

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1001844A4

NUMERO DE DEPOT : 8900085

Classif. Internat.: C12P A61K C12N

Date de délivrance : 20 Mars 1990

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 27 Janvier 1989 à 14h50
à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SUMITOMO CHEMICAL COMPANY LIMITED;SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED
No. 15 Kitahama 5-chome Higashi-ku Osaka-shi, OSAKA-FU(JAPON);40 Dosho-machi 2-chome Higashi-ku Osaka-shi, OSAKA-FU (JAPON)

représenté(e)s par : DELLERE Robert, BUREAU VANDER HAEGHEN, Avenue de la Toison d'Or, 63 - 1060 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : ANTICORPS MONOCLONAL HUMAIN CONTRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA, SA PRODUCTION ET SON APPLICATION.

INVENTEUR(S) : Ohtsuka Hiroshi, 16-40-601, Takagihigashi-machi, Nishinomiya, Hyogo (JP);Ochi Hiroshi Ochi, 2-11-8-110, Sonehigashi-machi, Toyonaka, Osaka (JP);Higuchi Atsuko, 2-1-211, Komyo-cho, Takarazuka, Hyogo (JP);Yokota Shinichi, 2-14-7 Mefu, Takarazuka, Hyogo (JP);Noguchi Hiroshi, 4-4-153, Seiwadainishi, Kawanishi, Hyogo (JP);Terashima Masazumi, 2-29-7, Ohike, Ibaraki, Osaka (JP);Uezumi Ikuko, 5-1-30, Shuntoku-cho, Higashiosaka, Osaka (JP);Kato Masuhiro, 2-10-2-235 Sonehigashi-machi, Toyonaka, Osaka (JP);Okuda Takao, 4-4-22-802 Kamishinden, Toyonaka, Osaka (JP)

Priorité(s) 29.01.88 JP JPA02090788

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 20 Mars 1990
PAR DELEGATION SPECIALE :

WIM L.
Directeur.

ANTICORPS MONOCLONAL HUMAIN CONTRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA,
SA PRODUCTION ET SON APPLICATION

La présente invention concerne un anticorps monoclonal humain contre Pseudomonas aeruginosa (appelé ci-dessous "P.aeruginosa" ou "PA"), et sa production et son utilisation. Plus particulièrement, elle concerne un anticorps monoclonal humain, qui peut reconnaître une structure commune aux lipopolysaccharides dans P. aeruginosa de différents sérotypes, et présente une propriété de liaison à P. aeruginosa de deux ou plusieurs sérotypes, sa production et utilisation.

L'anticorps monoclonal humain présente, comme il est dit ci-dessus, une propriété de liaison à P. aeruginosa de deux ou plusieurs sérotypes et également au lipide A des bactéries Gram-négatives, en particulier aux bactéries appartenant aux genres Escherichia, Salmonella et Pseudomonas, si bien qu'il est utile pour la prévention ou le traitement des maladies infectieuses provoquées par P. aeruginosa et également pour les chocs d'endotoxine provoqués par les bactéries Gram négatives.

Les bactéries provoquant des maladies infectieuses, c'est-à-dire les bactéries prophlogistiques, varient avec le développement et les modifications des

antibiotiques utilisés en clinique. Il s'ensuit que des maladies infectieuses à bactéries n'ayant originellement qu'une faible pathogénicité ou virulence peuvent augmenter. Ainsi, P. aeruginosa est actuellement l'une des principales bactéries pathogènes provoquant des maladies infectieuses, dont les graves symptômes mènent souvent à la mort des malades, en particulier lorsque leurs défenses immunologiques sont fiables à la suite d'une administration continue d'immunosuppresseurs, lorsqu'ils souffrent de cancer ou de brûlure, etc.

5 Parmi les divers procédés préventifs ou thérapeutiques pour les infections bactériennes, le plus courant est la chimiothérapie par utilisation d'antibiotiques ou d'agents antimicrobiens. En fait, on a mis au point divers antibiotiques, y compris la streptomycine, la kanamycine, la pénicilline, la céphalosporine, etc, qui sont actifs à l'égard de presque toutes les bactéries Gram-positives (p. ex. les staphylocoques) et les bactéries Gram-négatives (p. ex. E. coli) et produisent un effet clinique important. Cependant, on connaît que peu de médicaments auxquels est sensible P. aeruginosa. Même les médicaments agissent sur P. aeruginosa seulement de façon bactériostatique et non bactéricide. Ainsi, ils peuvent prévenir la croissance de P. aeruginosa mais ne présentent cliniquement aucun effet thérapeutique remarquable.

10 15 20 25 30 L'autre procédé préventif ou thérapeutique est le traitement aux anticorps comprenant l'administration d'immunoglobuline. Ce procédé est souvent réa-

08900085

lisé en association avec la chimiothérapie et attire aujourd'hui de plus en plus l'attention comme substitut de la chimiothérapie. On peut obtenir un sérum à haut titre d'anticorps par immunisation active d'animaux comme les chevaux ou les lapins, et l'on peut effectuer le traitement aux anticorps par administration d'un tel sérum. En fait son remarquable effet thérapeutique a été mis en évidence sur des infections expérimentales en utilisant divers animaux. On sait, 5 d'après les cas de la toxine de la diphtérie et de la toxine de la vipère que le traitement aux anticorps utilisant des sera provenant d'animaux est tout à fait efficace même sur les êtres humains. Cependant, 10 l'introduction d'une protéine étrangère, d'origine animale, dans un corps humain provoque de graves effets secondaires comme une anaphylaxie ou d'autres réaction allergiques. Il est ainsi très souhaitable de mettre au point 15 une immunoglobuline humaine ayant un haut titre d'anticorps contre les bactéries et présentant un effet thérapeutique marqué sur les infections bactériennes.

On prépare les préparations d'immunoglobuline humaine classiques en recueillant du sang auprès de personnes en bonne santé ou de malades infectés 25 par des bactéries, en soumettant le sang à un fractionnement pour obtenir une fraction d'immunoglobuline, en purifiant la fraction d'immunoglobuline et en en éliminant les matières agglutinantes par addition d'éthylèneglycol, traitement avec des protéases, sulfonation, chromatographie sur des colonnes du type DEAE, etc., 30 suivie par une formulation du produit résultant en

08900085

préparations injectables par voie intramusculaire ou intraveineuse. Ces préparations sont intéressantes en ce qu'elles ne provoquent pas d'anaphylaxie ni d'autres effets secondaires que ceux qui sont observés avec l'administration d'immunoglobuline provenant d'animaux, mais elles ont certains inconvénients. L'un de ces inconvénients est que leur titre d'anticorps contre les bactéries est si faible qu'on peut ne pas nécessairement produire un effet thérapeutique suffisant. Un autre inconvénient est qu'il est difficile de les fournir de manière reproductible avec un haut titre d'anticorps en grande quantité, car on les prépare en utilisant le sang recueilli auprès des personnes en bonne santé ou des malades infectés par des bactéries, et l'obtention de sera ayant de façon constante et uniforme un haut titre en anticorps est très difficile. Un autre inconvénient est qu'elles peuvent être contaminées par les virus de l'hépatite (p. ex. le virus HB), le virus de la leucémie des cellules T Adultes (ATLV, HTLV), etc, car le sang utilisé comme produit de départ est obtenu chez de nombreuses personnes inconnues. Pour surmonter ces inconvénients, la production d'un anticorps monoclonal humain ayant un fort effet d'inhibition sur les infections à P. aeruginosa est très souhaitable.

Lorsqu'un anticorps est lié à la couche superficielle d'un corps bactérien, la phagocytose d'un macrophage sur le corps bactérien est accélérée (c'est l'accélération de la phagocytose due à l'opsonisation), ou bien il se produit une lyse de corps bactérien par le complément. Comme antigène

cible à la surface du corps bactérien de P.aeruginosa,
on connaît les lipopolysaccharides (LPS), les protéines
d'enveloppe, les flagelles, les pili, etc. Parmi
eux, le O-polysaccharide qui est un constituant
des LPS situé à la partie la plus extérieure de la cou-
che superficielle et appelé "antigène O" a une forte
antigénicité, et l'anticorps correspondant à l'anti-
gène O présente généralement un effet préventif ou
thérapeutique élevé.

L'antigène O est diversifié dans sa structure
chimique si bien que les souches appartenant à
P. aeruginosa sont classées d'après la différence
de réactivité immunologique avec un antisérum ou un
anticorps monoclonal de souris préparé contre
l'antigène O de la souche de référence de P.
aeruginosa. Cette classification est connue comme séro-
typique, et on peut citer comme exemples de cette
classification sérotypique : les types 1 à 17 selon la
classification de Homma et coll. (Japan. J. Exp. Med.,
44, 1 (1974) ; les types 1 à 7 selon la classification
de Fisher et coll. J. Bacteriol. 98, 835 (1969) ; les ty-
pes A à M selon la classification de Nippon Ryokunoh-
kin Kenkyukai Kesseigata-betsu Kento inkai
Commission d'étude sur la classification des sérotypes,
groupe d'étude japonais sur Pseudomonas aeruginosa (appelée
ci-dessous "Commission japonaise") (Japan. J. Exp. Med.,
329 (1976)) ; les types 1 à 17 selon la classification
de l'International Antigenic Typing System (IATS), etc.
Ces classifications et leur correspondance sont

rappelées dans le tableau 1 (Japan. J. Exp. Med., 46, 329 (1976)).

TABLEAU 1 : Classification sérotypique de P. aeruginosa

Commission Japonaise 1976	Homma et coll.	ITATS 1983	Fisher et coll. 1969
A	1	3	-
B	2, 7, 13, 16	2, 5, 16	3, 7
C	3	8	6
D	4	9	-
E	5	11	2
F	6	4	-
G	8	6	1
H	9	10	5
I	10	1	4
J	11	15	-
K	12	13	-
L	14	-	-
M	15, 17	-	-
-	-	7, 12, 14, 17	-

L'antigène O de P. aeruginosa a une structure polymérique comprenant des motifs répétitifs de à 5 saccharides, et la séquence de ces motifs varie avec chaque sérotype. On sait que l'anti-corps spécifique d'un certain antigène O présente un fort effet préventif ou thérapeutique pour les infections contre P. aeruginosa du sérotype auquel ledit antigène O appartient mais ne présente aucun effet contre P. aeruginosa de n'importe quel autre sérotype. Il est également connu que l'on peut produire un anti-

corps monoclonal humain de façon continue à l'aide d'une lignée cellulaire établie capable de produire un anticorps spécifique.

- L'établissement d'une lignée cellulaire capable de produire un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène O du lipopolysaccharide de P. aeruginosa peut être fait par application d'un procédé de transformation à l'aide du virus EB (Epstein,-Barr) ou d'un procédé de fusion cellulaire, etc. Ainsi, la demande de brevet 10 JP-Al-61-69796 indique que la transformation des splénocytes obtenus chez des malades ayant été infectés avec P. aeruginosa dans le passé, avec le virus EB, donne des cellules transformées par le virus EB capables de produire un anticorps monoclonal humain spécifique de l'antigène O de P. aeruginosa. La demande de brevet JP-Al-61-15 152281 indique également que la stimulation des cellules d'amygdale obtenues chez des malades atteints d'amygdalite avec du phytolaque ou poleweed (PWM) et la fusion des cellules d'amygdale stimulées avec des cellules de myéloïde de souris (souche P3-X63-Ag8-UI) donne des hybrides souris-homme capables de produire un anticorps monoclonal humain spécifique de l'antigène O de P. aeruginosa. Cependant, les anticorps monoclonaux humains tels que décrits ci-dessus sont restreints aux anticorps monoclonaux humains spécifiques des sérotypes, c'est-à-dire ayant une propriété de liaison avec P. aeruginosa d'un certain sérotype et n'ayant pas de propriétés de liaison avec P. aeruginosa d'autres sérotypes.
- Par ailleurs, la demande de brevet JP-Al-62-187417 décrit l'obtention d'un anticorps monoclonal à réactivité croisée et effet préventif croisé

à l'égard de P. aeruginosa de deux ou plusieurs sérotypes, basée sur l'obtention d'une cellule capable de produire un anticorps monoclonal ayant une réactivité croisée vis à vis des souches de types 2,5 et 16 de la classification de l'IATS ainsi que des souches des types 3 et 7 dans la classification de Fisher. Comme on le voit d'après le tableau 1 ci-dessus, cependant, toutes ces souches tombent dans le type B de la classification de la Commission japonaise, et donc, ledit anticorps monoclonal reste toujours spécifique des souches d'un seul sérotype. Ainsi, ledit anticorps monoclonal présente seulement une propriété de liaison avec seulement moins de 20% des souches d'isolats cliniques, et ainsi plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques des sérotypes sont nécessaires pour l'utilisation pratique.

L'évolution des maladies infectieuses provoquées par les bactéries Gram-négatives aboutit à une septicémie, qui fait que la vie des malades est souvent mise en danger. Les symptômes typiques de la septicémie sont la pyrexie, le rigor, l'insuffisance organique, le choc, etc. Le choc septique est appelé "choc endotoxique" et est provoqué par le LPS (lipopolysaccharide, qui est connu comme endotoxine et sécrété par le corps bactérin dans le corps humain à la suite de la prolifération et de la mort d'un grand nombre de bactéries Gram-négatives et/ou de la rupture desdites bactéries sous l'action des antibiotiques administrés. On sait que le site actif provoquant le choc endotoxique est le lipide A du PLS. Cependant, on ne dispose actuellement d'aucun procédé préventif

ou thérapeutique efficace contre le choc endotoxinique, et la mortalité due au choc endotoxinique atteint 50%. C'est pourquoi il existe une forte demande pour le développement d'un procédé préventif ou thérapeutique efficace.

5 Ziegler et coll. ont administré un E. coli J5 stérilisé à la chaleur (mutant rugueux type Rc) comme vaccin à des personnes en bonne santé pour obtenir un antisérum, dont il a été démontré qu'il est efficace pour la prévention du choc fatal dû à une bactériémie (New England J. Med., 307, 1552 - 1230, (1982)).

10 Ultérieurement, on a procédé à diverses études animales et cliniques et il s'est révélé que divers anticorps et anticorps monoclonaux spécifiques d'E. coli J5 ou du core glycolipidique de bactéries Gram-négatives sont efficaces dans la prévention du choc endotoxinique (WO 8404458 ; WO8501659 ; EP-A-0174204 ; JA-A-61-130300 ; Mutharia et coll. : Inf. Immun., 45, 631 - 636 (1984) ; Teng et coll. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 1790 - 1794 (1985) ; Gigliotti & Shene : J. Inf. Dis., 151, 1005 - 1011 (1985) ; Braude et coll. : J. Inf. Dis., 136 (Suppl), S167 - 173 (1977) ; Nellesand Niswander : Inf. Immun., 46, 677 - 681 (1984) ; Pollack et coll. : J. Clin. Invest., 72, 1874 - 1881 (1983) ; Young et coll. : Clin. Res., 30, 522A (1982) ; Young et coll. : Clin. Res., 32, 518A (1984).

15 20 25 30 Comme on l'a expliqué ci-dessus, l'anticorps connu spécifique de l'antigène O du lipopolysaccharide de P. aeruginosa n'est efficace que dans la prévention et le traitement des infections provoquées par

P. aeruginosa du sérotype auquel l'edit antigène O appartient et ne produit aucun effet préventif ou thérapeutique pour les infections provoquées par P. aeruginosa de tout autre sérotype. Il est donc nécessaire pour la prévention ou le traitement des infections à P. aeruginosa de n'importe quel sérotype de fournir au moins 13 à 17 types d'anticorps monoclonaux spécifiques de tous les sérotypes de P. aeruginosa.
A cet effet, il faut établir des lignées cellulaires produisant des anticorps monoclonaux humains spécifiques d'au moins 13 à 17 types de sérotypes. En outre, il faut cultiver chacune des lignées cellulaires à grande échelle ainsi que purifier l'anticorps produit, et cela pose un problème difficile du point de vue industriel. Il est hautement souhaitable de mettre au point un anticorps monoclonal humain qui peut être lié non seulement à une souche sérotypique de P. aeruginosa mais à plusieurs ou à toutes les souches sérotypiques de manière à produire un effet préventif ou thérapeutique sur les infections dues à P. aeruginosa de divers sérotypes.

A la suite d'études poussées pour obtenir à l'échelle industrielle un anticorps monoclonal humain efficace dans la prophylaxie et le traitement des maladies infectieuses provoquées par P. aeruginosa et une immuno-globuline humaine de titre élevé contenant un tel anticorps, on a maintenant réussi à établir une lignée cellulaire en utilisant un anticorps monoclonal humain venant de lymphocytes B humains qui se lie de façon spécifique à la structure chimique commune au LPS de P. aeruginosa de divers sérotypes. En cultivant une tel-

le lignée cellulaire, on peut obtenir un anticorps monoclonal humain réactif vis à vis de 2 ou plusieurs catégories de LPS de différents sérotypes et ayant un effet préventif ou thérapeutique à l'égard des infections à P. aeruginosa de deux ou plusieurs sérotypes. Plus spécifiquement, l'anticorps monoclonal selon l'invention est caractéristique en ce qu'il présente une propriété de liaison spécifique avec presque toutes les souches de P. aeruginosa appartenant aux types A, F, G et M de la classification de la Commission Japonaise et on peut donc le distinguer clairement des anticorps monoclonaux classiques spécifiques d'une seule souche sérotypique ainsi que de l'anticorps monoclonal connu se liant de façon croisée à des souches de sérotypes d'un sous-groupes de ladite classification tel que décrit dans JP-A1-62-187417.

L'invention a donc pour objet de fournir un anticorps humain qui peut reconnaître un site antigénique commun au LPS de.

P. aeruginosa, en particulier un anticorps monoclonal humain ayant une seule spécificité antigénique (anticorps monospécifique). Un autre objet de l'invention est de fournir une lignée cellulaire humaine qui est capable de produire de façon continue ledit anticorps humain. Un autre objet de l'invention consiste à fournir une préparation d'immunoglobuline humaine pour la prévention ou le traitement des infections bactériennes, et notamment des infections à P. aeruginosa et/ou des infections à bactéries Gram-négatives, comprenant une quantité efficace dudit anticorps humain comme ingrédient actif. Un autre objet de l'invention est encore de fournir un procédé de production dudit anticorps humain par culture in vitro ou in vivo de ladite lignée cellu-

laire humaine. L'invention a encore pour objet de fournir un procédé pour obtenir ladite lignée cellulaire humaine. Un objet de l'invention est aussi de fournir un nouvel anticorps qui peut reconnaître la structure chimique commune au LPS des P. aeruginosa et qui réagit de façon croisée au lipide A provenant de bactéries Gram-négatives comme P. aeruginosa, E. coli et S. thyphimurium. Ces objets de l'invention, ainsi que d'autres, apparaîtront aux spécialistes d'après les indications précédentes et la description qui va suivre.

L'anticorps monoclonal humain selon l'invention, qui est spécifique du site antigénique commun au LPS des P. aeruginosa désigne un seul anticorps monoclonal humain qui peut reconnaître le site antigénique commun au LPS des P. aeruginosa de deux ou plusieurs sérotypes, p. ex. des types A, G, F et M, et réagit de façon croisée avec le lipide A du LPS provenant de bactéries Gram-négatives. Il peut être produit à partir d'un seul clône producteur d'anticorps.

Ledit anticorps monoclonal humain a une propriété de liaison avec les souches de P. aeruginosa de 2 ou plusieurs sérotypes ou du LPS qui en dérive, c'est-à-dire une aptitude à accélérer une propriété bactéricide en présence de complément ainsi qu'une phagocytose par un neutrophile et un macrophage (opsonisation), et peut prévenir ou traiter des maladies infectieuses à P. aeruginosa. Les déterminants antigéniques dudit

anticorps monoclonal humain sont présents dans le LPS des souches des types A, G, F et M, en particulier au site lipidique A et à la partie polysaccharidique du LPS.

5 Le sérotype utilisé ici est donné selon la classification de la Commission Japonaise, qui est déterminée sur la différence de réaction immunochimique en utilisant un antisérum ou un anticorps monoclonal de souris spécifiquement réactif avec la souche de référence
10 de P. aeruginosa de chaque sérotype.

Le LPS représente un lipopolysaccharide qui est un constituant de la couche de surface d'un corps bactérien Gram-négatif et comprend un lipide (lipide A) et une partie de core qui y est reliée, ladite partie de core comprenant l'acide 2-céto-3-desoxyoctonique, un heptose, l'acide phosphorique, etc, comme constituants et protant une chaîne latérale polysaccharidique appelée "antigène O" à son extrémité. L'antigène O a une structure polymérique comprenant une chaîne droite constituée de 2 5 monosaccharides comme motif répétitif.
15 La composition, la disposition et la configuration de la chaîne saccharidique diffèrent selon les sérotypes, et cette différence est la base de la classification en sérotypes.

25 Telle que décrite ci-dessus, l'invention fournit un anticorps monoclonal humain, qui peut reconnaître le site du déterminant antigénique commun au LPS des P. aeruginoas et qui réagit également de façon croisée avec le lipide A provenant de bactéries Gram-négatives.
30

L'anticorps monoclonal humain réagissant de

façon croisée au lipide A provenant de bactéries Gram-négatives est un anticorps unique de type humain qui peut reconnaître spécifiquement le lipide A isolé et purifié à partir de bactéries Gram-négatives comme E. coli, S. typhimurium et P. aeruginosa. Comme l'anticorps monoclonal humain a une propriété de liaison spécifique avec le lipide A des bactéries Gram-négatives y compris P. aeruginosa et une propriété de neutralisation des activités biologiques comme l'activité mitochondriale, la toxicité fatale et la réaction de Schwarzman provoquées par le lipide A en plus de ladite réactivité envers les sites antigéniques communs au LPS des P. aeruginosa, il est utile comme agent préventif ou thérapeutique dans le choc endotoxique provoqué par les bactéries Gram-négatives.

L'anticorps monoclonal humain peut également présenter une propriété de liaison avec le LPS obtenu de E. coli ou S. typhimurium ou avec la partie LPS dans le cas du site lipidique A exposé comme dans une souche déficiente en antigène O et en polysaccharides de core (p. ex. souche de type rugueuse profonde).

Le lipide A constitue une partie glycolipidique du LPS et peut être préparé à partir du LPS par clivage de la liaison cétoïde dans l'acide cétodésoxyoctonique (KDO) avec un acide. Il comprend un squelette d'ester bêta(1- β)disaccharide, 1,4'-diphosphorique et d'acides gras qui y sont attachés, la quantité d'acides gras étant de 4 moles pour

1 mole de lipide A. Les types, le nombre et la position de liaison des acides gras varient avec chaque souche.

La lignée cellulaire humaine qui peut produire de façon continue l'anticorps monoclonal humain de l'invention spécifiquement réactif envers le déterminant antigénique commun au LPS des P. aeruginosa et en particulier ayant une réactivité croisée avec le lipide A des bactéries Gram-négatives, peut être produite par divers procédés, dont certains exemples sont donnés ci-dessous.

Dans le premier procédé, on infecte des lymphocytes B humains, sensibilisés (immunisés) avec P. aeruginosa (bactéries vivantes ou bactéries tuées au formol ou par chauffage), du LPS provenant de P. aeruginosa ou une bactérie Gram-négative, ayant une structure lipidique A à sa surface (bactéries vivantes ou bactéries tuées avec du formol ou par chauffage) de préférence E. coli J5 ou S. typhimurium mutants, Rc, Rd ou Re, ou du LPS ou lipide A provenant de ces souches, in vivo ou in vitro, avec le virus d'EB (Epstein-Barr) par mélange, de façon que les-dits lymphocytes B soient transformés en lymphocytes qui peuvent proliférer de façon continue. A partir des cellules ainsi transformées (avant ou après clonage), on choisit les cellules produisant un anticorps ayant une réactivité spécifique et on les fait proliférer de façon continue in vitro de manière à établir des lignées cellulaires qui peuvent produire ledit anticorps de façon continue. Pour la sélection, on peut utiliser un test ELISA (enzyme, linked immunosorbent assay) avec une série de crops bactériens comprenant des souches de P. aeruginosa de 17 sortes différentes de sérotypes

et E. coli O-111 : B4 et J5. La sélection peut également se faire par ELISA en utilisant le LPS et le lipide A provenant de P. aeruginosa, E. coli O-111 : B4 et J5 et une souche sauvage de S. typhimurium et des mutants Ra à Re comme antigènes.

Dans le second procédé, on soumet des lymphocytes B humains sensibilisés avec P. aeruginosa (bactéries vivantes ou bactéries tuées au formol ou par chauffage), du LPS provenant de P. aeruginosa, ou d'une bactérie Gram-négative ayant une structure de lipide A à sa surface (bactéries vivantes ou bactéries tuées au formol ou par chauffage), de préférence E. coli J5 ou S. typhimurium Rc, Rd ou Re mutants ou le LPS ou le lipide A provenant de ces souches, à une fusion cellulaire avec des cellules de myélome ou des cellules de lymphoblastoïde B pour établir des lignées cellulaires qui peuvent proliférer in vitro de façon continue et produire de façon continue un anticorps spécifique de LPS.

Dans le troisième procédé, on soumet les cellules transformées par le virus EB telles qu'établies dans le premier procédé à une fusion cellulaire avec des cellules de myélome ou des cellules de lymphoblastoïde B afin d'établir une lignée cellulaire qui peut proliférer in vitro de façon continue et produire un anticorps spécifique de LPS de façon continue.

Les lignées cellulaires ainsi établies peuvent être cultivées in vivo (p. ex. souris nue) ou in vitro cette culture suivie par une opération de collecte et de purification de l'anticorps libéré dans le milieu de culture ou dans le fluide d'ascites pour obtenir

l'anticorps en grande quantité.

La production de l'anticorps monoclonal de l'invention comprend les étapes suivantes : (1) préparation de lymphocytes B humains sensibilisés avec un antigène ; (2) établissement de lignées cellulaires productrices d'anticorps spécifiques monoclonaux en immortalisant les cellules préparées en (1) ; (3) culture des lignées cellulaires telles qu'établies en (2) ; (4) purification de l'anticorps spécifique monoclonal provenant de la culture telle qu'obtenue en (3) ; et (5) production d'une préparation d'immunoglobine de titre élevé comprenant l'anticorps spécifique monoclonal tel que purifié en (4). Chacune de ces étapes sera expliquée en détail ci-dessous.

15 Etape (1) : -

Comme lymphocytes B humains, on peut utiliser des cellules de lymphocytes humains produisant un anticorps contre le LPS de P. aeruginosa et le lipide A des bactéries Gram-négatives, qui peut être séparé du sang périphérique par centrifugation en utilisant un liquide de séparation lymphocytaire comme Lymphoprep® ou Mono-Poly Resolving Medium® (Flow Lab.). On peut également utiliser des lymphocytes B provenant de tissus ou d'organes (p. ex. ganglions lymphatiques, rate) extraits dans un but de diagnostic ou de traitement des maladies, de sang de cordon ombilical, etc.

Il est souhaitable d'obtenir ces cellules auprès de personnes qui ont été autrefois infectées avec P. aeruginosa et dont les cellules sont ainsi sensibilisées. Les personnes en question, dont on peut obtenir les cellules, peuvent être choisies par une mesure préalable du titre d'an-

ticorps dans leurs sera. On peut également obtenir des lymphocytes B humains auprès de toute personne, quels que soient ses antécédents médicaux et les mélanger avec P. aeruginosa inactivée, du LPS provenant de P. aeruginosa ou de bactéries Gram-négatives ayant une structure lipidique A à leur surface, de préférence E. coli J5 inactivée ou mutant S. typhimurium Rc, Rd ou Re ou du LPS ou lipide A provenant de bactéries Gram-négatives in vitro dans un but de sensibilisation. Autrement dit, 10 on peut ajouter n'importe lequel de ces antigènes inactivés aux lymphocytes B. En outre, on peut ajouter des solutions contenant des lymphokines comme des facteurs de prolifération des cellules B ou des facteurs de différenciation des cellules B (p. ex. des lectines végétales 15 comme le mitogène de pokeweed (PWM), des composants de corps bactériens comme le Cowan I, une culture mixte de lymphocytes humains, une culture de rate, de thymus ou de cordon ombilical) à des lymphocytes B humains aux fins de sensibilisation in vitro, ce traitement étant 20 suivi par une prolifération et une différenciation donnant des cellules productrices d'anticorps. Les lymphocytes humains B ainsi obtenus ont une molécule d'anticorps à la surface cellulaire et peuvent sécréter une faible quantité d'anticorps pendant une certaine période limitée, 25 mais ils ne sont pas immortels.

Etape (?) : -

Pour transformer les lymphocytes B humains sensibilisés ci-dessus en lignées cellulaires immortelles proliférant de façon continue, il existe

fondamentalement deux procédés, dont le premier comprend l'infection de lymphocytes B avec le virus EB par culture mixte des lymphocytes B humains sensibilisés avec le virus EB préparé à partir de cellules B95-8 de Marmouset, de préférence en utilisant de 2 à 10 TD₅₀ de virus par cellule. On inocule des microplaques à 96 puits avec les cellules à raison de 0,5 à 3 x 10⁴ par réservoir, et on effectue la culture en vue de la transformation en utilisant un milieu habituel (p. ex. RPMI1640, MEM d'Eagle) contenant du sérum de fœtus de bovin, du sérum de bovin, du sérum de cheval ou du sérum humain en proportion de 2 à 20% (v/v) en présence de 5 à 10% de CO₂, à température de 32 à 37°C pendant 2 à 5 semaines, temps pendant lequel on échange la moitié du milieu tous les 2 à 4 jours. Si nécessaire, on peut y ajouter de 1 à 2 µg/ml de cyclosporine A et un agent antibiotique ou antimicrobien pour la prévention de la contamination du mycoplasme. On peut observer les cellules ainsi transformées sous forme de colonies de 20 à 200 cellules au microscope optique 10 jours ou plus après l'infection et les distinguer facilement des cellules non transformées. On soumet la culture contenant les cellules transformées ayant suffisamment proliféré dans les puits à un tri pour évaluer le titre d'anticorps par ELISA, on sélectionne les puits sur lesquels on reconnaît la production d'anticorps et on confirme la spécificité envers le LPS selon la technique du Western blot. Ensuite, on soumet la culture contenant les amas de cellules transformées à une aspiration et rejet répétés avec une pipette pour briser les amas, on dilue avec la solution de culture pour obtenir une concen-

tration cellulaire appropriée et on inocule dans une microplaqué à 96 trous pour avoir de 0,5 à 100 cellules par réservoir pour le clonage (procédé de dilution limitante). On peut également effectuer

5 le clonage en utilisant de l'agarose (p. ex. sea plaque agarose). Ainsi, on inocule les cellules transformées (environ 7×10^4 à 7×10^5) dans une plaque de culture (diamètre 30 mm) avec 0,36 à 0,4% (p/v) d'agarose et on cultive à 37°C sous CO₂ à 5% pour obtenir une colonie ayant proliféré à partir d'une seule cellule. Lors

10 du clonage, il est souhaitable d'utiliser des cellules péritonéales de souris, des lymphocytes de sang de cor-don ombilical humain ou des cellules spléniques de souris irradiées aux rayons X comme couche d'alimentation.

15 A partir des lignées cellulaires clonées on choisit celles qui ont une haute productivité en anticorps spécifiques par mesure des titres d'anticorps des sur-nageants de cultures desdites lignées cellulaires clonées, selon la technique ELISA en utilisant des

20 corps bactériens de P. aeruginosa de 17 sérotypes différents et d'E. coli O-11 : B4 et J5 comme antigène en phase solide et en outre en utilisant du LPS et du lipide A provenant de P. aeruginosa de 17 sérotypes différents, E. coli O-111:B4 et J5, S. typhimurium

25 souche sauvage et mutants Ra à Re comme antigène en phase solide. On procède au clonage et à la sélection comme ci-dessus de façon répétée deux ou trois fois de manière à établir une lignée cellulaire transformée ayant un taux de prolifération élevé et produisant l'anticorps spécifique de façon stable en grande

30 quantité.

Le second procédé comprend l'étape consistant à soumettre les

lymphocytes B humains sensibilisés et les cellules de myélome à une fusion cellulaire en présence de poly-éthylèneglycol. Les cellules de myélome utilisées sont des mutants déficients en hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) (p. ex. P3X63-Ag 8 (P3),
5 P3X63-Ag 8.653) provenant de cellules de myélome de souris, des mutants déficients en HGPRT provenant de cellules de myélome humain U -266, d'hétéromyélome souris-homme SHM-D33 déficient en HGPRT, etc. On peut également employer des mutants déficients en HGPRT
10 provenant de cellules lymphoblastoides B humaines.

Comme polyéthylèneglycol (PEG), on peut utiliser, par exemple, du PEG 1000 à 6000 à une concentration de 30 à 50% (p/w). On peut accroître l'efficacité de la fusion en y incorporant de la lectine, de la poly-L-lysine, du diméthylsulfoxyde, etc.
15

On peut procéder à la fusion, par exemple, de la même manière qu'il est dit dans l'article de Kohler et coll. (Nature, 256, 495 (1975) dans lequel on fusionne des cellules de souris pour obtenir un hybridome produisant un anticorps monoclonal de souris. Par exemple, on mélange les lymphocytes B humains sensibilisés et les cellules de myélome déficientes en HGPRT dans une proportion de 10-1 : 1, on y ajoute en plusieurs fois du PEG 3000 à raison de 30 à 50% (p/v) en 0,5 à 1 minute, et on laisse reposer le mélange résultant pendant 1 à 10 minutes. Au mélange résultant, on ajoute en 5 à 10 minutes 50 ml d'un milieu de culture ne contenant pas de sérum, et on ajoute encore du milieu de culture pour obtenir une concentration cellulaire de 10^5 à 10^6 /ml. On inocule la suspension cellulaire ainsi obtenue dans
20
25
30

08900085

une microplaque à 96 puits à raison de 2×10^4 à 2×10^5 cellules par puits. Le jour suivant, on en remplace la moitié par un milieu contenant de l'hypoxanthine, aminoptérine-thymidine (milieu HAT) ou 5 un milieu contenant de l'hypoxanthine-azasérine (milieu HAz) et on effectue la culture à une température de 32 à 37°C sous CO₂ à 5% pendant environ 2 à 3 semaines pendant les- quelles on remplace le milieu de culture par un milieu HAT pendant environ 10 à 20 jours puis par un milieu 10 contenant de l'hypoxanthine-thymidine (milieu HT) pendant environ 3 à 5 jours, à raison de la moitié, à des intervalles de 3 jours pour obtenir une colonie proliférative, c'est-à-dire des hybridomes. Il est également possible de choisir un hybridome par l'utilisation combinée 15 d'inhibiteurs du métabolisme sans utiliser un mutant déficient en HGPRT. On mesure le titre d'anticorps du milieu de culture de l'hybridome par la technique ELISA comme mentionné ci-dessus, on choisit la lignée cellulaire produisant l'anticorps spécifique ayant 20 la spécificité de réaction ci-dessus, et on confirme la spécificité envers le polysaccharide par la technique du Western blot. On répète le clonage deux ou trois fois par le procédé de dilution limitante ou 25 le procédé à l'agarose pour obtenir une lignée cellulaire stable ayant une grande vitesse de prolifération et une productivité d'anticorps spécifique élevée.

Dans le premier procédé tel qu'expliqué ci-dessus, on peut utiliser des cellules transformées 30 par le virus EB au lieu de lymphocytes B humains sensibilisés.

On peut faire proliférer de façon continue les lignées cellulaires telles qu'établies à partir de lymphocytes B humains sensibilisés selon le procédé de transformation au virus EB ou le procédé de fusion cellulaire (hybridomes) et leur faire produire en grande quantité et de façon stable l'anticorps spécifique.

5 Etape (3) : -

On fait incuber les cellules transformées ainsi établies ou les hybridomes ($0,5 - 5 \times 10^5$ cellules/ml) à l'état stationnaire ou avec rotation dans un milieu de culture habituel pour cellules animales dans un récipient tel qu'un ballon ou une plaque d'incubation par utilisation d'un incubateur à CO_2 à $32 - 37^\circ\text{C}$ sous CO_2 à $2 - 10\%$. En particulier lorsqu'on fait l'incubation à grande échelle, on peut utiliser une cuve de fermentation, un système de fibres creuses, ou similaire, conçu pour les cellules animales. Le milieu de culture habituel peut être, par exemple, un milieu contenant de 2 à 20% de sérum de fœtus de bovin, de veau, de vache, de cheval, humain ou similaire p. ex. RPMI 1640, MEM d'Eagle), un milieu dépourvu de sérum contenant les composants sous forme de traces nécessaires pour la prolifération des cellules (p. ex. l'insuline, la tranferrine, l'éthanolamine, la sélénite, l'albumine bovine des lipides), etc.

10 Etape (4) : -

La purification de l'anticorps peut s'effectuer par des procédés biochimiques classiques (p. ex. fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium, fractionnement par précipitation à l'éthanol, fractionnement par PEG, chromatographie d'échange d'ions, filtration sur gel, chromatographie d'affinité)

08900085

té, chromatographie en phase liquide à grande vitesse, électrophorèse). Dans le procédé de purification, il faut prendre garde d'empêcher la production d'agglutination ou la dépression de l'activité d'anticorps. A 5 cet effet, on peut ajouter de la sérum albumine humaine (HSA) en une quantité de 0,05 à 2%. On peut quelquefois préférer l'addition d'acides aminés comme la glycine ou l'alpha-alanine, en particulier d'acides aminés basiques comme la lysine, l'arginine ou l'histidine, les saccharides comme le glucose ou le mannitol, 10 les sels, comme le chlorure de sodium, etc. Une agglutination tend à se produire, en particulier dans le cas d'un anticorps IgM, et le traitement avec la bêta-propiolactone, l'anhydride acétique, ou similaire est efficace dans la prévention d'une telle agglutination. 15 Dans ce cas, une administration intraveineuse est rendue possible.

Etape (5) : -

On peut formuler l'anticorps monoclonal purifié en une préparation biologique par un procédé connu soi 20 dans lequel, par exemple, on filtre à travers un filtre à membrane pour enlever les bactéries, on verse dans des flacons stérilisés avec un stabilisateur et on lyophilise.

La préparation d'anticorps monoclonal humain 25 peut ne comprendre qu'un seul type d'anticorps monoclonal humain contre le LPS de P. aeruginosa pour son utilisation comme agent préventif ou thérapeutique contre les infections à P. aeruginosa. De préférence, la 30 préparation comprend en outre au moins un type d'anti-

corps monoclonal humain qui peut reconnaître un déterminant antigénique différent dans la structure moléculaire du LPS de P.aeruginosa et/ou au moins un type d'antic.prs humain classique qui peut reconnaître les exotoxines, les exoenzymes (p. ex. élastase, protéase), les protéines d'enveloppe ou les endotoxines. La préparation peut également comprendre n'importe quel anticorps humain contre les bactéries autres que P. aeruginosa, les virus, les champignons, les protozoaires, les cellules cancéreuses, etc. En outre, l'anticorps monoclonal humain de l'invention peut être incorporé dans une préparation d'immunoglobuline humaine classique pour constituer une préparation d'immunoglobuline à titre élevé contre le LPS.

L'anticorps monoclonal humain de l'invention appartient surtout à la classe IgG ou IgM, mais n'y est pas limité. L'anticorps monoclonal humain a une propriété de liaison avec P. aeruginosa de deux ou plusieurs catégories de sérotypes, présente une activité bactéricide en présence d'un complément et a une activité d'accélération de la phagocytose de P. aeruginosa par les neutrophiles et les macrophages (opsonisation). On peut traiter les infections expérimentales de la souris avec des P. aeruginosa de deux ou plusieurs catégories de sérotypes par administration d'un seul anticorps monoclonal humain de l'invention.

L'anticorps monoclonal humain de l'invention a une propriété de liaison spécifique avec les corps bactériens de P. aeruginosa IID1001 (ATCC 27577), IID 1006 (ATCC 27582), IID1020 et IID 1015 parmi les souches

de référence pour la classification des sérotypes de P. aeruginosa. En outre, il a une propriété de liaison au lipide A des bactéries Gram-négatives et il permet de neutraliser une activité biologique comme l'activité léthale ou la réaction de Schwartzman.

L'anticorps monoclonal humain peut aussi se lier avec les liposaccharides provenant de E. coli mutant Rc J5 (ATCC 39355) S. minnesota type rugueux mutants Rc, Rd et Re et P. aeruginosa IID1001 (ATCC 27577) mais non à ceux qui proviennent d'E. coli souche de type lisse 0-11 : B4, S. minnesota souche type sauvage lisse, mutant type rugueux Ra et Rb et P. aeruginosa IID1002 (ATCC 27578) et PA 103.

Tel que compris d'après ce qui précède, l'anticorps monoclonal humain de l'invention diffère de l'anticorps monoclonal connu spécifique de sérotype et de l'anticorps monoclonal connu à réaction croisée de sous-groupe sérotypique. Comme il peut être lié à P. aeruginosa de deux ou plusieurs sérotypes différents, on peut couvrir P. aeruginosa de tous les sérotypes ou presque tous les sérotypes par un plus petit nombre d'anticorps monoclonaux y compris celui-ci. L'anticorps monoclonal humain de l'invention est donc très intéressant du point de vue de la prévention et du traitement des infections à P. aeruginosa. En outre, il est utile pour la prévention et le traitement du choc endotoxinique, pour lequel on ne dispose pas actuellement d'agents efficaces.

Les déterminants antigéniques reconnus par l'anticorps monoclonal humain de l'invention sont le site du lipide A et le site polysaccharidique du LPS.

Le site polysaccharidique à reconnaître est limité à celui que l'on trouve dans certaines souches sérotypes, à savoir les types A,F,G et M. On suppose donc que la structure commune au site du lipide A et au site polysaccharidique peut être présente.

5 Pour la prévention et le traitement, notamment chez l'homme des malades infectieux à P. aeruginosa, des infections mixtes avec des bactéries contenant P. aeruginosa et du choc endotoxique dû à des bactéries Gram-négatives, on peut administrer une préparation d'immunoglobuline humaine contenant l'anticorps monoclonal humain à un malade adulte à raison : d'environ 1 à 10 g à chaque fois en cas de symptôme grave ou à raison d'environ 0,2 à 5 g à chaque fois dans 15 en cas de symptôme bénin ou dans un but de prévention. La teneur en anticorps monoclonal humain de l'invention dans la préparation d'immunoglobuline humaine est généralement d'environ 0,5 à 500 mg, de préférence environ 5 à 50 mg.

20 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps monoclonal humain tel que défini ci-dessus comme ingrédient actif dans la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou à traiter les infections bactériennes provoquées par P. aeruginosa et de façon générale par des bactéries Gram-négatives, y compris le choc endotoxique.

25 Comme il est dit ci-dessus, l'anticorps monoclonal humain de l'invention a un titre d'anticorps élevé contre son antigène et présente un excellent effet thérapeutique dans le système des infections expérimentales de la souris. Comme il s'agit d'une protéine d'origine humaine, aucun effet secondaire (p. ex. anaphylaxie) tel qu'on en observe après administration d'une protéine hétérologue n'est produit. Comme l'anti-

corps est produit à partir d'une lignée cellulaire spécifique, la possibilité de contamination par des corps biologiquement dangereux inconnus est bien moins par comparaison avec les immunoglobulines classiques produits à partir de sang humain provenant de nombreuses personnes inconnues.

L'anticorps monoclonal humain de l'invention est produit avec un haut titre d'anticorps in vitro de façon stable en grande quantité, et son procédé de production est plus intéressant que les procédés de production classiques utilisant le sang humain avec un contrôle de qualité facile.

L'invention sera expliquée en détail ci-dessous à l'aide d'exemples, mais il faut comprendre que l'invention ne se limite pas à ces exemples.

Exemple 1
Établissement de lignées cellulaires productrices d'anticorps monoclonal humain par le procédé de transformation du virus EB :

20 (1) Préparation de la solution de virus EB et mesure de son titre viral

On met en suspension des cellules B95-8 de marmoset produisant et libérant le virus EB dans un milieu RPM11640 contenant 10 % de sérum de foetus de veau (FCS) à raison de $6,5 \times 10^5$ cellules/ml et on fait incuber à l'état stationnaire dans un ballon de culture T-75 (Corning=25110) à 37°C sous atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 4 jours. On recueille le surnageant de culture et on le soumet à une centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse basse vitesse (RS-20HB; Tommy Precision Ind. Co. Ltd.) à 2000 tpm pendant 10 minutes. On filtre le surnageant à travers un filtre à membrane de 0,45 μ (Millipore SLHA 0250S). On met le filtrat dans des tubes à sérum (MS-4505 ; Sumitomo Bakelite Co., _____)

Ltd.) et on le conserve à -80°C. Lors de l'utilisation, on dilue le contenu de façon appropriée et on l'utilise pour l'expérience de transformation des lymphocytes humains avec le virus EB.

On détermine le titre viral de la solution de virus EB selon le procédé de Moss et coll. (J. General Virology, 17, 233 (1972)) en utilisant des lymphocytes de sang périphérique humain (PBL) comme cellules inducatrices. Autrement dit, on met une suspension de lymphocytes du sang périphérique humain (10^6 cellules/ml) dans du milieu RPMI 1640 contenant 15% de FCS dans une microplaqué à 96 trous. (Sumitomo Bakelite) à raison de 100 µl par trou. A chaque trou, on ajoute la solution de virus EB (20 µl) dans des dilutions en série au dixième (dans un intervalle de 10^0 à 10^7) avec le milieu ci-dessus, et on conduit l'incubation à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. On renouvelle le tiers du volume du milieu tous les 3 jours, et au bout de 3 semaines, on examine la présence des cellules transformées au microscope optique. On procède à l'examen sur 6 trous par dilution, et on détermine la vitesse de transformation. On détermine de façon stochastique la dilution la plus élevée requise pour la transformation de 50% des cellules à partir de la vitesse de transformation à chaque dilution selon la méthode de Reed et Muench; on calcule la quantité de virus et on la prend comme LTD₅₀, d'après quoi on recalcule la quantité de virus dans l'échantillon d'origine et on la désigne par le nombre de TD₅₀. On obtient ainsi la solution de virus EB ayant une quantité de virus de 10^5 à 10^7 TD₅₀/ml.

(2) mesure du titre d'anticorps anti-P. aeruginosaselon le procédé ELISA

On mesure le titre d'anticorps contre l'antigène de surface de P. aeruginosa comme suit. On met en suspension P. aeruginosa dans une solution de tampon phosphaté (pH 7,2) comprenant NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l), NaHPO₄.12 H₂O (2,99 g/l et KH₂PO₄ (0,2 g/l) (PBS) pour obtenir une absorbance de 0,2 à une longueur d'onde de 600 nm. On met la suspension dans des microplaques à 96 puits (Falcon =3912) à raison de 50 µl par puits, puis on centrifuge à 200 tpm pendant 15 minutes. On ajoute du glutaraldéhyde à 2% à chaque puits à raison de 50 µl par puits pour fixer le corps bactérien aux microplaques. Après enlèvement de la solution bactérienne des microplaques, on introduit dans la microplaquette une solution de PBS à 3% contenant de la sérum albumine bovine (BSA) à raison de 120 µl par puits et on fait incuber à 37°C pendant 30 minutes pour bloquer les parties non liées de la plaque d'essai. On utilise la microplaquette résultante comme plaque revêtue d'antigènes dans l'opération ultérieure. Si on le désire, on peut effectuer le stockage de cette microplaquette à -20°C.

Avant le dosage, on lave la microplaquette trois fois avec une solution de PBS contenant 0,05% de Tween 20 (PBST). On introduit du PBST contenant 1% de BSA dans les puits à raison de 50 µl par puits, et on y ajoute un échantillon (sérum, fluide ascitique ou surnageant de culture) éventuellement dilué avec PBST contenant 1% de BSA, à raison de 50 µl par puits, puis on fait incuber à 37°C pendant 2 heures. On enlève l'échantillon de la plaque, que l'on

lave3 fois avec du PBST. On ajoute à la microplaqué un anticorps anti-immunoglobine humaine marqué à la phosphatase, purifiée par chromatographie d'affinité (Kirkegaard & Perry Lab. Inc.) (second anticorps) dilué de 500 à 1000 fois avec une solution de PBS contenant 1% de BSA à raison de 100 µl par puits pour incubation à 37°C pendant 2 heures. Pour mesurer le titre d'anticorps IgG et le titre d'anticorps IgM, on emploie respectivement un anticorps anti-IgG humaine marqué à la phosphatase et un anticorps marqué à la phosphatase. Après enlèvement du second anticorps, on lave 3 fois la microplaqué avec du PBST, et on ajoute une solution de substrat, c'est-à-dire une solution aqueuse contenant du sel disodique de l'acide p-nitrophénylphosphorique (3 mg) dans du tampon de diéthanolamine à 10% (pH 9,1 ; 1 ml) contenant NaN₃ (0,2 mg/ml) et MgCl₂.6H₂O (0,1 mg/ml) à la microplaqué, à raison de 100 µl par puits, puis on effectue la réaction à 37°C. Au bout de 45 minutes, on ajoute NaOH 3N à raison de 20 µl par puits pour arrêter la réaction. On mesure l'activité de liaison de l'anticorps (OD₄₀₅) sur Multiskan® (Titertek).

(3) Préparation de lymphocytes à partir de sang périphérique humain

On recueille du sang périphérique humain (100 ml) présentant un titre élevé d'anticorps contre P. aeruginosa de plusieurs sérotypes. On met du milieu Mono-Poly Resolving Medium® (15 ml ; Flow Lab.) dans un tube de centrifugation (volume 50 ml ; Sumitomo Bakelite), et on y verse lentement le sang

péphérique humain ci-dessus (20 ml), puis on procède à une centrifugation avec une centrifugeuse basse vitesse (Bs-20HB, Tommy Precision Ind.) à 2500 tpm (Roter-TS-7) et à la température ambiante pendant 15 minutes, ce qui sépare les hématies et les lymphocytes. On recueille la fraction contenant les lymphocytes et on la lave avec du milieu RPMI 1640 contenant 10% de FCS (appelé ci-dessous "milieu") deux fois, puis on calcule le nombre de cellules pour obtenir $1,2 \times 10^8$ lymphocytes.

10

(4) Etablissement de lignées cellulaires productrices d'anticorps anti-LPS de P. aeruginosa selon la méthode de transformation du virus EB

15 On met en suspension des lymphocytes du sang péphérique humain (2×10^7) dans le milieu (2 ml), et on y ajoute la solution de virus EB (10 ml ; quantité de virus, 10^7 TD₅₀/ml), puis on effectue une incubation à 37°C en atmosphère à 5% de CO₂ pendant 2 heures.

20 On met en suspension les lymphocytes humains infectés par le virus EB dans du milieu essentiel minimum d'Eagle modifié par Dulbecco (appelé ci-dessous "milieu d'établissement de la lignée cellulaire") comprenant 15% de FCS, 10% de milieu de culture tissulaire NCTC 109, de la pénicilline (100 UI/ml) de la streptomycine (100 µg/ml), de l'arginine (0,2 mg/ml), de l'acide oxaloacétique (0,15 mg/ml), du pyruvate de sodium (0,05 mg/ml) et de l'insuline bovine (0,2 U/ml) pour obtenir une concentration d'environ 2×10^5 cellules/ml, et on répartit la suspension dans une plaque de culture à 24 trous préalablement chargée de cel-

5 lules péritonéales de souris en suspension (environ
1 x 10⁵ cellules/puits , à raison de 0,5 ml/
puits. On cultive les lymphocytes à 37°C en . at-
mosphère à 100% d'humidité et 5% de CO₂ et on remplace
la moitié du milieu par du milieu d'établissement de la li-
gnee cellulaire frais tous les 3 jours en commençant
une semaine après le début de l'incubation. Au bout
d'un mois environ, on recueille les cellules et on les
utilise pour la fusion cellulaire.

10 (5) Fusion cellulaire avec les cellules trans-
formées par le virus EB

15 On effectue une sous-culture de cellules de
myélome de souris BALB/C provenant d'une lignée
MOPC-21 et déficientes en HGPRT (P3X63-Ag8.653 ;
ATCC CRL 1580) dans le milieu d'établissement de la lignée
cellulaire, on prélève et on lave 1 x 10⁷ cellules 3 fois
avec du milieu essentiel minimum d'Eagle. On
lave les cellules transformées par le virus EB (2 x
10⁷ cellules) obtenues en (4) 3 fois avec du milieu essen-
tiel minimum d'Eagle, on mélange avec des cellules de
myélome (1 x 10⁷) dans un tube à centrifugation
(Corning =25330) et on les soumet à une centrifuga-
tion à 400 g pendant 7 minutes. Au précipité résul-
tant on ajoute du PEG 4000 (1 ml ; solution de PBS
à 45%, Merck) en 1 minute tout en faisant tourner le
tube à centrifugation et en agitant avec une pipette,
puis on laisse reposer à la température ambiante pen-
dant 1 minute. On ajoute du milieu essentiel mini-
mum d'Eagle (9 ml) en 5 minutes aux fins de dilution
30 et on maintient la dilution résultante à 37°C pen-
dant 1 heure. On met en suspension le précipité après

centrifugation dans le milieu d'établissement de la lignée cellulaire (100 ml) et on verse dans des plaques à 96 puits (Falcon =3040) à raison de 1×10^4 cellules de myélome par puits. Simultanément, on ajoute des cellules spléniques de souris BALB/C comme couche d'alimentation à raison de 3×10^4 cellules par réservoir puis on effectue une incubation à 37°C en atmosphère à 5% de CO₂. Ensuite, tous les deux ou trois jours, on remplace la moitié du volume du milieu par un milieu de sélection. Après la fusion cellulaire pendant environ 2 semaines, on soumet les surnageants des puits dans lesquels on a observé une prolifération à un examen de la production des anticorps contre P. aeruginosa de différents sérotypes par la méthode ELISA. On sélectionne les cellules fusionnées (hybridomes) dans les puits présentant un titre relativement élevé d'anticorps et on les soumet à une culture plus poussée tout en clonant par le procédé de dilution limitante. Au bout d'environ 2 semaines, la présence d'anticorps contre le déterminant antigénique commun se liant à P. aeruginosa de plusieurs sérotypes est confirmée par méthode ELISA sur le surnageant de culture du clone. On soumet le clone à une culture à plus grande échelle en utilisant une plaque de culture à 24 puits (MS-30240 ; Sumitomo Bakelite), un ballon de culture T-25 (=25100 ; Corning) et un ballon de culture T-75 (=25110 ; Corning). Ce clone est appelé 'Hybridome FKF-1F3" et est déposé sous le numéro FERM P-9784 au Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology situé à Tsukuba, Ibaraki-ken,

Japon. L'anticorps monoclonal humain FKF-1F3 est une IgM (μ , k).

Exemple 2 :

Analyse de l'antigène reconnu par l'anticorps

5 FKF-1F3 :

(1) Préparation de LPS de *P. aeruginosa*

On prépare le LPS *P. aeruginosa*

de la même manière que dans le procédé de Westphal et coll. ("Methods in Carbohydrate Chemistry", Academic Press, N.Y., Vol. 5, pages 83 à 91 (1965)). Autrement dit, on traite le corps bactérien humide (4 g) avec du phénol à 45% chauffé à 65 - 68°C, on refroidit en-dessous de 10°C et on soumet à une centrifugation à 3000 tpm pendant 15 minutes, ce qui extrait le LPS vers la couche aqueuse. On dialyse la couche aqueuse contre de l'eau pour éliminer le phénol et on concentre à pression réduite pour former des micelles de LPS que l'on soumet à une ultra-centrifugation pour récupérer le LPS. On obtient

20 à chaque fois 2 mg de LPS de souche standard Type A IID1001, de souche type E PA103 et de souche standard type G IID1020. Le corps bactérien de *P. aeruginosa* utilisé provenait de la Collection l'Institut de Recherche en Sciences Médicales de l'Université de Tokyo, au Japon. On le trouve également à l'American 25 Type Culture Collection (ATCC) aux Etats Unis.

(2) Analyse de l'antigène par la méthode

Western blot.

30 On soumet le LPS de types A et E de *P. aeruginosa* à une électrophorèse sur gel d'acide désoxycholique (DOC)/polyacrylamide selon le procédé

de Komuro et coll. (Résumé des rapports du 33° colloque sur les toxines à Osaka, pages 94 à 99 (1986)), et on plonge le gel dans un tampon de transfert (tris 25 mM-glycine 192 mM, pH 8,3, méthanol à 20% (v/v)) à 4°C pendant la nuit et on transfère sur une membrane Durapore® (Millipore) à la température ambiante, puis on fait incuber avec un tampon PBS contenant 2% de caséine à la température ambiante pendant 1 heure pour obtenir un blocage. En outre, on effectue une incubation avec une solution à 0,1% de BSA et une solution de TBS contenant du FCS à 10% à la température ambiante pendant 1 heure. Sur la membrane Durapore bloquante résultante, on fait incuber des solutions aqueuses du surnageant de culture FKF-1F3 et de l'anticorps monoclonal humain HI-006 (IgM) reconnaissant spécifiquement l'antigène O d type E comme témoin à 37°C pendant 1 heure puis à 4°C pendant la nuit. On lave la membrane de Durapore avec une solution de TBS contenant 0,05% de Tween 20 (pH 8,0) 5 fois et on fait incuber avec le second anticorps (anticorps anti-immunoglobine humaine marqué à la peroxydase, dilué avec 1% de BSA et du PBS contenant 0,05% de Tween 20 au 3000°) à 37°C pendant 1 heure. De même, on procède à un lavage avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20 (pH 8,0) cinq fois, et on effectue une coloration avec un agent colorant (PBS contenant 0,5 mg/ml de chloronaphthol, 20% de méthanol et 0,08% d'H₂O₂ : pH 7,5). À la suite de cela, on reconnaît un groupe de bandes colorées en échelle du à la réaction avec l'anticorps FKF-1F3 sur le parcours d'électrophorèse de P. aeruginosa type LPS, tandis qu'il ne se produit pas de réac-

tion sur le parcours d'électrophorèse de P. aeruginosa type E LPS. Dans le cas de HI-006, comme témoin, les bandes en échelle sont reconnues sur le parcours d'électrophorèse de type E LPS, mais on n'observe pas de coloration sur un quelconque autre parcours.

5

Exemple 3

Etude du spectre de liaison de l'anticorps FKF-1F3 par la méthode ELISA :

10

(1) Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 aux souches sérotypiques de référence de P. aeruginosa

15

De la même manière que dans l'exemple 1 (2), on examine la propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 aux souches sérotypiques de P. aeruginosa selon la méthode ELISA, dont les résultats sont présentés au tableau 2. Les souches utilisées proviennent de la Collection de l'Institut de Recherche en Sciences Médicales de l'Université de Tokyo, au Japon, et cultivées dans un milieu gélose d'infusion cœur ou un milieu de bouillon d'infusion cœur.

08900085

Tableau 2 : Activité de liaison de l'anticorps
 FKF-1F3 aux souches sérotypiques de réfé-
 rence . de P. aeruginosa selon
 la classification de la Commission
 Japonaise

5

10

15

Sérotype	Souche	Activité de liaison (OD ₄₀₅)*
A	IID 1001	0,6
B	IID 1002	0
B	IID 1007	0
B	IID 1013	0
B	IID 5004	0
C	IID 1021	0
D	IID 1004	0
E	IID 1130	0
F	IID 1006	0,4
G	IID 1020	0,4
H	IID 1009	0
I	IID 1010	0
J	IID 1011	0
K	IID 1012	0
L	IID 5141	0
M	IID 5018	0,1
M	IID 1015	0,3

Note : *) Absorption après coloration selon la métho-
 de ELISA (45 minutes).

20

On révèle ainsi que l'anticorps FKF-1F3 a une propriété de liaison spécifique avec les types A,F,G et M.

(2) Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 aux souches cliniquement isolées

25

On examine la propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 sur les types A et G qui sont cliniquement isolés avec une fréquence élevée. Pour l'examen on utilise 19 isolats cliniques de type A et 19 iso-

isolats cliniques de type G. Comme résultat, l'anticorps se lie à 14 isolats cliniques de type A (74%) et à 10 isolats cliniques de type G (53%) comme on le voit dans les tableaux 3 et 4.

5

Tableau 3 : Activité de liaison de l'anticorps FKF-1F3 à 19 isolats cliniques de sérotype A

10

15

20

Souche	Activité de liaison(OD ₄₀₅) *
SP6745	0,8
SP6746	1,6
SP6783	1,2
SP6818	2,5
SP6830	0,6
SP6840	2,4
SP6708a	1,2
SP9710	2,0
SP9711	1,6
SP9731	0,1
SP9762	0,1
SP9763	0,1
SP9768	1,6
SP9780	2,1
SP10029	1,4
SP10040	0,2
SP10060	0,6
SP10618	1,7
SP10676	0,2

Note : *) Absorption après coloration selon la méthode ELISA (au bout de 45 minutes).

Tableau 4 : Activité de liaison de l'anticorps
FKF-1F3 à 19 isolats cliniques de
sérotype G

	Souche	Activité de liaison(OD ₄₀₅)*
5	SP9704	1,7
	SP9709	1,6
	SP9712	0,1
	SP9714	1,4
	SP9717	0
	SP9718	0,8
10	SP9738	0,7
	SP9785	1,1
	SP9743	1,8
	SP9792	0,1
	SP9755	0,1
	SP9761	0
	SP9767	1,3
	SP9772	0
15	GN11187	0
	TL2378	1,7
	TL2424	0
	SP6788	1,3
	SP9728a	0,3

Note *) : Absorption après coloration selon la méthode
de ELISA (au bout de 45 minutes)

On examine également l'activité de liaison de l'anticorps FKF-1F3 avec les isolats de P. aeruginosa séro-type M provoquant des infections broncho-œsophagiennes chroniques fréquentes. Les résultats sont présentés au tableau 5, d'après lequel on voit que l'activité de liaison dépend largement de l'origine des souches et que ledit anticorps est lié aux souches testées à raison de 10 à 99%.

Tableau 5 : Activité de liaison de l'anticorps
FKF-1F3 aux isolats cliniques de
sérotype M.

	Souche	Lieu et/ou année d'isolement	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
5	SP9716	Tokyo 1984	0,1
	SP9730		0,1
	SP9744		0,1
	SP9748		0,4
	SP9749		0,1
	SP9752		0,1
	SP9775		0
	SP10067		1,1
	SP10675		0,1
10	SP6763	Kyoto 1984	1,0
	SP6764		0,9
	SP6765		0,9
	SP6782		1,2
	SP6794		1,0
	GN6833		0,6
	TL6852		1,1
	TL6890		0,1
	SP6892		1,1
	SP6895		0,8
15	SP6908		0,8

Note *) Absorption après coloration selon la méthode
ELISA (au bout de 15 minutes)

20

Exemple 4

Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 avec

E. coli J5 :

25

DE la même manière que dans l'exemple 1 (2),
on examine l'activité de liaison de l'anticorps FKF-
1F3 avec E.coli type Rc mutant J5 (ATCC 39355) selon
la méthode ELISA. On fait incuber la souche J5 dans

un milieu gélosé d'infusion de cœur. Les résultats sont présentés au tableau 6, d'après lequel on comprend que l'anticorps FKF-1F3 se lie avec P.aeruginosa IID 1001 (sérotype A) comme témoin positif et faiblement avec E. coli J5.

5

Tableau 6

Souche	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
<u>E. coli</u> J5	0,3
<u>P. aeruginosa</u> IID 1001	0,6
(-)	0

10

Exemple 5

Etude de la spécificité de liaison par un système compétitif :

15

Comme il se confirme que l'anticorps FKF-1F3 est lié aux corps bactériens : P. aeruginosa IID 1001 (sérotype A) et P. aeruginosa IID 1002 (sérotype B) on examine la spécificité de liaison par un système compétitif, c'est à dire de la même manière que dans l'exemple 1 (2) par la méthode ELISA en utilisant une plaque bactérienne. Comme substance compétitive, on utilise du LPS (à chaque fois 50 µg/ml) de P. aeruginosa IID 1001 (sérotype A), P. aeruginosa IID 1002 (sérotype B), P. aeruginosa 103 (sérotype E), P. aeruginosa IID 1020 (sérotype G), E. coli O-111 B4 et J5. Les résultats sont présentés au tableau 7.

20

25

Tableau 7

Plaque antigénique	Origine de la substance compétitive (LPS)	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
Souche PA IID1001	PA IID 1001 PA IID 1002 PA PA 103 PA IID 1020 EC 0-111:B4 EC J5 (-)	0,6 2,4 2,4 1,9 2,5 2,1 2,3
Souche PA IID1020	PA IID 1001 PA IID 1002 PA PA 103 PA IID 1020 EC 0-111:B4 EC J5 (-)	0,2 1,0 0,9 0,7 1,0 0,8 0,9

Dans les plaques de corps bactérien de *P. aeruginosa* IID 1001 et IID 1020, le LPS provenant de IID 1001 inhibe fortement la liaison de l'anticorps FKF-1F3, et le LPS provenant de IID 1020 présente une faible activité d'inhibition. D'autres LPS ne présentent pas d'activité, ou seulement une activité très faible.

Exemple 6 :
 Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 au LPS provenant de *P.aeruginosa* :
 On dissout du LPS provenant de *P. aeruginosa* (1 µg/ml, de la phosphatidylcholine (5 µg/ml), du cholestérol (2,5 µg/ml) dans l'éthanol et on répartit solution résultante dans une plaque à 96 puits

à raison de 10 µl par puits, puis on laisse reposer à 37°C pendant 2 heures pour sécher. On ajoute une solution de BSA-PBS à 3% (100 µl), suivi par une réaction à la température ambiante pendant 2 heures aux fins de saturation pour obtenir une plaque d'antigène utilisant le LPS comme antigène (Kannagi et coll. : "Application of Immunological Methods in Biomedical Science", Blackwell Scientific, Oxford, pages 117.1 - 117.20 (1986)).

On effectue le test ELISA de la même manière que dans l'exemple 1(2) en utilisant du PBS à 0,5% de BSA au lieu de PBST. Les résultats sont présentés au tableau 8.

Tableau 8

Origine du LPS	Sérotype	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
P. aeruginosa A IID 1001	A	0,7
P. aeruginosa A IID 1002	B	0,1
P. aeruginosa PAO 1822	B	0,1
P. aeruginosa PA 103	E	0,2
P. aeruginosa IID 1020	G	0,3

L'anticorps FKF-1F3 est lié fortement à LPS provenant de P. aeruginosa IID 1001 (sérotype A) et faiblement à LPS provenant de P. aeruginosa IID 1020 (sérotype G).

Exemple 7

Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 avec le LPS et avec le lipide A provenant d'une Salmonella :

On examine la propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 avec une série de LPS provenant de

5 Salmonella minnesota par la réaction compétitive selon la méthode ELISA. On mélange l'anticorps FKF-1F3 avec du LPS provenant de S. minnesota et du lipide A (nécessaire de LPS très purifié ; List Biological Laboratories, Inc.) comme substances compétitives à des concentrations de 2,5 µM et 25 µM, suivi par une incubation à 37°C pendant 1 heure. On effectue le test ELISA en utilisant une plaque à 96 puits fixant les bactéries P. aeruginosa IID 1001 aux fins de mesure du taux d'inhibition. Les résultats sont présentés au tableau 9, d'où l'on comprend que l'anticorps FKF-1F3 a une forte propriété de liaison avec le lipide A et le LPS (Rc, Rd, et Re type rugueux).

10

Tableau 9

Chémotype de LPS	Activité de liaison (OD ₄₀₅)	
	0,25 µM	25 µM
LPS type sauvage	0,24	0,29
Ra	0,27	0,25
Rb	0,24	0,22
Rc	0,22	0,07
Rd	0,17	0,04
Re	0,03	0
Lipide A (-)	0,12 0,26	0,02 0,26

25 Note : l'activité de liaison indique l'activité après déduction de la valeur pour l'essai à blanc (0,14).

Exemple 8

Propriété de liaison du FKF-1F3 au lipide A des bactéries Gram-négatives :

On effectue des recherches en utilisant du li-

pide A provenant d'E. coli, du lipide A provenant de S. typhimurium re-mutant (Ribi Immunochem. Research Inc., Hamilton, MT) et du lipide A provenant de S. minnesota R595 (List Biological Laboratories Inc.)

5 de la même manière que dans l'exemple 7 selon la méthode ELISA. On prépare le LPS et le lipide A provenant de P. aeruginosa IID 1001 comme suit : selon le procédé de Westphal et coll., on traite la fraction soluble dans l'eau obtenue par extraction avec du phénol chaud à 45% avec du bromure de cétylméthylammonium ("Cetavlon" ; Nakarai Chemical) aux fins d'élimination des acides nucléiques, et on utilise le précipité à l'éthanol comme spécimen de LPS (Methods Carbohydr. Chem., 5, 83-91 (1965)) ; on hydrolyse le LPS avec de l'acide acétique à 1% à 100°C pendant 90 minutes, et on utilise l'extrait au chloroforme comme spécimen de lipide A (Eur. J. Biochem. 52, 331 - 343 (1975)).

10

15

20

25

De la même manière que dans l'exemple 7, on effectue le test ELISA en utilisant une plaque revêtue de lipide A provenant de S. minnesota R595 et en utilisant le lipide A comme substance compétitive (50 µg/ml). Les résultats sont présentés au tableau 10, d'où on comprend que l'anticorps FKF-1F3 a une propriété de liaison avec le lipide A provenant de diverses bactéries Gram-négatives.

Tableau 10

Lipide A	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
<u>P. aeruginosa</u> IID 1001	0,25
<u>E. coli</u> J5	0,18
<u>S. typhimurium</u> Re mutant	0,16
<u>S. minnesota</u> R595	0,18
(-)	1,07

Exemple 9

Activité de liaison de l'anticorps FKF-1F3 avec le LPS provenant de P. aeruginosa :

On compare la propriété de liaison avec le LPS provenant de P. aeruginosa IID 101 à celle avec le LPS d'E. coli et de S. minnesota. On effectue le test ELISA de la même manière que dans l'exemple 8 en utilisant une plaque revêtue du lipide A de S. minnesota R595 et en utilisant du LPS intact et du lipide A provenant de P. aeruginosa IID 1001. (Cf exemple 8) et de LPS type lisse et de lipide A provenant d'E. coli et de S. minnesota comme substances compétitives (50 µg/ml). Les résultats sont présentés au tableau 11, d'où l'on comprend que l'anticorps peut être lié au lipide A provenant de n'importe quel microorganisme et au LPS de type lisse provenant seulement de P. aeruginosa. La raison pour laquelle on n'observe pas de propriété de liaison avec le LPS de type lisse est probablement due à la formation de micelles avec le LPS en solution aqueuse, ce qui fait que la fraction lipide A n'est pas exposée à l'empêchement stérique de la fraction polysaccharidique. Dans le cas de P. aeruginosa, n'importe quel site de liaison d'anticorps peut être présent outre le lipide A.

25 Tableau 11

Substance compétitive	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
P. aeruginosa IID 1001 LPS	0,16
P. aeruginosa IID 1001 Lipide A	0,24
E. coli O111: B4 LPS	1,02
E. coli J5 LPS	0,18
S. minnesotatype sauvage LPS	1,07
S. minnesota R595 Lipide A	0,20
(-)	1,12

Exemple 10

Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3

à la chitine :

Antérieurement, Teng et coll. ont réussi à préparer un anticorps monoclonal humain (IgM) contre le LPS d'E. coli J5 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82, 1790 - 1794 (1985)). Dans leur article, il est indiqué que l'anticorps a une propriété de liaison à la chitine (homopolymère de N-acétylglucosamine).

Dans cet exemple, on effectue les recherches sur la propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3

chitine selon la méthode ELISA en utilisant une plaque revêtue de lipide A provenant de S. minnesota R595 et en utilisant de la poudre de chitine provenant de carapace de crabe (Nakarai Chemical) comme substance compétitive de la même manière que dans l'exemple 8. Les résultats sont présentés au tableau 12, d'où l'on comprend que l'on n'observe pas de réaction croisée entre l'anticorps FKF-1F3 et la chitine. Ainsi, l'anticorps FKF-1F3 diffère de l'anticorps humain anti-LPS de E. coli J5 par l'épitope reconnu.

Tableau 12

Substance compétitive	Dose (ug)	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
Chitine	5	1,05
	10	1,01
Lipide A provenant de <u>S. minnesota</u> R595	5	0,33
	10	0,18
(-)	-	1,07

Exemple 11

Séparation de la fraction polysaccharidique
de LPS et analyse de l'antigène :

5 (1) Séparation de la fraction polysaccharidique
du LPS provenant de P. aeruginosa IID 1001

Selon le procédé de Wilkinson et coll. (Eur. J. Biochem, 52, 331 (1975)), on sépare la fraction polysaccharidique du LPS provenant de P. aeruginosa IID 1001. Autrement dit, on dissout du LPS (10 mg) dans de l'acide acétique à 1% et on hydrolyse à 100°C pendant 90 minutes. 10 On élimine le lipide A libéré par fractionnement avec du chloroforme. On soumet la fraction soluble dans l'eau obtenue à une chromatographie sur colonne (taille de la colonne 1 x 70 cm) en utilisant du dextran ("Sephadex G50" ; 15 Pharmacia, Uppsala) équilibré avec un tampon pyridine-acétate 50 mM (pH 5,5) pour le fractionnement. On distingue par spectrophotométrie les fractions auxquelles le polysaccharide, l'oligosaccharide du noyau de type semi-rugueux et l'oligosaccharide du noyau du type rugueux sont élués. On détecte le saccharide neutre par le procédé de 20 l'acide phénol-sulfurique (Dubois et coll. : Anal. Chem. 28, 350 (1956)), et on hydrolyse l'aminosaccharide avec de l'acide sulfurique 2N à 100°C pendant 2 heures puis on détecte par le procédé MBTH chlorhydrate de (3-méthyl- 25 2-benzothiazolinone hydrazone (Tsuji et coll. : Chem. Pharm. Bull. 17, 217 (1969)). On recueille après lyophilisation les fractions de polysaccharide, les fractions d'oligosaccharide de core du type semi-rugueux et d'oligo- 30 saccharide de core du type rugueux.

60

(2) Propriété de liaison de l'anticorps FKF-1F3 à la fraction polysaccharidique

On étudie la compétition de l'anticorps FKF-1F3 avec le polysaccharide, l'oligosaccharide de core du type semi-rugueux et l'oligosaccharide du type rugueux provenant de P. aeruginosa IID 1001 tel qu'obtenu dans l'exemple 12 (1) selon la méthode ELISA de la même manière que dans l'exemple 7. La quantité de substance compétitive utilisée est la quantité correspondant à 20 nmoles du saccharide neutre selon le procédé au phénol-acide sulfurique tel que mentionné dans l'exemple 12 (1). Les résultats sont présentés au tableau 13.

15 Tableau 13

Substance compétitive	Activité de liaison (OD ₄₀₅)
Polysaccharide	0,04
Oligosaccharide du core de type semi-rugueux	0,42
Oligosaccharide du core de type rugueux	0,39
(-)	0,39

D'après les résultats ci-dessus et l'essai de Western blot dans l'exemple 2 (1), on peut dire que l'épitope tel que reconnu par l'anticorps FKF-1F3 est présent dans la fraction polysaccharidique en plus du lipide A, dans le cas de certaines souches de P. aeruginosa.

Exemple 12

Effet thérapeutique de l'anticorps FKF-1F3 sur les infections expérimentales à P. aeruginosa chez les souris :

5 (1) Effet thérapeutique sur les infections à P. aeruginosa (sérotype G)

On inocule par voie intrapéritonéale à des souris ICR-slc (âgées de 4 semaines ; mâles ; 10 animaux par groupe) $1,2 \times 10^4$ ou $6,2 \times 10^4$ cellules d'isolat clinique 10 de P. aeruginosa SP 6788 (sérotype G). Au bout d'une heure, on administre par voie intrapéritonéale l'anticorps FKF-1F3 (0,1 µg). Le jugement de l'effet thérapeutique se fait sur le taux de survie au bout d'une semaine. Les résultats sont présentés au tableau 14, d'où l'on comprend 15 que tous les animaux survivent dans les groupes traités et que l'anticorps FKF-1F3 est efficace dans le traitement des infections à P. aeruginosa (sérotype G).

Tableau 14

20	Anticorps	Dose	Taux de survie (%) (quantité inoculée CFU/tête)	
			$1,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$
25	FKF-1F3	0,1 µg/tête	100	100
	Aucun	-	20	30

(2) Effet thérapeutique sur les infections à P. aeruginosa (sérotypes A)

On inocule par voie intrapéritonéale à des souris 30 5% mutin ICR-slc (âgées de 4 semaines ; mâles ; 10 animaux par groupe) $3,7 \times 10^4$, $1,5 \times 10^5$ ou $7,3 \times 10^5$

cellules d'isolat clinique de P. aeruginosa SP6788 (sérotype A). Au bout d'une heure, on administre par voie intrapéritonéale l'anticorps FKF-1F3 (0,1 µg). Le jugement de l'effet thérapeutique se fait sur le taux de survie au bout d'une semaine. Les résultats sont présentés au tableau 15, d'où l'on comprend qu'un taux de survie significatif est produit dans les groupes traités même lorsque la quantité inoculée atteint $1,5 \times 10^5$ cellules et que l'anticorps FKF-1F3 est efficace dans le traitement des infections à P. aeruginosa (sérotype A).

Tableau 15

Anticorps	Dose	Taux de survie (%)		
		(quantité inoculée CFU/tête)	$3,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
FKF-1F3	0,1 µg/tête	100	80	0
BSA	2 µg/tête	80	20	10
Sel phys.	-	50	10	0

REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonal humain, qui a une propriété de liaison spécifique avec les polysaccharides O des souches de Pseudomonas aeruginosa classées dans deux ou plusieurs sérotypes différents par la classification de la Commission Japonaise et également une propriété de liaison avec le lipide A provenant des bactéries Gram-négatives.

2. Anticorps selon la revendication 1, pour lequel lesdits sérotypes sont choisis entre les types A, F, G et M.

3. Anticorps selon la revendication 1, ou 2, pour lequel lesdites bactéries Gram-négatives sont choisies parmi Eschirichia, Salmonella et Pseudomonas.

4. Anticorps selon la revendication 3, qui réagit avec le lipide A provenant d'Escherichia coli mutant Rc.

5. Anticorps selon la revendication 4, qui réagit avec le lipide A provenant d'Escherichia coli mutant Rc J5 (ATCC 39355)

6. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, qui est une IgM.

7. Anticorps monoclonal humain FKF-1F3

8. Composition prophylactique ou thérapeutique contre les infections bactériennes, qui comprend une quantité efficace de l'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 comme ingrédient actif.

9. Utilisation d'un anticorps monoclonal humain tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans la préparation d'un médicament contre les

infections bactériennes provoquées par des bactéries comprenant les bactéries Gram-négatives.

10. Utilisation d'un anticorps monoclonal humain tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans la préparation d'un médicament contre les infections bactériennes provoquées par des bactéries comprenant Pseudomonas aeruginosa.

11. Utilisation d'un autre corps monoclonal humain tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter le choc endotoxique provoqué par les bactéries Gram-négatives.

12. Lignée cellulaire transformée par le virus d'Epstein-Barr qui est capable de produire l'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et toute lignée cellulaire descendante qui provient d'une telle lignée.

13. Hybridome obtenu par fusion cellulaire d'un lymphocyte B humain comprenant une cellule transformée par le virus d'Epstein-Barr avec une cellule de myélome, ledit hybridome étant capable de produire l'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et toute lignée cellulaire descendante qui provient d'un tel hybridome.

14. Hybridome FKF-1F3 et toute lignée cellulaire descendante qui en provient.

15. Procédé de production d'un anticorps monoclonal humain dans lequel on soumet la lignée cellulaire ou l'hybridome selon l'une quelconque des revendications 12 à 14 à une culture cellulaire et on recueille l'anticorps produit à partir du surnageant de culture.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale

BE 8900085
BO 1678

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
Y	EP-A-0 163 493 (GENETIC SYSTEMS CORP.) * Revendications 1-6 *	1-15	C 12 P 21/08 A 61 K 39/40 C 12 N 5/00
Y	EP-A-0 215 131 (TEIJIN LTD) * Revendications 3,5,7,9,11; résumé *	1-15	
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 5, 3 février 1986, page 437, résumé no. 32782p, Columbus, Ohio, US; S. SAWADA et al.: "A new common polysaccharide antigen of strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> detected with a monoclonal antibody", & J. INFECT. DIS. 1985, 152(6), 1290-9 * Résumé *	1-15	
Y	--- INFECTION AND IMMUNITY, vol. 45, no. 3, septembre 1984, pages 631-636, American Society for Microbiology; L.M. MUTHARIA et al.: "Monoclonal antibodies specific for <i>Escherichia coli</i> J5 lipopolysaccharide: cross-reaction with other gram-negative bacterial species" * En entier *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Y, P	--- FR-A-2 606 421 (ROUSSEL-UCLAF) * Revendications 1,2 *	1-15 -/-	C 12 P
Date d'achèvement de la recherche			Examinateur
13-10-1989			REMPP G.L.E.
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ABSENCE D'UNITE D'INVENTION

La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir

- 1. Revendications :**
- 2. Revendications :**
- 3. Revendications :**
- 4. Revendications :**

Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:

ETENDUE DE LA RECHERCHE

Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :

Les éléments figurant dans les

- 1. Revendications :**
- 2. Revendications :**
- 3. Revendications :**
- 4. Revendications :**

n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale
Page 2

BE 8900085
BO 1678

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y, P	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 7, 15 août 1988, pages 512-513, résumé no. 52858z, Columbus, Ohio, US; B.J. APPELMELK et al.: "Production, characterization and biological effects of monoclonal antibodies to different parts of the Gram-negative lipopolysaccharide core region", & PROG. CLIN. BIOL. RES. 1988, 272 (BACT. ENDOTOXINS, 373-82) * Résumé *</p> <p>---</p> <p>A EP-A-0 183 876 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LEMLAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) -----</p>	1-15	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur	
13-10-1989		REMPP G. L. E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8900085
BO 1678

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 27/10/89.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0163493	04-12-85	AU-A- 4285885 JP-A- 61069796 US-A- 4834975	28-11-85 10-04-86 30-05-89
EP-A- 0215131	25-03-87	AU-B- 584690 AU-A- 5583286 WO-A- 8605396	01-06-89 13-10-86 25-09-86
FR-A- 2606421	13-05-88	EP-A- 0271379 JP-A- 1137993	15-06-88 30-05-89
EP-A- 0183876	11-06-86	Aucun	