen besteht darin, daß 50 diese Zusammensetzungen aus gepoolten Proben von tausend und mehr Spendern bestehen, welche Proben auf die Anwesenheit spezieller anti-*Pseudomonas*-Antikörper vorselektiert wurden. Dieses Poolen führt zu einem Mitteln der individuellen Antikörper-Titer, was bestenfalls zu einem bescheidenen Anstieg des entstehenden Titers der gewünschten Antikörper führt.

Eine andere Beschränkung liegt darin, daß das Vorselektierungsverfahren selbst eine ständige teure 55 Prüfung des Spender-Pools erfordert, um den Produktbestand zu gewährleisten. Trotz dieser Anstrengungen können die Immunoglobulin-Produkte von Probe zu Probe und bei Produkten aus verschiedenen geographischen Regionen beträchtliche Unterschiede zeigen.

Noch eine weitere inherente Begrenzung der Verwendung von Immunglobulin-Zusammensetzungen beruht auf der Tatsache, daß sie aus der gleichzeitigen Verabreichung großer Mengen artfremder Protein-
substanzen stammen (die auch Viren enthalten können, wie sich erst vor kurzem im Zusammenhang mit
dem Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS - gezeigt hat), wodurch die Möglichkeit des Auftretens
5 nachteiliger biologischer Wirkungen gegeben ist. Eine Kombination geringer Titer an gewünschten Antikörpern
mit einem hohen Gehalt an artfremden Substanzen kann oft die Menge spezifischer und daher positiv
wirkender Immunglobulin(e), die dem Patienten verabreicht wird, auf unteroptimale Niveaus beschränken.

In der Literatur ist eine Reihe von Serotypen-Schemata beschrieben, die zur Analyse von *Pseudomonas*
aeruginosa - Infektionen brauchbar sind. Diese Schemata beruhen primär auf den hitzestabilen hauptsächli-
10 chen somatischen Antigenen dieses Organismus (vgl. Zierdt, C.H., in *Glucose Nonfermenting Gram-*
Negative Bacteria in Clinical Microbiology, Gilardi, G.L., ed., CRC Press, S. 213-238 (1978)). Durch die
übermäßig vielen Serogruppierungsschemata wurden die serologischen Studien von *P. aeruginosa* schwer
vergleichbar und daher ist die Auswahl irgend eines gegebenen Systems zum Zweck der Prüfung der
Überstände einigermaßen willkürlich. Die Verwirrung im Bereich der Typensysteme wurde in letzter Zeit
15 durch die Schaffung des International Antigenic Typing Scheme (IATS)-Systems geklärt, welches von dem
Subkomité für *Pseudomonadaceae* des Internationalen Komités für systematische Bakteriologie als
Grundlage für die weiteren Studien von *P.aeruginosa* vorgeschlagen wurde. Dieses System, das 17
unterschiedliche Serotypen kennt, die als IATS-Typ 1, IATS-Typ 2 usw. bezeichnet werden, umfaßt alle
hitzestabilen wichtigen somatischen Antigene, die in früheren Systemen identifiziert wurden. Vgl. Liu, P.V.,
20 *Int. J.Syst. Bacteriol.*, 33:256-264, (1983), worauf hier bezug genommen wird.

Bei der Entwicklung protektiver monoklonarer Antikörper, die bei den Stämmen von *P.aeruginosa*
kreuzreaktiv sind, ist es auch von Vorteil, ein Typensystem einzuführen, das auf den protektiven Antigenen
von *P. aeruginosa* beruht. Ein derartiges System wurde mit der Absicht aufgestellt, eine Vaccine für die
klinische Verwendung zu entwickeln, und ist detailliert in Fisher, M.W. et al., *J. Bacteriol.*, 98:835-836,
25 (1969) beschrieben. Dieses meist als Typensystem nach Fisher bezeichnete System teilt die Mehrzahl der
bekannten *P.aeruginosa* in sieben Typen ein, die als Fisher Immunotyp 1, Fisher Immunotyp 2 usw.
bezeichnet werden. Ein Zusammenhang zwischen dem IATS-Typen- und dem Fisher-Typen-System wurde
aufgestellt (vgl. Liu, P.V. et al. supra) und in Tabelle I dargestellt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, gibt es für
bestimmte IATS-Serotypen keine entsprechenden Fisher-Immuntypen, obwohl jedem Fisher-Immunotyp
30 ein bestimmter IATS-Serotyp zugeordnet wird. Es wird sowohl für die IATS-Typen als auch für die Fisher-
Typen angenommen, daß die für beide Serotypen-Schemata relevanten antigenen Determinanten in den
Oberflächen-LPS-Molekülen von *P. aeruginosa* liegen. (Liu, P.V. et al., supra; Hanessian, F., et al., *Nature*,
229: 209-210 (1979).

35

40

45

50

55

Tabelle 1

5
10
15
20
25

Vergleich und Zusammenhang zwischen IATS- und Fisher-Typen von P.aeruginosa	
IATS	Fisher
1	4
2	3
3	-
4	-
5	7
6	1
7	-
8	6
9	-
10	5
11	2
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-

1975 berichteten Köhler und Milstein ihre epochemachende Entdeckung, daß bestimmte Mauszell-Linien mit Mausmilzzellen vereinigt werden können, um Hybridome zu schaffen, von denen jedes Antikörper einer einzigen Spezifität, d.h. monoklonale Antikörper, ausscheidet (Köhler, G., und Milstein, C., Nature 256:495-497 (1975)). Durch die Kenntnis dieser Technologie wurde es möglich, in manchen Fällen große Mengen außerordentlich spezifischer Maus-Antikörper für eine spezielle Determinante oder Determinanten an Antigenen zu produzieren. Derartige monoklonale Maus-Antikörper oder Zusammensetzungen derartiger Antikörper können jedoch größere Nachteile bei der Verwendung beim Menschen haben, insbesondere im Hinblick auf die Erkenntnis, daß monoklonale Maus-Antikörper bei Versuchsstudien zur Behandlung bestimmter Erkrankungen des Menschen oft eine Immunreaktion zeigten, die sie unwirksam machte (Levy, R.L. und Miller, R.A., Ann. Rev. Med., 34:107-116, (1983)).

Bei Verwendung der Hybridom-Technologie berichteten Sadoff et al. die Gewinnung eines monoklonalen Maus-Antikörpers der IgM-Klasse, der gegen eine O-Seitenkettendeterminante auf den LPS-Molekülen eines speziellen Serotyps von P.aeruginosa gerichtet war (Abstracts of the 1982 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Nr. 253. Weiters wird dort angegeben, daß dieser Maus-Antikörper Mäuse gegen einen letalen Angriff von P.aeruginosa des gleichen Serotyps wie jenem, gegen den die Antikörper gerichtet waren (d.h. den homologen Serotyp), schützt. Verschiedene anschließende Artikel geben detailliert die Entwicklung muriner und humaner monoklonaler anti-P. aeruginosa LPS Antikörper verschiedener Spezifität an, z.B. Sawada, S., et al., J. Inf. Dis., 150:570-576, (1984); Sadoff, j., et al., Antibiot. Chemother., 36:134-146, (1985); Hancock, R., et al., Infect. Immun. 37:166-171 (1982); Siadak, A.W. und Lostrom, M.E., Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies, Engleman, E.G., et al., eds., S. 167-185, Plenum Publishing Corp. (1985) und Sawada, S. et al., J. Inf. Dis., 152:965-970, (1985). Herstellung und immunotherapeutische Anwendung von ant-P- aeruginosa LPS Serotyp-spezifischen monoklonalen Antikörpern ist in den US-PSen 4 834 975 und 4 970 070 angegeben, auf die hier bezug genommen wird.

Obwohl es in manchen Fällen vorteilhaft sein kann, monoklonale Antikörper, die für einen einzigen IATS-Serotyp von P.aeruginosa spezifisch sind, zu verwenden, so z.B. wenn eine Infektion auf einen einzigen Serotyp zurückzuführen ist, so ist dies in anderen Fällen nicht vorteilhaft. Beispielsweise wäre es bei der prophylaktischen Behandlung möglicher Infektionen beim Menschen günstig, einen humanen Antikörper oder humane Antikörper, die gegen eine Vielzahl von IATS-Serotypen Schutz gewähren, zu verabreichen. Ebenso wird es bei therapeutischer Anwendung, wenn der oder die Serotyp(en) des infizierenden Stamms bzw. der infizierenden Stämme nicht bekannt sind, bevorzugt, einen humanen Antikörper oder humane Antikörper zu verabreichen, der (die) gegen die meisten, wenn nicht gegen alle der klinisch wichtigen IATS-Serotypen von P.aeruginosa wirksam ist (sind). Während eine Kombination humaner

monoklonaler Antikörper, von denen jeder für einen einzigen IATS-Serotyp von P.aeruginosa spezifisch ist, theoretisch zum Schutz gegen verschiedenen Serotypen formuliert werden kann, wäre doch eine solche Zusammensetzung schwer zu entwickeln und von Standpunkt der Herstellung unwirtschaftlich in der Produktion.

5 Demzufolge besteht ein ausgesprochener Bedarf an humanen, monoklonalen anti-P.aeruginosa-Antikörpern, die imstande sind, zahlreiche IATS-Serotypen von P.aeruginosa zu erkennen und gegen sie zu schützen. Weiters sollten diese Antikörper zum Einsatz in der prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von Infektionen durch P.aeruginosa verwendbar sein. Die vorliegende Erfindung entspricht diesen Bedürfnissen.

10 Erfindungsgemäß werden neue Zell-Linien zur Verfügung gestellt, die humane monoklonale Antikörper produzieren können, die ihrerseits imstande sind, spezifisch mit den LPS-Molekülen einer Vielzahl von, jedoch nicht mit allen IATS-Serotypen von P.aeruginosa zu reagieren. Diese Antikörper haben unterschiedliche Reaktionsfähigkeiten mit Fisher-Immuntypen, wobei sie sich an Null, einen oder an eine Vielzahl von Fisher-Immuntypen binden.

15 Die Zellen haben identifizierbare Chromosome, in welchen die Keimlinien-DNS oder die DNS von Precursor-Zellen umgeordnet wurde, um für einen Antikörper zu codieren, der eine Bindungsstelle für ein bei bestimmten P.aeruginosa-Serotypen übliches Epitop hat. Diese humanen monoklonalen Antikörper können auf sehr unterschiedliche Weise verwendet werden, u.a. bei der Diagnose und der Therapie (z.B. als Schutz in vivo).

20 Eine derartige Zell-Linie kann dadurch hergestellt werden, daß eine Epstein-Barr-Virus-Transformation von B-Lymphocytenzellen menschlicher Spender, die Serotypen von P.aeruginosa ausgesetzt waren, vorgenommen wird.

Ebenso kann eine derartige Zell-Linie dadurch hergestellt werden, daß eine Zellfusion zwischen geeignet drogenmarkierten humanen Myelom-, Mausmyelom- oder Human-Maus-Heteromyelomzellen, bzw.
25 humanen Lymphoblastoidzellen mit menschlichen B-Lymphocytenzellen vorgenommen wird.

Typischerweise sind die Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung transformierte humane Lymphocyten, die protektive humane monoklonale Antikörper für erreichbare LPS-Moleküle von P.aeruginosa produzieren. Unter "erreichbar" versteht man, daß die LPS-Moleküle in der Umgebung physikalisch für eine direkte Wechselwirkung mit den monoklonalen Antikörpern zur Verfügung stehen. Die so angebotenen
30 monoklonalen Antikörper sind zur Behandlung und Prophylaxe von ernsten, auf P.aeruginosa zurückzuführenden Krankheiten geeignet. Die LPS-Moleküle der äußeren Membran von P.aeruginosa stehen für den direkten Kontakt mit den Antikörper-Molekülen zur Verfügung, wodurch eine durch das Komplement vermittelte Lyse und/oder Phagozytose des Organismus erleichtert wird. Weiters werden jene LPS-Moleküle, die von der äußeren Membran gegen die darum liegende Umgebung abgeschirmt sind, ebenso
35 frei, um direkt mit den Antikörper-Molekülen zu reagieren und über das reticuloendotheliale System abgeführt zu werden.

Die erfindungsgemäßen neuen Zell-Linien haben die Bezeichnung A.T.C.C. Nr. CRL 8941, 9171 oder 9258.

40 Die Herstellung der humanen monoklonalen Antikörper kann dadurch erfolgen, daß eine Epstein-Barr-Virus Transformation von B-Lymphocytenzellen vorgenommen wird, die aus einem menschlichen Spender erhalten wurden, der Serotypen von P.aeruginosa ausgesetzt war, und die oben definierten monoklonalen Antikörper oder Zusammensetzungen, die diese oder Fragmente derselben mit der gleichen Reaktionsfähigkeit wie die Antikörper enthalten, gewonnen werden.

45 Die so hergestellten, den Antikörper absondernden Zell-Linien werden als kontinuierlich wachsende Lymphoblastoid-Zellen gekennzeichnet, die einen diploiden Karyotyp besitzen, die Epstein-Barr-nuklearantigen-positiv sind und einen monoklonalen Antikörper vom IgG-, IgM-, IgA- oder IgD-Isotyp inklusive verschiedener Subtypen wie IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 absondern. Das zellgetriebene Transformationsverfahren selbst wird detailliert in der US-PS 4 464 465 beschrieben, auf die hier bezug genommen wird. Die monoklonalen Antikörper können als Ganzes oder als Fragmente, wie Fv, Fab, F(ab')₂ verwendet werden,
50 sind jedoch meist intakt.

Andererseits können die humanen, monoklonalen Antikörper dadurch hergestellt werden, daß eine Zellfusion zwischen geeignet drogenmarkierten humanen Myelom-, Mausmyelom- oder Human-Maus-Heteromyelomzellen bzw. humanen Lymphoblastoidzellen mit humanen B-Lymphocyten vorgenommen wird und die oben definierten monoklonalen Antikörper oder Zusammensetzungen, die diese oder Fragmente
55 derselben mit der gleichen Reaktionsfähigkeit wie die Antikörper enthalten, gewonnen werden.

Gemäß der vorliegenden Erfindung können die humanen monoklonalen Antikörper unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zell-Linien hergestellt werden, d.h. daß Zell-Linien mit der Bezeichnung A.T.C.C. Nr. CRL 8941, 9171 oder 9258 gezüchtet und daraus die definierten monoklonalen Antikörper oder Zusammen-

setzungen, die diese oder Fragmente derselben mit der gleichen Reaktionsfähigkeit wie die Antikörper enthalten, gewonnen werden.

Die Zell-Linien gemäß der vorliegenden Erfindung können auch eine andere Verwendung finden als für die direkte Herstellung humaner monoklonaler Antikörper. Die Zell-Linien können mit anderen Zellen (wie geeigneterweise drogenmarkierten humanen Myelom-, Mausemyelom-, Human-Maus-Heteromyelom- oder humanen Lymphoblastoidzellen) fusioniert werden, um Hybridome herzustellen und so für den Transfer von Genen zu sorgen, die für monoklonale Antikörper codieren. Außerdem können die Zell-Linien als Ausgangsmaterial von Chromosomen verwendet werden, die für Immunoglobuline codieren, die isoliert und durch von der Fusion unterschiedliche Verfahren in Zellen übertragen werden können. Weiters können die für monoklonale Antikörper codierenden Gene isoliert und in DNS-Rekombinationsverfahren zur Herstellung des spezifischen Immunoglobulins in einer Vielzahl von Wirten verwendet werden. Insbesondere kann durch Herstellung von cDNS-Archiven aus Boten-RNS ein einziger cDNS-Klon, der für das Immunoglobulin codiert und intronfrei ist, isoliert und in einen geeigneten prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionsvektor eingebracht und daraufhin zur schließlichen Massenproduktion in einen Wirt transformiert werden.

Die Lymphoblastoid- oder Hybridzell-Linie kann geklont und gemäß üblichen Verfahren geprüft werden, wobei die Antikörper, die zur Bindung an die Epitope verschiedener *P.aeruginosa* IATS-Serotypen und Fisher-Immuntypen befähigt sind, in der überstehenden Zellflüssigkeit festgestellt werden. Durch die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Antikörper als blockierende Antikörper können bei der Prüfung gemäß den in der Fachwelt bekannten Verfahren zusätzliche monoklonale Antikörper, die mit den gleichen antigenen Determinanten oder Epitopen reagieren, leicht isoliert werden.

Auf diese Weise werden humane monoklonale Antikörper zur Verfügung gestellt, die zur spezifischen Bindung an Lipopolysaccharid-Determinanten imstande sind, die an einer Vielzahl von, jedoch nicht an allen IATS-Serotypen von *P.aeruginosa* vorliegen. Diese Determinanten können z.B. an zwei oder drei IATS-Serotypen und an keinem, einem oder zumindest zwei Fisher-Immuntyp(en) vorliegen. Derartige Antikörper können in vivo Schutz bieten gegen einige oder alle erkannten Serotypen und Immuntypen, meist gegen zwei oder mehrere Serotypen.

Die erfindungsgemäß hergestellten monoklonalen Antikörper können auch in vitro einer Vielzahl von Verwendungen zugeführt werden. Als Beispiel können die monoklonalen Antikörper zur Typisierung, zur Isolierung spezifischer Stämme von *P.aeruginosa*, zur selektiven Abtrennung von *P.aeruginosa*-Zellen aus einer heterogenen Zellmischung od. dgl., verwendet werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäß hergestellten monoklonalen Antikörper können prophylaktisch oder therapeutisch wirksame Zusammensetzungen erstellt werden, die zumindest einen humanen monoklonalen Antikörper oder ein Bindungsfragment desselben, das zur Kreuzreaktion mit IATS-Serotypen von *P.aeruginosa* befähigt ist, enthalten, wobei die Zusammensetzung vorzugsweise auch einen physiologisch verwendbaren Träger beinhaltet. Die Zusammensetzung kann auch einen oder mehrere der folgenden Bestandteile enthalten: zusätzliche humane monoklonale Antikörper die imstande sind, mit *P.aeruginosa* flagella, Exotoxin A oder mit anderen Serotyp- oder Immuntyp-Determinanten an den LPS von *P.aeruginosa* zu reagieren; eine Gammaglobulinfraktion aus humanem Blutplasma; eine Gammaglobulinfraktion aus humanem Blutplasma, wobei das Plasma von Menschen erhalten wurde, die erhöhte Spiegel von mit *P.aeruginosa* reaktiven Immunoglobulinen aufweisen; und ein oder mehrere antimikrobielle Mittel.

Für diagnostische Zwecke kann der monoklonale Antikörper entweder markiert oder unmarkiert sein. Meist wird bei diagnostischen Assays die Bildung eines Komplexes durch die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die LPS des *P.aeruginosa*-Organismus festgestellt. Unmarkiert finden die Antikörper bei Agglutinations-Assays Verwendung. Außerdem können unmarkierte Antikörper in Kombination mit anderen markierten Antikörpern (zweiten Antikörpern), die mit dem monoklonalen Antikörper reagieren, wie Antikörper, die für Immunoglobuline spezifisch sind, Verwendung finden. Andererseits können die monoklonalen Antikörper direkt markiert werden. Eine große Vielzahl von Markierungen kann Anwendung finden, wie Radionuclide, Fluoreszenzmittel, Enzyme, Enzymsubstrate, Enzym-Cofaktoren, Enzyminhibitoren, Liganden, insbesondere Haptene, etc. Zahlreiche Arten von Immunoassays sind verfügbar und manche von ihnen verwenden Angaben der US-PSen 3 817 827; 3 850 752; 3 901 654; 3 935 074; 3 984 533; 3 996 345; 4 034 074; und 4 098 876, auf die alle hier Bezug genommen wird.

In der Regel werden die erfindungsgemäß hergestellten monoklonalen Antikörper bei Enzym-Immunoassays eingesetzt, wo die gegenständlichen Antikörper oder eine zweite andere Antikörper-Art an ein Enzym konjugiert werden. Wenn eine Probe mit einem Gehalt an *P.aeruginosa* eines bestimmten Serotyps, wie menschliches Blut oder ein Lysat desselben, mit den gegenständlichen Antikörpern vereinigt wird, tritt eine Bindung zwischen den Antikörpern und jenen Molekülen auf, die das gewünschte Epitop zeigen. Diese Zellen können dann von dem ungebundenen Reagens abgetrennt werden und ein zweiter Antikörper (mit einem Enzym markiert) kann zugesetzt werden. Anschließend wird das Vorliegen des spezifisch an die

Zellen gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugats bestimmt. Es können auch andere übliche, dem Fachmann bekannte Verfahren verwendet werden.

Erfindungsgemäß können Kits zur Verfügung gestellt werden, die gekennzeichnet sind durch eine monoklonale Antikörper-Zusammensetzung, die zumindest einen humanen monoklonalen Antikörper enthält, der mit weniger als allen, zumindest jedoch mit zwei IATS Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* reagiert, und Markierungen, die ein feststellbares Signal ergeben und kovalent an den Antikörper gebunden sind, die mit jedem der genannten monoklonalen Antikörper reagieren.

Die Antikörper sind in den Kits gemeinsam mit Puffern, wie Tris, Phosphat, Carbonat etc., Stabilisatoren, Biociden, inerten Proteinen, z.B. Rinderserumalbumin od. dgl. enthalten. In der Regel liegen diese Substanzen in Mengen von weniger als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge an aktivem Antikörper, und meist in einer Gesamtmenge von mindestens etwa 0,001 Gew.-%, wieder bezogen auf die Antikörperkonzentration, vor. Häufig wird es wünschenswert sein, ein inertes Streck- oder Bindemittel zur Verdünnung des Wirkstoffes zuzusetzen, wobei das Bindemittel in einer Menge von 1 bis 99 Gew.-% der Gesamtzusammensetzung vorliegen kann. Wenn ein zweiter Antikörper verwendet wird, der zur Bindung an den monoklonalen Antikörper befähigt ist, so wird dieser in der Regel in einem getrennten Behälter vorliegen. Der zweite Antikörper ist meist an eine Markierung gebunden und ist in analoger Weise formuliert wie die oben beschriebene Antikörper-Formulierung.

Pharmazeutische Formulierungen und Verwendung

Die erfindungsgemäß hergestellten monoklonalen Antikörper können auch als Komponenten pharmazeutischer Zusammensetzungen verwendet werden, die eine therapeutisch oder prophylaktisch wirkende Menge mindestens eines monoklonalen Antikörpers mit einem pharmazeutisch wirksamen Träger enthalten. Ein pharmazeutischer Träger sollte irgendeine kompatible, nichttoxische Substanz sein, die zur Übertragung des monoklonalen Antikörpers an den Patienten geeignet ist. Steriles Wasser, Alkohol, Fette, Wachse und inerte Feststoffe können als Träger verwendet werden. Pharmazeutisch verwendbare Hilfsmittel (Puffer, Dispergiermittel) können ebenfalls in die pharmazeutische Zusammensetzung eingebracht werden. Derartige Zusammensetzungen können einen einzigen monoklonalen Antikörper enthalten, sodaß sie für zwei oder mehrere, jedoch nicht alle IATS-Serotypen von *P.aeruginosa* spezifisch sind. Andererseits kann eine pharmazeutische Zusammensetzung zwei oder mehrere monoklonale Antikörper enthalten und einen "Cocktail" bilden. Beispielsweise wäre ein Cocktail, der humane monoklonale Antikörper gegen Gruppen der verschiedenen *P.aeruginosa*-Serotypen und -Immunotypen enthält, ein universelles Produkt mit einer Wirkung gegen die Mehrzahl der klinischen Isolate dieses speziellen Bakteriums.

Interessant sind prophylaktische und/oder therapeutische monoklonale Antikörper-Zusammensetzungen, die zumindest mit drei IATS-Serotypen, meist zumindest mit vier oder mehr, in der Regel zumindest mit fünf IATS-Serotypen reagieren können. Von besonderem Interesse sind monoklonale Antikörper-Zusammensetzungen, die zumindest mit etwa sieben, vorzugsweise zumindest mit etwa zehn bis vierzehn und mit bis zu allen siebzehn Serotypen reagieren können. In Verbindungen mit den IATS-Serotypen werden die Zusammensetzungen wünschenswerterweise zumindest mit einem, meist mit mindestens zwei und in der Regel mit mindestens drei oder vier oder bis zu allen sieben Immunotypen des Fisher-Immunotypen-Systems reagieren.

Jede der Zusammensetzungen wird zumindest einen, meist zumindest zwei und in der Regel zumindest drei oder mehrere Antikörper enthalten, wobei jeder Antikörper mit zumindest 2, 3, 4 oder mehr, jedoch nicht mit allen IATS-Serotypen reagiert. Wünschenswerterweise wird zumindest ein monoklonaler Antikörper vorliegen, der sich zumindest an zwei IATS-Serotypen und an einen oder mehrere Fisher-Immunotypen bindet, vorzugsweise an mindestens zwei Immunotypen.

Wünschenswerterweise wird die Gesamtzahl der verschiedenen monoklonalen Antikörper in einer Zusammensetzung bei zumindest 1 und gleich oder unter etwa der Hälfte der Gesamtzahl der IATS-Serotypen, mit denen die Zusammensetzung reagiert, liegen, meist bei einem Drittel dieser Gesamtzahl.

Das Molverhältnis der verschiedenen monoklonalen Antikörper-Bestandteile unterscheidet sich meist nicht um mehr als den Faktor 10, in der Regel um nicht mehr als der Faktor 5 und liegt üblicherweise bei einem Molverhältnis von etwa 1 : 1-2 für jeden der anderen Antikörper-Bestandteile.

Die humanen monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch gemeinsam mit anderen monoklonalen Antikörper-Zusammensetzungen oder mit bestehenden Blutplasma-Produkten, wie handelsüblichen Gammaglobulin- und Immunglobulinprodukten, verwendet werden, die bei der prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Krankheiten durch *P.aeruginosa* beim Menschen eingesetzt werden. Für Immunglobuline wird vorzugsweise das Plasma aus menschlichen Spendern gewonnen, die erhöhte Spiegel von mit *P.aeruginosa* reaktiven Immunglobulinen zeigen. Vgl. allgemein das Compendium

"Intravenous Immune Globulin and the Compromised Host," Amer. J. Med., 76(3a), 30.März 1984, S.1-231 auf das hier bezug genommen wird.

Die erfindungsgemäß hergestellten monoklonalen Antikörper können als getrennt verabreichte Zusammensetzungen verwendet werden, die gemeinsam mit Antibiotika oder antimikrobiellen Mitteln gegeben werden. Meist können die antimikrobiellen Mittel ein antipseudomonal wirkendes Penicillin (z.B. Carbenicillin) in Verbindung mit einem Aminoglycosid (z.B. Gentamicin, Tobramycin etc.) enthalten, doch zahlreiche andere Zusatzmittel (z.B. Cephalosporine), die dem Fachmann wohl bekannt sind, können ebenfalls verwendet werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten humanen monoklonalen Antikörper und deren pharmazeutische Zusammensetzungen sind insbesondere für die orale oder parenterale Verabreichung geeignet. Vorzugsweise können die pharmazeutischen Zusammensetzungen parenteral, d.h. subkutan, intra-muskulär oder intravenös verabreicht werden. Somit schafft die vorliegende Erfindung die Möglichkeit der Herstellung von Zusammensetzungen für die parenterale Verabreichung, die eine Lösung des humanen monoklonalen Antikörpers oder einen Cocktail von Antikörpern, gelöst in einem verwendbaren Träger, vorzugsweise in einem wässrigen Träger, enthält. Es kann eine Vielzahl wässriger Träger verwendet werden, z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4%ige Salzlösung, 0,3%iges Glycerin und dgl. Diese Lösungen sind steril und im allgemeinen frei von Feststoffteilchen. Die Zusammensetzungen können durch übliche, allgemein bekannte Sterilisierverfahren steril gemacht werden. Die Zusammensetzungen können pharmazeutisch verwendbare Hilfssubstanzen enthalten, wie sie zur Annäherung an physiologische Bedingungen, erforderlich sind, wie Mittel zur Einstellung des pH-Wertes, Puffer, Toxizitätsregulierende Mittel und dgl., z.B. Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Natriumlactat etc. Die Antikörperkonzentration in diesen Formulierungen kann stark variieren, d.h. von weniger als etwa 0,5%, meist etwa oder wenigstens etwa 1% bis zu 15 oder 20 Gew.-%, und wird in erster Linie nach dem Flüssigkeitsvolumen, den Viskositäten etc. ausgewählt, die für die spezielle ausgewählte Verabreichungsart bevorzugt sind.

So kann eine typische pharmazeutische Zusammensetzung für intramuskuläre Injektion so bereit werden, daß sie 1 ml steriles gepuffertes Wasser und 50 mg des monoklonalen Antikörpers enthält. Eine typische Zusammensetzung für eine intravenöse Infusion kann 250 ml steriler Ringer-Lösung und 150 mg des monoklonalen Antikörpers enthalten. Die tatsächlichen Verfahren zur Herstellung parenteral verabreichbarer Zusammensetzungen sind bekannt und werden für den Fachmann eindeutig sein. Sie sind detailliert zum Beispiel in Remington's Pharmaceutical Science, 15.Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980) beschrieben, worauf hier bezug genommen wird.

Die erfindungsgemäß hergestellten monoklonalen Antikörper können für die Lagerung lyophilisiert und vor der Verwendung in einem geeigneten Träger wieder rekonstituiert werden. Dieses Verfahren erwies sich bei üblichen Immunglobulinen als wirksam und es können bekannte Lyophilisierungs- und Rekonstitutionsverfahren verwendet werden. Es wird für den Fachmann klar sein, daß die Lyophilisierung und Rekonstitution in verschiedenem Ausmaß zu Antikörper-Aktivitätsverlust führen kann (z.B. neigen bei üblichen Immunglobulinen die IgM-Antikörper dazu, größere Aktivitätsverluste zu erleiden als die IgG-Antikörper) und daß Verwendungsniveaus zur Kompensation eingestellt werden müssen.

Die die vorliegenden humanen monoklonalen Antikörper enthaltenden Zusammensetzungen oder die Cocktails derselben können für die prophylaktische und/oder therapeutische Behandlung von Infektionen durch P.aeruginosa verwendet werden. Bei der therapeutischen Anwendung werden die Zusammensetzungen einem bereits durch einen oder mehrere P.aeruginosa -Serotypen infizierten Patienten in einer Menge verabreicht, die zur Heilung oder zumindest zum Stillstand der Infektion und ihrer Komplikationen ausreicht. Die zur Erreichung dieses Ziels erforderliche Menge ist als die "therapeutisch wirksame Dosis" definiert. Die für diesen Zweck erforderlichen Mengen hängen von der Schwere der Infektion und dem allgemeinen Zustand des eigenen Immunsystems des Patienten ab, reichen im allgemeinen jedoch von etwa 1 bis etwa 200 mg Antikörper pro Kilogramm Körpergewicht, wobei meist mit 5 bis 25 mg pro kg dosiert wird. Man muß bedenken, daß die Substanzen im allgemeinen bei sehr ernsten Krankheitszuständen verwendet werden können, d.h. bei lebensbedrohenden oder möglicherweise lebensbedrohenden Zuständen, insbesondere bei Bakteriämie und Endotoxämie durch P. aeruginosa. In solchen Fällen ist es im Hinblick auf das Fehlen von artfremden Substanzen und das Fehlen von "Fremdstoffabweisungen" bei den vorliegenden humanen monoklonalen Antikörpern möglich und kann wünschenswert sein, daß der Arzt einen beträchtlichen Überschuß dieser Antikörper verabreicht.

Bei prophylaktischen Anwendungen werden Zusammensetzungen des vorliegenden Antikörpers oder ein Cocktail desselben an einen Patienten verabreicht, der noch nicht durch P.aeruginosa infiziert ist, um die Widerstandsfähigkeit des Patienten gegen eine solche mögliche Infektion zu verbessern. Eine derartige Menge wird als "prophylaktisch wirksame Menge" bezeichnet. Zu diesem Zweck hängt die genaue Menge wieder von dem Gesundheitszustand des Patienten und seinem allgemeinen Immunitätsniveau ab, wird

jedoch meist im Bereich von 0,1 bis 25 mg pro kg, insbesondere bei 0,5 bis 2,5 mg pro kg liegen.

Eine einzige oder mehrfache Verabreichung der Zusammensetzungen kann mit Dosierungsniveau und Dosierungsplänen vorgenommen werden, die vom Arzt ausgewählt werden. Auf jeden Fall sollten die pharmazeutischen Formulierungen eine zur wirkungsvollen Behandlung des Patienten ausreichende Menge an Antikörper(n) vorsehen.

Beispiel 1:

Beispiel 1 zeigt Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern (IgM Isotyp), die mit den IATS Serotypen 2, 5 und 16 und mit den Fisher Immunotypen 3 und 7 reagieren.

Eine periphere Blutprobe von einem Patienten mit Blasen-Fibrose, von dem es bekannt ist, daß er eine chronische Infektion von *P.aeruginosa* hatte, diente als Quelle für die humanen B-Zellen. Mononucleare Zellen wurden durch Standard-Zentrifugiermethoden auf Ficoll-Paque abgetrennt (Boyum, A., Scand. J.Clin. Lab. Invest. (1968), 21:Suppl. 97,77-89) und wurden zweimal mit Calcium/Magnesium-freier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen.

Die mononuclearen Zellen wurden unter Verwendung eines modifizierten E-Rosetten-Verfahrens von T-Zellen befreit. Kurz gesagt, wurden die Zellen zuerst auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in PBS mit einem Gehalt an 20% Fetalem Kalbsserum (FCS) bei 4 °C suspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde dann in einen 17 x 100 mm Polystyrol-Rundkolben eingebracht und mit 1×10^9 2-Amino-isothiuroniumbromid-(AET)-behandelten roten Schafsblutkörperchen aus einer 10% (v/v)-Lösung in Iscove's modifiziertem Dulbecco-Medium (Iscove's Medium) (Madsen, M. und Johnson, H.E. J.Immun.Methods (1979) 27:61-74) versetzt. Die Suspension wurde sehr vorsichtig 5 - 10 min bei 4 °C gemischt und die E-rosettierten Zellen dann durch Zentrifugieren auf Ficoll-Paque während 8 min bei 4 °C und 2500 g abgetrennt. E-Rosetten-negative periphere mononucleare Blutkörperchen (E⁻PBMC), die an der Zwischenwand haften, werden gewonnen und einmal in Iscove's Medium gewaschen, worauf sie neuerlich suspendiert werden in Iscove's Medium, das 15% (v/v) FCS, L-Glutamin (2 mMol/l), Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Hypoxanthin (1×10^{-4} M), Aminopterin (4×10^{-7} M) und Thymidin ($1,6 \times 10^{-5}$ M) enthielt. Dieses Medium wird im Folgenden als HAT-Medium bezeichnet.

Die zellgetriebene Transformation der E⁻PBMC wurde durch gleichzeitige Züchtung dieser Zellen mit einer transformierenden Zell-Linie erreicht. Die transformierende Zell-Linie war eine Epstein-Barr-Nuclear-Antigen-(EBNA)-positive humane Lymphoblastoid-Zell-Linie, die durch Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese der GM 1500 Lymphoblastoid-Zell-Linie mit anschließender Selektion in Gegenwart von 30 µg/ml 6-Thioguanin, um die Zellen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)-defizient und somit HAT-sensitiv zu machen, abgeleitet war. Diese Zell-Linie wird als 1A2-Zell-Linie bezeichnet und wurde bei der American Type Culture Collection (A.T.C.C.) am 29. März 1982 unter der Bezeichnung A.T.C.C. Nr. CRL 8119 hinterlegt. 1A2 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden in HAT-Medium suspendiert und dann mit E⁻PBMC in einem Verhältnis von acht 1A2 Zellen pro E⁻PBMC kombiniert. Die Zellmischung wurde auf acht rundböckige 96-Mulden-Mikrotiterplatten (Costar 3799) mit einer Konzentration von 72000 Zellen/Mulde in einem Volumen von 200 µl pro Mulde aufgebracht und bei 37 °C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 6% CO₂ inkubiert. Die Kulturen wurden am 5. und 8. Tag nach dem Aufbringen durch Ersatz der Hälfte des Überstands mit frischem HAT-Medium genährt. Die Mulden wurden jeden 2. Tag mit einem inversen Mikroskop nach Anzeichen von Zellproliferation untersucht. 12 Tage nach dem Aufbringen wurde beobachtet, daß 100% der Mulden proliferierende Zellen enthielten und daß in den meisten Mulden die Zellen in ausreichender Dichte vorlagen, um sie zu entnehmen und die Überstände auf anti-*P.aeruginosa*-Antikörper zu untersuchen.

Die Überstände wurde auf die Anwesenheit von anti-*P.aeruginosa*-Antikörpern geprüft, indem ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay-(ELISA)-Verfahren verwendet wurde (Engvall, E. (1977) 55 193-200). Antigenplatten bestanden aus flachböckigen 96-Mulden-Mikrotiterplatten (Immulon II, Dynatech), deren Mulden verschiedene lebende Bakterien am Boden der Mulden adsorbiert enthielten. Zur Erleichterung der Bakterienadsorption am Kunststoff wurden 50 µl/Mulde Poly-L-Lysin(PLL) (1 µg/ml in PBS, pH 7,2) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das nichtadsorbierte PLL wurde dann abgekippt, die Platten einmal mit PBS gewaschen, 50 µl gewaschener Bakterien suspension ($OD_{560} = 0,2$) in PBS in jede Mulde eingebracht und die Platten 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nichtadsorbierte Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen der Platten mit Salzlösung - Tween (0,9% NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20) entfernt. Verschiedene bei dieser Prüfung verwendete Antigenplatten enthielten: (1) eine Mischung von *P.aeruginosa* Fisher-Immunotypen 1, 2 und 4 (A.T.C.C. Nr. 27312, 27313, 27315); (2) eine Mischung von *P.aeruginosa* Fisher-Immunotypen 3, 5, 6 und 7 (A.T.C.C. Nr. 27314, 27316, 27317, 27318); und (3) eine Mikrotiterplatte mit keinen Bakterien.

AT 400 441 B

Der ELISA wurde zuerst durch Blockieren der Platten mit 200 μ l/Mulde Blockierungspuffer (PBS, pH 7,2, mit 5% (w/v) magerer Trockenmilch, 0,01 % (v/v) Antischaum Sigma) und 0,01% (w/v) Thimerosal) während 60 min bei Raumtemperatur begonnen. Nach dem Blockieren wurden die Platten 3 mal mit Salzlösung-Tween gewaschen. 50 μ l PBS, pH 7,2, mit 0,1 % Tween-20 und 0,2% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) wurden dann in alle Mulden eingebracht. Die Überstände aus den Mulden der Kulturplatten wurden in die entsprechenden Mulden der Antigenplatten übertragen (50 μ l/Mulde) und die Platten wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden entfernt, die Mulden 3 mal mit Salzlösung-Tween gewaschen und 50 μ l geeignet verdünnter Meerrettich-Peroxidase (HRP), konjugiert mit Ziegen-anti-human IgG + IgM (American Qualex International # A1114 + # A1124) wurden in den Mulden zugesetzt. Bei diesem Beispiel wurde HRP-Ziegen-anti-IgG und HRP-Ziegen-anti-IgM mit einer endgültigen Verdünnung von 1 : 5000 bzw. 1 : 3000 in PBS, pH 7,2, mit 0,05% Tween-20 und 0,1 % BSA verwendet. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die enzymkonjugierten Ziegen-Antikörper entfernt und die Mulden 3 mal mit Salzlösung-Tween gewaschen. 100 μ l Substrat (0,8 mg/ml o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid in 100 mM Citratpuffer, pH 5,0, mit 0,03% H₂O₂ in entionisiertem Wasser, gemischt in gleichen Volumina knapp vor dem Aufbringen) wurden dann in jede Mulde zugesetzt. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wurden 50 μ l 3N H₂SO₄ zu allen Mulden zugesetzt, um die Reaktionen zu beenden. Die die Antikörper enthaltenden Kulturüberstände, deren Antikörper mit dem Antigen der Platten reagieren, wurden durch positive Farbentwicklung in den entsprechenden Mulden festgestellt und die Stärke der Reaktion durch Messen der Absorption bei 490 nm mit einem Bio-Tek EL-310 Mikro-ELISA-Leser gemessen.

Die Analyse der Kulturüberstände durch die obige Methode führte zu der Feststellung von 2 Mulden (1C1 und 2H12), die anti-P.aeruginosa-Antikörper enthielten, die mit den Fisher-Immunotypen 3, 5, 6 und 7 der Platte reagierten, doch dies nicht mit den Fisher Immunotypen 1, 2 und 4 der Platte oder mit der Platte ohne Bakterien taten. Um den (die) spezifischen erkannten Fisher Immunotyp(en) zu identifizieren, wurden Antigenplatten mit PLL-fixierten Bakterien von nur einem Fisher Immunotyp, wie oben beschrieben, für jeden Immunotyp bereitet. Die Durchführung des ELISA-Assays nach obigen Angaben mit Kulturüberständen von 1C1 und 2H12 an den Einzel-Immunotyp-Platten deutete darauf hin, daß diese beiden Mulden Antikörper enthielten, die für die beiden Fisher Immunotypen 3 und 7 spezifisch waren. Ein ähnlicher ELISA, durchgeführt bei einem System P.aeruginosa-IATS-typisierten Stämmen (erhalten von A.T.C.C. mit den Nummern 33348 - 33364) zeigte, daß der Antikörper in den Mulden 1C1 und 2H12 spezifisch mit den IATS-Stämmen 2, 5 und 16 reagierte.

Der Isotyp des reaktiven Antikörpers (der Antikörper) in den Mulden 1C1 und 2H12 wurde in einem ähnlichen ELISA-Assay wie dem oben beschriebenen Spezifitätstest bestimmt, mit der Ausnahme, daß das HRP-Ziegen-anti-human IgG und das HRP-Ziegen-anti-human IgM unabhängig voneinander in zwei Reaktionsstufen verwendet wurden, statt sie zu kombinieren. Es wurde eine positive Reaktion des (der) Antikörper(s) in den Mulden 1C1 und 2H12 mit Fisher Immunotypen 3 und 7 nur mit den anti-IgM Reagentien beobachtet, was einen IgM Isotyp für den (die) relevanten Antikörper in jeder Mulde aufzeigt.

Um festzustellen, ob das Schema der anti-Reaktion mit den Fisher Immunotypen 3 und 7 auf einen oder mehrere Antikörper in den Mulden 1C1 und 2H12 zurückzuführen war (d.h. ein Antikörper, der mit beiden Fisher Immunotypen 3 und 7 reagiert, oder zwei Antikörper, von denen einer mit Fisher Immunotyp 3 und der andere mit Fisher Immunotyp 7 reagiert), wurden Zellen aus beiden Mulden als Subkultur mit geringer Dichte gezüchtet und Mulden mit proliferierenden Zellen wurden auf Antikörper-Aktivität gegenüber getrennten Fisher Immunotypen 3 und 7 auf Bakterien-Antigen-Platten untersucht. Die Subkultur wurde in 96-Mulden-Rundbodenplatten bei einer Dichte von 5 Zellen/Mulde in einem Gesamtvolumen von 100 μ l HAT-Medium ohne Aminopterin-Komponente (HT-Medium) durchgeführt. Nichttransformierende HAT-sensitive Lymphoblastoid-Zellen wurden mit einer Dichte von 500 Zellen/Mulde als Futterzellen in alle Mulden eingebracht. Vier Tage nach dem Aufbringen wurden 100 μ l HAT-Medium zu allen Mulden zugesetzt, um die Futterzellen selektiv abzutöten. Am 9. Tag nach dem Aufbringen wurden die Mulden neuerlich durch Ersatz der Hälfte der Überstände durch HAT-Medium gefüttert. Daraufhin wurden die Mulden in ähnlicher Weise alle 4-5 Tage mit HT-Medium gefüttert, bis in den Mulden eine ausreichende Dichte an Lymphoblastoidzellen für eine ELISA-Untersuchung der Überstände vorlag. Bei der Untersuchung auf Einzel-Antigenplatten mit Fisher Immunotyp 3 und Fisher Immunotyp 7 reagierten alle Überstände, die mit Fisher Immunotyp 3 reagierten, auch mit Fisher Immunotyp 7, was zeigte, daß ein Antikörper für die Wirkung gegen beide Fisher Immunotypen verantwortlich war. Beliebige ausgewählte Überstände zeigten bei der Reaktion mit IATS Stämmen 2, 5 und 16, daß sie mit allen drei Stämmen anstatt mit den Einzelstämmen reagierten, was weiter den Schluß unterstützte, daß ein Antikörper kreuzreaktiv mit den Fisher Immunotypen 3 und 7 sowie den IATS-Stämmen 2, 5 und 16 war.

Die spezifischen Antikörper-produzierenden Zellen der Mulden 1C1 und 2H12 wurden geklont, indem sie unabhängig voneinander mehrfach einem limitierenden Verdünnungsklonen unterworfen wurden, bis alle

klonalen Überstände bei der Prüfung nach dem obigen ELISA-Protokoll eine positive Reaktion mit Fisher Immunotypen 3 und 7 und IATS Stämmen 2, 5 und 16 zeigten. Beim Klonen wurden Fütterungszellen verwendet wie bei den oben genannten Subkulturen. Auf diese Weise wurden zwei geklonte transformierte humane Zell-Linien (1C1 und 2H12) erhalten, die kontinuierlich (unsterblich) sind und die beide humane
 5 monoklonale Antikörper sezernieren, die mit Fisher Immunotypen 3 und 7 sowie mit IATS Stämmen 2, 5 und 16 reagieren. Bei diesem Beispiel tragen die Zell-Linie und der Antikörper, den sie produziert, die gleiche Bezeichnung.

Beispiel 2:

10

Beispiel 2 zeigt die Methoden zur Herstellung von monoklonalem humanem Antikörper (Isotyp IgG), der mit IATS Serotypen 2, 5 und 16 und mit Fisher Immunotypen 3 und 7 reagiert. Die Herstellungsprotokolle sind im wesentlichen ident mit denen von Beispiel 1. Kurz gesagt, wird eine periphere Blutprobe von einem Patienten mit Blasen-Fibrose, von dem es bekannt ist, daß er eine chronische Infektion durch *P.aeruginosa*
 15 hatte, als Quelle für die humanen B-Zellen verwendet. Die mononuklearen Zellen wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, abgetrennt, mit der Ausnahme, daß 1,6 ml der PBS-Suspension mit der Suspension von $1,6 \times 10^9$ AET-behandelten roten Schafsblutkörperchen verwendet wurden. Die zellgetriebene Transformation war auch die gleiche mit der Ausnahme, daß das Verhältnis der 1A2 Zellen pro E⁻PBMC 7,5 betrug; 15 Platten zu 17000 Zellen/Mulde wurden verwendet; die Kulturen wurden 6 und 10 Tage nach dem Aufbringen gefüttert; 16 Tage nach dem Aufbringen enthielten praktisch alle Mulden proliferierende Zellen.

Eine Prüfung der Kulturüberstände auf spezifische Antikörper wurde in der beschriebenen Weise vorgenommen und führte dazu, daß eine Mulde (9D1) festgestellt werden konnte, die einen mit den Fisher Immunotypen 3, 5, 6 und 7-Platten, jedoch nicht mit den Fisher-Immunotypen 1, 2 und 4-Platten oder der
 25 Platte ohne Bakterien reagierte. Die Durchführung des beschriebenen ELISA-Assays auf einzelnen Immunotyp- oder Serotyp-Bakterien-Antigenplatten mit Kulturüberständen von 9D1 zeigte, daß ein Antikörper vorlag, der spezifisch für die beiden Fisher Immunotypen 3 und 7 sowie für die IATS Stämme 2, 5 und 16 war. Anschließende Studien wie bei Beispiel 1 zeigten, daß die Antikörper-Spezifität in der Mulde 9D1 einem einzigen Klon zugeordnet werden konnte, der den IgG Antikörper-Isotyp sezerniert.

30 Beispiel 3:

Beispiel 3 zeigt die antigene Spezifität einiger neuer Antikörper.

Um festzustellen, ob die monoklonalen Antikörper 1C1, 2H12 und 9D1 mit dem gleichen antigenen Ziel reagieren und daher in der Spezifität ident sind, wurden weitere Versuche unternommen. Zuerst wurden die
 35 Antikörper in einem ELISA auf einer Platte mit Vergleichsstämmen und klinischen Isolaten von *P.aeruginosa* verglichen. Das ELISA-Protokoll war wie oben beschrieben mit Ausnahme folgender Änderungen: 1) Statt der Bakterienadsorption an PLL-überzogenen Platten enthielten die Mulden der Platte verschiedene ganze Bakterien, die am Boden der Mulden mit Ethanol fixiert waren. Die Platten wurden durch Zugabe von 50µl gewaschener Bakterien suspension ($OD_{650} = 0,2$) in PBS in die Mulden, Zentrifugieren der Platten mit 500 x
 40 g während 20 min, Absaugen der PBS, Zusatz von 75 µl Ethanol während 10 min, Entfernung des Ethanols mit anschließender Lufttrocknung bereitet. Auf den Antigenplatten waren IATS Stämme 2, 5, 11 und 16 (A. T.C.C. Nr. 33349, 33352, 33358 und 33363) enthalten sowie 16 klinische Isolate, die vorher sowohl durch Agglutination mit Difco (Detroit, Michigan) Bacto-Pseudomonas aeruginosa-Antiseren nach den Angaben des Herstellers als auch durch ELISA (nach obiger Beschreibung) als Serotypen 2, 5, 16 oder als
 45 Kombination dieser Serotypen typisiert worden waren; 2) Kaninchentypisierende Antisera wurden in einer Verdünnung von 1:500 in PBS verwendet, mit der Ausnahme von anti-IATS 16, wo mit 1:250 verdünnt war. Die Kulturüberstände, die die 1C1-, 2H12- und 9D1-Antikörper enthielten, wurden klar verwendet; 3) als Reaktionsmittel für den zweiten Schritt wurden biotinyliertes Protein A (B-2001, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) verdünnt 1 : 500, und biotinyliertes Ziegen-anti-human Ig (4703, Tago, Inc. Burlingame,
 50 CA) verdünnt 1 : 500, zur Feststellung der Kaninchen- bzw. humanen Antikörper verwendet. 50µl Reagens wurden den jeweiligen Mulden zugesetzt und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das ungebundene Reagens entfernt und die Mulden 3 mal gewaschen. 50µl eines vorher hergestellten Komplexes aus Avidin:biotinylierte Meerrettich-Peroxidase (Vecastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) wurden dann zu jeder Mulde zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
 55 wurde das überschüssige Vectastain ABC Reagens entfernt und die Mulden wieder 3 mal gewaschen, bevor das Substrat zugesetzt wurde.

Wie in Tabelle 2 gezeigt, deuten die Ergebnisse der Untersuchung darauf hin, daß, während die Antikörper 1C1 und 9D1 mit jedem klinischen Isolat, das als IATS 2, 5 oder 16 Serotyp typisiert wurde,

AT 400 441 B

reagieren, der Antikörper 2H12 mit drei dieser Isolate nicht reagiert. Das bedeutet, daß der Antikörper 2H12 ein von dem durch 1C1 und 9D1 erkannten Epitop unterschiedliches Epitop erkennt und daß die beiden Epitope an den meisten, aber nicht allen den IATS Serotypen 2, 5 oder 16 entsprechenden klinischen Isolaten koordinativ exprimiert sind.

5

Tabelle 2

Reaktivitätsmuster von Difco Bacto-P.aeruginosa Antiseren und humanen monoklonalen Antikörpern 2H12, 1C1 und 9D1 mit typisierten Stämmen und klinischen Isolaten von P.aeruginosa							
Typ.Stamm oder klinisches Isolat	Kaninchen				Mensch		
	IATS α 2	IATS α 5	IATS α 16	IATS α 11	MAb 2H12	MAb 1C1	MAb 9D1
IATS 2	+	-	-	-	+	+	+
IATS 5	(+) ^a	+	-	-	+	+	+
IATS 16	(+) ^a	(+) ^a	+	-	+	+	+
IATS 11	-	-	-	+	-	-	-
A523	+	+	-	-	+	+	+
B406	+	+	(+) ^a	-	+	+	+
C27	+	+	-	-	+	+	+
D26	+	+	-	-	+	+	+
F155	+	+	+	-	+	+	+
F225	+	(+) ^a	+	-	+	+	+
F250	+	+	-	-	+	+	+
F253	-	+	-	-	+	+	+
F255	+	+	-	-	-	+	+
F256	+	-	-	-	-	+	+
F396	+	+	+	-	+	+	+
H217	+	+	+	-	+	+	+
H218	+	+	-	-	+	+	+
H219	-	+	-	-	+	+	+
H220	+	+	-	-	+	+	+
H221	+	+	-	-	-	+	+

^a(+) = ELISA-Reaktion sehr schwach positiv

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß das durch die Antikörper 1C1 und 9D1 erkannte molekulare Ziel
40 offenbar an allen klinischen Isolaten von P.aeruginosa vorhanden war, die als zu den IATS Serotypen 2, 5
oder 16 zugehörige typisiert werden konnten, während das durch den Antikörper 2H12 erkannte Ziel an
einer Untergruppe dieser Isolate exprimiert war.

Um festzustellen, ob die 1C1-, 2H12- und 9D1-Antikörper mit verschiedenen Antigenen oder aber mit
45 verschiedenen Epitopen des gleichen Antigens reagierten, wobei diese Epitope an den meisten, doch nicht
allen IATS Serotypen 2, 5 und 16 exprimiert sind, wurde eine Immunoblot-Analyse vorgenommen. Da die
von den IATS Stämmen 2, 5 und 16 geteilte Antigenität offensichtlich auf die hitzestabilen Antigene (Liu,
P.V. et al., s. oben) zurückzuführen ist und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Hitzestabilität ein
vorher festgehaltenes Merkmal der Lipopolysaccharid-Moleküle ist, wurden LPS-Zubereitungen der IATS-
50 Stämme 2, 5, 16 und 11 als Antigen-Zubereitungen für die Analyse ausgewählt. Rohes LPS wurde aus den
typisierten Stämmen durch Extraktion in Salzlösung bei 60°C präpariert (Orskov, F. et al., Acta. Path.
Microbiol. Scand. (1971) Section B 79:142-152). 10 mg LPS bestimmt durch den Gehalt an 2-Keto-3-
desoxyoctonat (KDO) (Karkhanis, Y.D., et al., Anal. Biochem. (1978) 85:595-601) von jedem Serotyp wurde
der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (Handcock, R.E.W. und Carey,
A.M., J.Bacteriol. (1977) 140:901-910) auf einem 10-20% Gradienten-Gel unterworfen. Die getrennten
55 Molekülarten wurden von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (NCM) übertragen, wie anderwärts
beschrieben (Towbin, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:4350-4354) und der NCM-Fleck 1 h in
PBS-Tween blockiert (Batteiger, B., et al., J. Immunol. Meth. (1982) 55:297-307). Die Flecken wurden dann
1 h bei Raumtemperatur in 20 ml verbrauchtem Kulturüberstand der Zell-Linien 1C1, 2H12 oder 9D1

inkubiert. Nach 5 min Spülung in PBS-Tween wurde jeder der NCM-Flecken 1 h bei 25°C in einer Verdünnung von 1:1000 oder 1:1500 (in PBS-Tween) von alkalischem Phosphatasekonjugiertem Ziegen anti-human IgG + IgA + IgM (Zymed) inkubiert. Die Flecken wurden dann 5 min in PBS-Tween gewaschen, wonach Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen durch Inkubieren der Flecken während 15 - 20 min bei 25°C in 30 ml Nitroblau-Tetrazolium 5-Brom-4-chlor-3-indoly-phosphat (NBT-BCIP)-Substrat sichtbar gemacht wurden, wie von Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:4045-4049 beschrieben. Die Farbentwicklung wurde durch mehrmaliges Spülen des Flecks in entionisiertem Wasser unterbrochen.

Die mit den drei Antikörpern erhaltenen Fleckprofile waren deutlich verschieden. Der Antikörper 2H12 erkannte hauptsächlich eine kurze Reihe in regelmäßigen Abständen befindlicher (d.h. leiterartiger) Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht in den Antigen-Zubereitungen der Serotypen 2, 5 und 16. Manche Moleküle mit höherem Molekulargewicht mit regelmäßigen Abständen wurden ebenfalls in geringem Ausmaß erkannt. Keine Reaktion wurde an der LPS-Zubereitung von Serotyp 11 festgestellt. Eine Wiederholung der Immunoblot-Analyse unter Verwendung von LPS Zubereitungen, die vorher mit Proteinase K bei 60°C zur Zerstörung von Proteinantigenen behandelt worden waren, erbrachte keine Änderung des Profils. Die Banden niedrigen Molekulargewichts entsprachen genau kleineren Formen von LPS-Molekülen, wie sie in einem ähnlichen SDS-PAGE-Gel sichtbar gemacht wurden, bei welchem die Antigene nicht auf NCM übertragen wurden, sondern spezifisch auf die Anwesenheit von LPS gefärbt worden waren (Tsai, C.M. und Frasch, C.E., Anal. Biochem. (1982) 119:115-119) mit der Ausnahme, daß die unterste Bande auf dem silbergefärbten Gel (die die Kernregion plus Lipid A des LPS darstellt) nicht erkannt wurde. Der Antikörper 1C1 erkannte die gleiche Reihe niedrigmolekulargewichtiger, in gleichen Abständen angeordneter Moleküle bei den Antigen-Zubereitungen der Serotypen 2, 5 und 16, jedoch nicht bei 11, obwohl die Reaktionsintensität nicht so stark war wie bei 2H12. Zusätzlich dazu erkannte dieser Antikörper bei den Serotypen 2, 5 und 16 hauptsächlich jedoch auch eine Reihe von höhermolekularen Molekülen mit regelmäßigen Abständen, die in Kombination mit den erkannten niedrigmolekularen Banden deutliche, vollständige leiterartige Profile ergaben. Diese Profile änderten sich nicht durch Vorbehandlung der Antigenzubereitungen mit Proteinase K. Wieder entsprachen die Profile den leiterartigen Bandenmustern, die bei LPS-spezifisch gefärbten Flecken auf dem Gel erhalten worden waren (d.h. sie schienen Bande um Bande zu entsprechen) mit der Ausnahme, daß die den Kern darstellende Bande mit Lipid A nicht erkannt worden war. Der Antikörper 9D1 hatte das gleiche Reaktionsprofil wie Antikörper 1C1 bei den IATS Stämmen 2, 5 und 16, nicht jedoch bei 11. Wieder war die unterste Bande der Leiter eines silbergefärbten Gels der unterschiedlichen LPS-Zubereitung nicht erkannt worden und das gesamte Profil wurde durch eine Vorbehandlung der LPS Zubereitungen mit Proteinase K nicht verändert. Insgesamt deuteten diese Beobachtungen darauf hin, daß die LPS der Serotypen 2, 5 und 16 das durch die Antikörper 1C1, 2H12 und 9D1 erkannte molekulare Ziel waren.

Beispiel 4:

Beispiel 4 zeigt die Schutzwirkung eines der neuen Antikörper. Um die in vivo-Schutzwirkungskapazität des Antikörpers 1C1 kennenzulernen, wurden Tierschutzstudien an Mäusen vorgenommen. Der 1C1-Antikörper wurde zuerst aus der verbrauchten Kulturflüssigkeit durch Ausfällen mit gesättigtem Ammoniumsulfat (Endkonzentration 50%) konzentriert (Good, A.H., et al., Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell, B.B. und Shiigi, S.M., eds., W.J. Freeman & Co., San Francisco, CA, 279-286 (1980)). Das ausgefällte Material wurde in einer minimalen Menge sterilen Wassers rekonstituiert, sorgfältig gegen PBS dialysiert und steril filtriert. Als negativen Vergleich wurde die verbrauchte Kulturflüssigkeit aus einer anderen transformierten humanen Zell-Linie (6F11-A.T.C.C. Nr. CRL 8562), die einen humanen monoklonalen Antikörper produziert, der für die LPS von IATS Stamm 11 spezifisch ist, in gleicher Weise behandelt.

Weibliche BALB/c-Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 22 g wurden in zwei Gruppen von je 30 Mäusen unterteilt. Alle Mäuse in jeder Gruppe wurden einzeln auf intraperitonealem Weg (ip) mit 0,5 ml konzentriertem 1C1- oder 6F11-Antikörper geimpft. 6 Stunden später wurde jede der beiden Gruppen neuerlich in drei Gruppen von je 10 Mäusen unterteilt und Tiere jeder dieser 10-Mäuse-Gruppe wurden unabhängig voneinander einem ip-Angriff mit 0,3 ml einer lebenden Bakteriensuspension mit einem Gehalt von 5 LD₅₀ von IATS Stamm 2, 5 bzw. 11 ausgesetzt. Die Bakteriensuspensionen wurden aus einer Kulturbrühe in logarithmischer Wachstumsphase gewonnen, aus welcher die Bakterien zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit geeigneter Dichte neuerlich in PBS suspendiert wurden. Kontrollgruppen von 4 oder 5 Mäusen erhielten eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml PBS und wurden 6 Stunden später einem intraperitonealen Angriff von 5 LD₅₀ der gleichen Serotypen ausgesetzt. Nach dem Bakterienangriff wurden die Mäuse dann während eines Zeitraumes von 5 Tagen beobachtet.

AT 400 441 B

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ergab sich durch den Antikörper 1C1 ein spezifischer und signifikanter Schutz gegen einen letalen Angriff sowohl von Serotyp IATS 2 als auch von Serotyp IATS 5, nicht jedoch von Serotyp IATS 11. Der typische Verlauf im Anschluß an den Bakterienangriff bei allen ungeschützten Tieren zeigte unterschiedliche Perioden von endotoxischem Schock, auf die in der Regel der Tod folgte. Die Kontrolltiere die nur PBS erhalten hatten, durchliefen einen akuten endotoxischen Schock und starben alle rasch. Die negativen Kontrolltiere, die den nichthomologen Antikörper 6F11 erhalten hatten, zeigten eine verlängerte Schockzeit, die durch die in der Fußnote a) der Tabelle 3 genannten Symptome charakterisiert war. Einige dieser Tiere erholten sich gelegentlich, möglicherweise durch die Nicht-Antikörper-Bestandteile, die in den Antikörper-Zubereitungen mit einkonzentriert waren. Die Tiere, die den schützenden homologen Antikörper erhalten hatten, zeigten jedoch nur geringe Symptome von Endotoxämie. Diese Symptome verschwanden innerhalb von 24 Stunden nach der Impfung und die Tiere schienen dann den Rest der 5-tägigen Beobachtungszeit gesund zu sein.

Tabelle 3

15

In vivo-Demonstration der Schutzwirkung von humanem monoklonalem Antikörper 1C1 gegen IATS Serotypen 2 und 5			
Humaner monoklonaler Antikörper	Anzahl der überlebenden/Anzahl der angegriffenen Tiere		
	5 Tage nach dem Angriff mit		
	IATS 2	IATS 5	IATS 11
1C1	8/10	10/10	3/10 ^a
6F11	0/10	1/10 ^a	10/10
PBS	0/4	0/4	0/4

^aIn jenen Fällen, bei denen nichtspezifischer Schutz beobachtet wurde, war die Erholung von der Infektion deutlich unterschiedlich von der, die bei der Reaktion von homologen Antikörpern und infizierenden Stämmen, d.h. 1C1 mit IATS 2 oder 5 und 6F11 mit IATS 11 zu beobachten war. In den letztgenannten Fällen war die Erholung praktisch vollständig, wobei die Tiere 24 h nach dem Bakterienangriff normal aussahen. Bei den nichtspezifischen Fällen jedoch zeigten die Mäuse einige Tage lang Zeichen akuter Infektion (d.h. Durchfall, verkrustete Augenlider, ruppiges Fell, "Höcker"-Profil und langsame Bewegungen) bevor sie sich zum Normalstatus erholten. Dieser nichtspezifische Schutz ist offenbar auf Nicht-Antikörper-Komponenten zurückzuführen, die mit einkonzentriert und daher den Tieren injiziert wurden, denn alle Tiere, die nur PBS erhalten hatten starben.

Bei Verwendung des gleichen Protokolls wurde ein zweites Experiment durchgeführt, bei welchem Gruppen von Mäusen mit Fisher Stämmen 2, 3 und 7 versetzt und die Tiere 5 Tage lang beobachtet wurden. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, lieferte der Antikörper 1C1 wieder einen spezifischen und signifikanten Schutz gegen sonst letale Infektionen mit Fisher Immunotypen 3 und 7, war jedoch gegen den Fisher Immunotyp 2 nicht wirksam.

45

50

55

Tabelle 4

In vivo Demonstration der Schutzwirkung von humanem monoklonalem Antikörper 1C1 gegen Fisher Immunotypen 3 und 7			
Humaner monoklonaler Antikörper	Anzahl der überlebenden/Anzahl der angegriffenen Tiere		
	5 Tage nach dem Angriff mit		
	Fisher 3	Fisher 7	Fisher 2
1C1	10/10	10/10	1/10 ^a
6F11	0/10	7/10 ^a	10/10
PBS	0/5	0/5	0/5

a) Überleben voraussichtlich nur durch die nichtspezifische Schutzwirkung, wie in Fußnote zu Tabelle 3 beschrieben.

Beispiel 5:

Beispiel 5 zeigt ein Verfahren zur Herstellung eines humanen monoklonalen Antikörpers, der mit IATS Serotypen 4 und 11 und Fisher Immunotyp 2 von *P.aeruginosa* reagiert. Das in den Beispielen 1-4 beschriebene Verfahren wurde mit der Ausnahme wiederholt, daß einige Änderungen bei der Isolierung, Charakterisierung und Untersuchung des in diesem Beispiel beschriebenen Antikörpers notwendig waren. Im Folgenden sind die Änderungen in der Verfahrensführung und die erhaltenen Resultate für den hier beschriebenen monoklonalen Antikörper angegeben.

Die Quelle für die humanen B-Zellen war ein Mensch, der vorher mit einer aus Fisher Immunotyp 3 isolierten Polysaccharid-Zubereitung mit hohem Molekulargewicht immunisiert worden war. (vgl. Pier, G.B., et al., *Infect. Immun.* [1984] 45:309-313), worauf hier bezug genommen wird.

Die zellgetriebene Transformation der E⁻PBMC erfolgte durch gemeinsames Züchten dieser Zellen mit der transformierenden Zell-Linie 1A2. 1A2 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden in HAT-Medium suspendiert und dann mit den E⁻PBMC in einem Verhältnis von 15 1A2 Zellen pro E⁻PBMC kombiniert. Die Zellmischung wurde auf 14 Mikrotiterplatten mit einer Konzentration von 62000 Zellen/Mulde in einem Volumen von 200 µl pro Mulde aufgebracht. Die Kulturen wurden am 7. und 11. Tag nach dem Aufbringen gefüttert und am 15. Tag wurde beobachtet, daß 100% der Mulden proliferierende Zellen enthielten.

Die Prüfung auf Anwesenheit von anti-*P.aeruginosa*-Antikörpern erfolgte auf 2 Antigenplatten, die bestanden aus:

- 1) einer Mischung aus *P.aeruginosa* Fisher Immunotypen 1 bis 7 (A.T.C.C. Nr. 27312, 27313, 27314, 27315, 27316, 27317 und 27318)
- und 2) einer PLL-behandelten Mikrotiterplatte ohne Bakterien.

Die Analyse der Kulturüberstände nach dem Verfahren der obigen Beispiele führte zur Feststellung von etwa 100 Mulden, die anti-*P.aeruginosa*-Antikörper enthielten, die mit den Fisher-Immunotypen 1-7 der Platte, jedoch nicht mit der bakterienfreien PLL-behandelten Platte reagierten. Zur Identifizierung des (der) spezifischen erkannten Fisher Immunotyps (en) wurden Antigenplatten wie oben hergestellt, bei welchen jede Plattenreihe PLL-fixierte Bakterien von nur einem Fisher-Immunotyp enthielt. Ein ELISA nach den obigen Angaben wurde an dem Kulturüberstand jeder der positiven anti-*P.aeruginosa*-Mulden durchgeführt, wobei die Überstände in einer Reihenordnungen auf den neuen Antigenplatten untergebracht wurden, wodurch eine Reihe von Mulden identifiziert werden konnte, die spezifische Antikörper für Fisher Immunotyp 2 enthielten. Zur weiteren Analyse der serologischen Spezifität der anti-Fisher Immunotyp 2-Antikörper wurden die Überstände in einem ähnlichen ELISA auf Antigenplatten untersucht, die jeden der 17 IATS von *P.aeruginosa* in eigenen Mulden enthielten. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigten, daß die große Mehrzahl der Überstände für IATS Serotyp 11 spezifisch war, während ein Überstand in Mulde 6D6 ein kreuzreaktives Spezifitätsmuster für IATS Serotypen 4, 11,13 und 14 zeigte.

Zur Feststellung, ob das anti-IATS Serotypen 4, 11, 13 und 14-Reaktionsmuster auf einen oder mehrere Antikörper in Mulde 6D6 zurückzuführen war, wurden weiters aliquote Anteile des Überstandes aus 6D6 unabhängig voneinander an IATS Serotypen 4, 7 (negative Kontrolle), 11, 13 und 14 adsorbiert und die adsorbierten Überstände dann mit PLL-fixierten Bakterien von jedem der 5 IATS Serotypen in einem ELISA-

Assay der obigen Art untersucht. Die Adsorptionen erfolgten durch Suspendieren eines dichten Bakterienzellen-Pellets in einem gleichen Volumen Überstand während 1/2h auf Eis und anschließende Abtrennung des Überstands von den Bakterien durch Zentrifugieren. Die Ergebnisse dieses Assays zeigten, daß die IATS Serotypen 4 und 11 Antikörperaktivität gegen einander herausadsorbierten, nicht jedoch gegen IATS Serotypen 7,13 oder 14. Das zeigte die Anwesenheit von mindestens zwei verschiedenen anti-P.aeruginosa-Antikörpern in Mulde 6D6, von denen zumindest einer mit den IATS Serotypen 4 und 11 kreuzreagierte.

Isolierung und Klonen der geeigneten Antikörperproduzierenden Zellen aus der Mulde 6D6 erfolgte in drei Stufen. In der ersten Stufe wurde eine Zell-Subkultur mit geringer Dichte von 20 Zellen/Mulde hergestellt, worauf eine weitere Folge von Subkulturen mit geringer Zelldichte (5 Zellen/Mulde) anschoß, die aus den anti-IATS Serotyp 4 + 11-positiven Mulden gewonnen wurden, die aus der ersten Folge von Subkulturen niedriger Dichte mit 20 Zellen/Mulde hervorgegangen sind. Jede Folge von Subkulturen wurde in 96-Mulden-Rundbodenplatten mit der genannten Dichte in einem Gesamtvolumen von 100 µl HAT-Medium ohne Aminopterin-Komponente (HT-Medium) durchgeführt. Nichttransformierende HAT-empfindliche Lymphoblastoidzellen wurden mit einer Dichte von 500 Zellen/Mulde als Futterzellen in die Mulden eingebracht. Am 4.Tag nach dem Aufbringen wurden 100 µl HAT-Medium zu allen Mulden zugesetzt, um die Futterzellen selektiv abzutöten. Dann wurden die Mulden wieder am 9. Tag nach dem Aufbringen durch Ersatz der halben Überstände durch HAT-Medium gefüttert. Anschließend wurden die Mulden in gleicher Weise alle 4-5 Tage mit HT-Medium gefüttert, bis eine ausreichende Lymphoblastoidzellen-Dichte in den Mulden für eine Analyse des Überstands durch ELISA in der bereits beschriebenen Art möglich war.

Bei jedem Assay waren jene Überstände, die mit IATS Serotyp 4 reagierten auch reaktionsfähig mit IATS Serotyp 11 und Fisher Immunotyp 2. Weiters war keine Antikörperaktivität gegen IATS Serotypen 13 und 14 vorhanden, was die frühere Spezifitätszuordnung bestätigt.

Das vorschriftsmäßige Klonen der spezifischen Antikörper-produzierenden Zellen erfolgte zuerst durch Aufbringen der Zellen mit sehr geringer Dichte (berechnet 1/Mulde) auf 72-Mulden Terasaki-Platten (Nunc # 1-36538) in einem Volumen von 10µl/Mulde. Dann werden die Platten 3 h in einen Inkubator eingebracht und die Zellen auf dem Boden der Platte absetzen gelassen, worauf sie mikroskopisch von zwei verschiedenen Personen nach Mulden mit nur einer einzigen Zelle untersucht werden. Jede dieser Zellen wird dann unabhängig von den anderen in Mulden einer 96-Mulden-Rundboden-Platte mit Futterzellen eingebracht und, wie oben bei den Subkulturen niedriger Dichte angegeben, gezüchtet. Die Überstände all dieser entstehenden Klone wurden nach dem obigen ELISA-Protokoll untersucht und zeigten sich positiv auf anti-IATS Serotypen 4 und 11.

Auf diese Weise wurde eine geklonte transformierte humane Zell-Linie erhalten, die kontinuierlich (unsterblich) wächst und einen humanen monoklonalen Antikörper sezerniert, der mit Fisher Immunotyp 2 reagiert und mit IATS Serotypen 4 und 11 kreuzreaktiv ist.

Bei diesem Beispiel tragen die Zell-Linie und der von ihr produzierte Antikörper die gleiche Bezeichnung (d.h.6D6).

Der Isotyp des Antikörpers in Mulde 6D6 wurde durch einen ELISA-Assay ähnlich wie bei den oben beschriebenen Spezifitätstests bestimmt, mit der Ausnahme, daß HRP-Ziegen-anti-human-IgG und HRP-Ziegen-anti-human-IgM unabhängig voneinander als Reagens der zweiten Stufe verwendet wurden anstatt sie zu kombinieren. Eine positive Reaktion des Antikörpers in Mulde 6D6 mit Fisher Immunotyp 2 und IATS Serotypen 4 und 11 wurde nur mit dem anti-IgM-Reagens beobachtet, was auf einen IgM-Isotyp für diesen Antikörper hinweist.

Die biochemische Kennzeichnung der durch den Antikörper 6D6 erkannten Molekülarart erfolgte durch Immunoblot-Analyse, wie im obigen Beispiel 3 beschrieben, mit der Ausnahme, daß LPS-Zubereitungen des Fisher Immunotyps 2 und der IATS Serotypen 4 und 11 als Antigen-Zubereitungen gewählt wurden. Eine LPS-Zubereitung aus Fisher-Immunotyp 1 wurde als negative Kontrolle mitverwendet.

Vor der Analyse wurde jede der rohen LPS-Zubereitungen 1:1 in Dissoziationsprüfer (0,125 M Tris, 4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) verdünnt und das Bad 5 min beschallt. Um die Proteine in den Proben abzubauen, wurde Proteinase K (1 mg/ml in H₂O) zu jeder Probe in einem 40%igen Verhältnis (w/v) von Enzym zu LPS zugesetzt und 2 h bei 60 °C mit 5 min Beschallung nach 1 h inkubiert. Die Proben wurden dann 5 min auf 100 °C erhitzt und 2 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert.

Die geklärten Proben, die 10 µg LPS von jedem der Bakterienstämme darstellten, wurden einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wie oben beschrieben unterworfen. Nach der Übertragung der abgetrennten Molekülarart auf NCM wurden die NCMs 2 h bei Raumtemperatur in 10 ml verbrauchtem Kulturüberstand aus der Zell-Linie 6D6 inkubiert. Der Rest des Verfahrens folgt der obigen Beschreibung.

Positive Ergebnisse wurden nur bei Reihen erhalten, die LPS von Fisher Immunotyp 2, IATS Serotyp 4 oder IATS Serotyp 11 enthielten. Bei den Bahnen mit Fisher Immunotyp 2 und IATS 2 und IATS Serotyp 11

erkannte der Antikörper 6D6 eine kurze Reihe regelmäßig (d.h. leiterartig) angeordneter Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht, die genau den kleineren Formen von LPS-Molekülen entsprachen, wie sie bei einem ähnlichen SDS-PAGE-Gel sichtbar gemacht wurden, bei welchem die Antigene nicht auf NCM transferiert wurden, sondern spezifisch auf die Anwesenheit von LPS gefärbt wurden, mit der Ausnahme, daß die unterste Bande auf dem silbergefärbten Gel (die die Kernregion plus Lipid A des LPS darstellt) nicht erkannt wurde. Im Gegensatz dazu erkannte der Antikörper 6D6 bei einer Reihe, die IATS Serotyp 4 LPS enthielt, eine volle Serie regelmäßig angeordneter Banden, die fast die gesamte Länge des Gels erfüllte, wobei die stärkste Reaktion bei den Banden höheren Molekulargewichts auftrat. Wieder entsprach dieses Profil dem leiterartigen Bandmuster, das bei LPS-spezifisch gefärbtem Gel beobachtet wurde (d.h. sie schienen Bande für Bande zu entsprechen), mit der Ausnahme, daß die den Kern darstellende Bande mit dem Lipid A nicht erkannt wurde. Diese Daten zeigen eindeutig, daß die O-Seitenkette des LPS das durch den Antikörper 6D6 erkannte molekulare Ziel am Fisher Immunotyp 2 und den IATS Serotypen 4 und 11 war.

Um die in vivo-Schutzwirkungskapazität des Antikörpers 6D6 kennenzulernen, wurden Tierschutzstudien an Mäusen vorgenommen. Der 6D6-Antikörper wurde zuerst aus der verbrauchten Kulturflüssigkeit durch Ausfällen mit gesättigtem Ammonsulfat (Endkonzentration 50%) konzentriert. Das ausgefällte Material wurde in einem minimalen Volumen sterilen Wassers aufgenommen, sorgfältig gegen PBS dialysiert und steril filtriert. Als negative Kontrolle wurde der verbrauchte Kulturüberstand einer anderen transformierten humanen Zell-Linie (C5B7-A.T.C.C. Nr. CRL 8753), die einen humanen monoklonalen Antikörper produziert, der für die LPS von Fisher Immunotyp 1 spezifisch ist, in gleicher Weise behandelt. Ebenso wurde als positive Kontrolle verbrauchter Kulturüberstand aus der transformierten humanen Zell-Linie 6F11 (A.T.C.C. Nr. CRL 8562), die einen für die LPS des Fisher Immunotyps 2 und des IATS Serotyps 11 spezifischen humanen monoklonalen Antikörper produziert, konzentriert.

Weibliche Swiss-Webster-Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 22 g wurden in drei Gruppen von jeweils 20 Mäusen eingeteilt. Alle Mäuse in jeder Gruppe wurden einzeln auf intraperitonealem Weg (ip) mit 0,5 ml konzentriertem 6D6-, C5B7- oder 6F11-Antikörper geimpft. 6 Stunden später wurde jede der drei Gruppen in vier Gruppen von 5 Mäusen unterteilt und Tiere jeder 5-Mäuse-Gruppe wurden unabhängig voneinander einem ip-Angriff mit 0,3 ml einer lebenden Bakteriensuspension mit 8 LD₅₀ vom Fisher Immunotyp 1, Fisher Immunotyp 2, IATS Serotyp 4 oder IATS Serotyp 11 ausgesetzt. Die Bakteriensuspensionen wurden nach der Beschreibung von Beispiel 4 hergestellt. Nach dem Bakterienangriff wurden die Tiere während eines Zeitraums von 5 Tagen beobachtet. Die Resultate sind die folgenden:

Tabelle 5

In vivo-Demonstration der Schutzwirkung von humanem monoklonalem Antikörper 6D6 gegen Fisher Immunotyp 2 und IATS Serotypen 4 und 11				
Humaner monoklonaler Antikörper	Anzahl überlebender/Anzahl untersuchter Tiere			
	5 Tage nach dem Angriff durch			
	Fisher 1	Fisher 2	IATS 4	IATS 11
6D6	0/5	5/5	4/5	5/5
6F11	0/5	5/5	0/5	5/5
C5B7	5/5	1/5	0/5	0/5

Wie in Tabelle 5 gezeigt ist, konnte der Antikörper 6D6 einen spezifischen und signifikanten Schutz gegen einen letalen Angriff von Fisher Immunotyp 2, IATS Serotyp 4 und IATS Serotyp 11, jedoch nicht gegen Fisher Immunotyp 1 schaffen.

Beispiel 6:

Beispiel 6 zeigt ein Verfahren zur Herstellung eines humanen monoklonalen Antikörpers, der mit IATS Serotypen 6 und 13 und Fisher Immunotyp 1 von *P.aeruginosa* reagiert. Das Verfahren der Beispiele 1 bis 5 wurde wiederholt mit der Ausnahme, daß bestimmte Änderungen bei der Isolierung, Charakterisierung und Prüfung des Antikörpers in diesem Beispiel notwendig waren. Im Folgenden sind die Änderungen des Verfahrens und die erhaltenen Resultate für den hier beschriebenen monoklonalen Antikörper angegeben.

Die Quelle für die menschlichen B-Zellen war eine Person, die vorher mit einer aus Fisher Immunotyp 2 isolierten Polysaccharid-Zubereitung mit hohem Molekulargewicht immunisiert worden war (Pier et al., *Infec. Immun.*, 34:461 (1981)). Nach dem Gewinnen der E⁻PBMC nach obigen Angaben wurden die Zellen in FCS mit 10% (v/v) DMSO in einem Flüssig-Stickstoff-Dampftank eingefroren. Diese Zellen wurden nachher bei
 5 37°C rasch aufgetaut, einmal mit Iscove's Medium gewaschen und in HAT-Medium suspendiert. Die zellgetriebene Transformation wurde in einem Verhältnis von 15 1A2-Zellen pro E⁻PBMC vorgenommen. Die Zellmischung wurde dann auf 20 Mikrotiterplatten bei einer Konzentration von 78500 Zellen/Mulde aufgebracht. Die Kultur wurde nach dem Aufbringen alle 3 bis 5 Tage gefüttert und am 11.Tag wurden bei 100% der Mulden proiferierende Zellen festgestellt.

10 Zur Prüfung der Überstände auf die Anwesenheit von anti-P.aeruginosa-Antikörpern durch das ELISA-Verfahren wurden Antigenplatten verwendet, die aus einer Mischung von P.aeruginosa-Fisher Immunotypen 1 - 7 [klinisches Isolat PSA 1277 (Genetic Systems Corporation Organism Bank ("GSCOB")), ATCC 27313, PSA G98 (GSCOB), ATCC 27315, PSA F625 (GSCOB), ATCC 27317 und ATCC 27318] bestanden. Ebenfalls wurde eine PLL-behandelte Mikrotiterplatte ohne Bakterien bei der Prüfung verwendet.

15 Die Analyse der Kulturüberstände durch die obige Methode führte zur Feststellung von etwa 200 Mulden, die anti-P. aeruginosa-Antikörper enthielten, die mit den Fisher Immunotypen 1-7 auf der Platte, nicht jedoch mit der PLL-behandelten Platte ohne Bakterien reagierten. Zur Identifizierung dieser Mulden, die mit zwei oder mehreren IATS-Serotypen reagierten, wurden, wie oben, Antigenplatten bereitet, auf welchen eine Reihe nur PLL-fixierte Bakterien eines einzigen IATS Serotyps enthielt. Bei der Durchführung
 20 des ELISA nach obigen Angaben wurde der Überstand einer ausgebreiteten Kultur von jeder der positiven anti-P-aeruginosa-Mulden verwendet. Die Überstände wurden auf den neuen Antigenplatten in einer Reihe angeordnet und ergaben bei der Identifikation eine Anzahl von Mulden, die Antikörper mit Reaktionsfähigkeit gegenüber einer Mehrzahl von IATS Serotypen aufwiesen. Eine Mulde mit der Bezeichnung 8H7 enthielt spezifische Antikörper für IATS Serotypen 6 und 13. Als der Überstand dieser Mulde durch ELISA,
 25 wie in Beispiel 5 mit den 7 Fisher Immunotypen untersucht wurde, zeigte sich, daß die Antikörper von 8H7 für den Fisher Immunotyp 1 spezifisch waren.

Zur Bestimmung, ob das Muster der anti-Reaktion mit den IATS Serotypen 6 und 13 auf einen oder mehrere Antikörper in der Mulde 8H7 zurückzuführen war, wurden weiters aliquote Anteile des Überstands unabhängig voneinander mit IATS Serotypen 6,13 und 17 (negative Kontrolle) adsorbiert und die adsorbier-
 30 ten Überstände dann mit PLL-fixierten Bakterien von jedem der drei IATS Serotypen nach dem oben angegebenen ELISA Assay untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die IATS Serotypen Antikörperaktivität gegeneinander herausadsorbierten. IATS Serotyp 17 adsorbierte keine Aktivität gegen IATS 6 oder 13 heraus. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Muster der anti-Reaktion mit den IATS Serotypen 6 und 13 auf einen einzigen Antikörper aus Mulde 8H7 zurückzuführen war.

35 Isolierung und Klonen der Antikörper-produzierenden Zellen aus Mulde 8H7 erfolgte in drei Stufen wie im wesentlichen in dem obigen Beispiel 5 beschrieben wurde. Auf diese Weise wurde eine geklonte transformierte humane Zell-Linie erzielt, die kontinuierlich (d.h. unsterblich) wächst und humanen monoklonalen Antikörper absondert, der mit Fisher Immunotyp 1 reaktiv und mit IATS Serotypen 6 und 13 kreuzreaktiv ist. Bei diesem Beispiel tragen die Zell-Linie und der von ihr produzierte Antikörper die gleiche
 40 Bezeichnung 8H7. Bei Verwendung eines ähnlichen Verfahrens, wie in Beispiel 5 beschrieben, wurde der Isotyp des Antikörpers in Mulde 8H7 als IgM bestimmt.

Die biochemische Charakterisierung der durch den Antikörper 8H7 erkannten Molekülarart erfolgte durch Immunoblot-Analyse nach der Beschreibung von Beispiel 3 und 5 mit der Ausnahme, daß die LPS-Zubereitungen von Fisher Immunotyp 1 und IATS Serotypen 6 und 13 als Antigenpräparationen für die
 45 Analyse verwendet wurden. Eine LPS-Zubereitung von IATS Serotyp 10 wurde als negativer Vergleich miteinbezogen. Die Analyse der entstandenen Immunoblots zeigte positive Ergebnisse nur bei den NCM-Reihen, die LPS aus Fisher Immunotyp 1, IATS Serotyp 6 oder IATS Serotyp 13 enthielten. Bei Reihen von Fisher Immunotyp 1 und IATS Serotyp 6 erkannte der Antikörper 8H7 eine Reihe regelmäßig (leiterartig) angeordneter Banden, die fast die gesamte Länge des Gels einnahmen. Diese Banden entsprachen genau
 50 den Formen der LPS-Moleküle mit verschiedenem Molekulargewicht, wie sie bei ähnlich behandeltem SDS-PAGE-Gel sichtbar gemacht werden, wenn die Antigene nicht auf NCM übertragen werden, sondern statt dessen spezifisch auf die Anwesenheit von LPS gefärbt werden. Bei der LPS vom IATS Serotyp 13 enthaltenden Reihe erkannte der Antikörper 8H7 eine verkürzte Reihe von regelmäßig angeordneten Banden, die auf den Bereich des mittleren bis oberen Molekulargewichts auf dem Gel beschränkt war.
 55 Wieder entsprachen die erkannten Banden in ihrer Lage jenen, die bei einem LPS-spezifisch gefärbten Gel beobachtet werden, mit der Ausnahme, daß die LPS-Formen mit dem höchsten und dem niedrigsten Molekulargewicht auf dem gefärbten Gel im Western Blot nicht gut erkennbar waren. Diese Daten zeigen eindeutig, daß die LPS das durch den Antikörper 8H7 bei dem Fisher Immunotyp 1 und den IATS 6 und 13

erkannte molekulare Ziel war.

Zur Feststellung der in vivo-Schutzwirkungskapazität von Antikörper 8H7 wurden Tierschutzstudien an Mäusen nach der Beschreibung der obigen Beispiele 4 und 5 vorgenommen. Als negative Kontrolle wurde der Kulturüberstand einer anderen transformierten humanen Zell-Linie (6F11 - ATCC Nr. CRL 8652), die einen für LPS von Fisher Immunotyp 2 spezifischen Antikörper produziert, in gleicher Weise behandelt. Als positive Kontrolle wurde verbrauchter Kulturüberstand aus einer transformierten humanen Zell-Linie C5B7 (ATCC Nr. CRL 8753), die einen humanen monoklonalen Antikörper produziert, der für LPS des Fisher Immunotyps 1 und IATS Serotyps 6 spezifisch ist, verwendet.

Weibliche Swiss-Webster-Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 - 22 g wurden in drei Gruppen zu je 30 Mäusen eingeteilt. Alle Mäuse jeder Gruppe wurden einzeln intraperitoneal (ip) mit 0,5 ml konzentriertem 8H7-, 6F11- oder C5B7-Antikörper geimpft. Vier Stunden später wird jede der drei Gruppen wieder in drei Gruppen zu 10 Mäusen unterteilt und Tiere dieser 10-Mäuse-Gruppe wurden unabhängig voneinander einem ip-Angriff mit 0,3 ml einer lebenden Bakteriensuspension ausgesetzt, die 9,4 LD₅₀ eines klinischen Isolats (A522), repräsentativ für IATS 6 Serotyp (äquivalent Fisher Immunotyp 1), 5 LD₅₀ des IATS 13 Bezugs-Serotyps oder 10 LD₅₀ von IATS 11 Bezugs-Serotyp (äquivalent Fisher Immunotyp 2) enthielt. Die Bakteriensuspensionen wurden nach der Beschreibung von Beispiel 4 bereitet. Nach dem Bakterienangriff wurden die Tiere während eines Zeitraumes von 5 Tagen beobachtet. Die Ergebnisse waren die folgenden:

Tabelle 6

In vivo-Demonstration der Schutzwirkung von humanem monoklonalem Antikörper 8H7 gegen IATS Serotypen 6 und 13			
Humaner monoklonaler Antikörper	Anzahl der überlebenden/Anzahl der untersuchten Tieren		
	5 Tage nach dem Angriff mit		
	IATS 6	IATS 13	IATS 11
8H7	9/10	6/10	1/10
C5B7	9/10	0/10	0/10
6F11	0/10	2/10	10/10

Wie in Tabelle 6 gezeigt, konnte der Antikörper 8H7 spezifischen und signifikanten Schutz gegen einen letalen Angriff von IATS Serotyp 6, jedoch nicht gegen Serotyp 11 bieten. Der Schutz gegen IATS Serotyp 13 war weniger stark, kann jedoch durch die relativ hohe Anzahl von Organismen zur Erreichung der LD₅₀ dieses Isolats im Vergleich zum Isolat von Serotyp 6 (3×10^7 koloniebildende Einheiten bzw. $2,6 \times 10^6$ koloniebildende Einheiten) erklärt werden. Bei einem anderen Versuch konnte der Antikörper 8H7 fünf von fünf mit 3,5 LD₅₀ von IATS 13 Isolat und fünf von fünf von durch IATS 6-Isolat angegriffenen Mäusen Schutz bieten.

Aus dem Vorhergehenden ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen Zell-Linien humane monoklonale Antikörper sowie Fragmente derselben zur Verfügung stellen, die kreuzreaktiv für und kreuzpositiv gegen verschiedene IATS Serotypen von *P.aeruginosa* sind. Das erlaubt die leichtere Entwicklung therapeutischer und prophylaktischer Zusammensetzungen die gegen Infektionen der meisten, wenn auch nicht aller Stämme von *P.aeruginosa* wirksam sind. Zusätzlich dazu liefern die Zell-Linien Antikörper, die bei Immunoassays und anderen bekannten Verfahren Verwendung finden.

Obwohl die vorliegende Erfindung detailliert erläutert und durch Beispiele untermauert ist, versteht sich, daß bestimmte Änderungen und Variationen vorgenommen werden können, ohne den Rahmen derselben zu verlassen.

Patentansprüche

1. Unsterbliche transformierte Zell-Linie mit der Bezeichnung A.T.C.C. Nr. CRL 8941, 9171 oder 9258, die einen humanen monoklonalen Antikörper absondert, der spezifisch mit weniger als allen, jedoch zumindest mit zwei IATS Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* reagiert.
2. Kit zur Feststellung der Anwesenheit von *Pseudomonas aeruginosa*, gekennzeichnet durch eine monoklonale Antikörper-Zusammensetzung, die zumindest einen humanen monoklonalen Antikörper

enthält, der mit weniger als allen, zumindest jedoch mit zwei IATS Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* reagiert, und Markierungen, die ein feststellbares Signal ergeben und kovalent an den Antikörper gebunden sind, die mit jedem der genannten monoklonalen Antikörper reagieren.

- 5 3. Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit von *Pseudomonas aeruginosa* in einer Probe, **dadurch gekennzeichnet**, daß diese Probe mit einem monoklonalen Antikörper, der mit mindestens zwei IATS Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* reaktiv ist, kombiniert und die Komplexbildung bestimmt wird.
- 10 4. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern, die zur spezifischen Reaktion mit einer Mehrzahl von, jedoch nicht allen IATS Serotypen und mit null, einem, zwei oder mehreren Fisher Immunotypen von *Pseudomonas aeruginosa* befähigt sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Epstein-Barr-Virus Transformation von B-Lymphocytenzellen vorgenommen wird, die aus einem menschlichen Spender erhalten wurden, der Serotypen von *P.aeruginosa* ausgesetzt war, und die oben definierten monoklonalen Antikörper oder Zusammensetzungen, die diese oder Fragmente derselben mit der gleichen Reaktionsfähigkeit wie die Antikörper enthalten, gewonnen werden.
- 15 5. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern, die zur spezifischen Reaktion mit einer Mehrzahl von, jedoch nicht allen IATS Serotypen und mit null, einem, zwei oder mehreren Fisher Immunotypen von *Pseudomonas aeruginosa* befähigt sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Zellfusion zwischen geeignet drogenmarkierten humanen Myelom-, Mausmyelom- oder human-Maus-Heteromyelomzellen bzw. humanen Lymphoblastoidzellen mit humanen B-Lymphocyten vorgenommen und die oben definierten monoklonalen Antikörper oder Zusammensetzungen, die diese oder Fragmente derselben mit der gleichen Reaktionsfähigkeit wie die Antikörper enthalten, gewonnen werden.
- 20 6. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern, die zur spezifischen Reaktion mit einer Mehrzahl von, jedoch nicht allen IATS Serotypen und mit null, einem, zwei oder mehreren Fisher Immunotypen von *Pseudomonas aeruginosa* befähigt sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß Zell-Linien mit der Bezeichnung A.T.C.C. Nr. CRL 8941, 9171 oder 9258 gezüchtet und daraus die definierten monoklonalen Antikörper oder Zusammensetzungen, die diese oder Fragmente derselben mit der gleichen Reaktionsfähigkeit wie die Antikörper enthalten, gewonnen werden.
- 25 7. Verfahren zur Herstellung einer Zell-Linie, die monoklonale Antikörper produziert, die zur spezifischen Reaktion mit einer Vielzahl von, jedoch nicht allen IATS Serotypen und mit null, einem, zwei oder mehreren Fisher Immunotypen von *P.aeruginosa* befähigt sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Epstein-Barr-Virus-Transformation von B-Lymphocytenzellen menschlicher Spender, die Serotypen von *P.aeruginosa* ausgesetzt waren, vorgenommen wird.
- 30 8. Verfahren zur Herstellung einer Zell-Linie, die monoklonale Antikörper produziert, die zur spezifischen Reaktion mit einer Vielzahl von, jedoch nicht mit allen IATS Serotypen und mit null, einem, zwei oder mehreren Fisher Immunotypen von *P.aeruginosa* befähigt sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Zellfusion zwischen geeignet drogenmarkierten humanen Myelom-, Mausmyelom- oder human-Maus-Heteromyelomzellen, bzw. humanen Lymphoblastoidzellen mit menschlichen B-Lymphocytenzellen vorgenommen wird.
- 35 40 45 50 55