



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5



⑯ Gesuchsnr.: 1737/89

⑬ Inhaber:
Sumitomo Chemical Company, Limited,
Chuo-ku/Osaka (JP)
Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited,
Chuo-ku/Osaka-shi/Osaka-fu (JP)

⑭ Anmeldungsdatum: 09.05.1989

⑯ Priorität(en): 10.05.1988 JP 63-114473

⑭ Erfinder:
Yokota, Shinichi, Takarazuka-shi/Hyogo-ken (JP)
Ohtsuka, Hiroshi, Nishinomiya-shi/Hyogo-ken (JP)
Ochi, Hiroshi, Toyonaka-shi/Osaka-fu (JP)
Noguchi, Hiroshi, Kawanishi-shi/Hyogo-ken (JP)
Terashima, Masazumi, Ibaraki-shi/Osaka-fu (JP)
Kato, Masuhiro, Toyonaka-shi/Osaka-fu (JP)

⑯ Patent erteilt: 31.12.1992

⑯ Patentschrift
veröffentlicht: 31.12.1992

⑯ Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

⑯ Humaner monoklonaler Antikörper und Hybridom zur Herstellung desselben.

⑯ Humaner monoklonaler Antikörper, der prophylaktische und therapeutische Wirkung auf durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufene infektiöse Krankheiten besitzt, wobei sich das Epitop in der äusseren Kernkomponente von LPS des genannten Mikroorganismus befindet. Ebenso werden ein Hybridom, das den humanen monokonalen Antikörper erzeugt, sowie Verfahren zur Herstellung des genannten Antikörpers und Hybridoms bereitgestellt.



Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft einen humanen monoklonalen Antikörper auf *Pseudomonas aeruginosa* (nachfolgend als «*P. aeruginosa*» bezeichnet) sowie dessen Herstellung und Verwendung. Insbesondere betrifft sie einen humanen monoklonalen Antikörper, der ein Oligosaccharid einer äusseren Kernkomponente des Lipopolysaccharids von *P. aeruginosa* erkennen kann, welches verschiedenen Stämmen von *P. aeruginosa* unterschiedlicher Serotypen gemeinsam ist, wobei der Antikörper Bindungsvermögen an *P. aeruginosa* von zwei oder mehr Serotypen aufweist. Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Hybridom, das den Antikörper herstellen kann, sowie ein Verfahren zur Herstellung des Antikörpers. Der erfindungsgemäss humane monoklonale Antikörper wird zur Verhinderung und Behandlung infektiöser Krankheiten, die durch *P. aeruginosa* hervorgerufen werden, verwendet.

10 Die infektiöse Krankheiten hervorrufenden Bakterienarten, d.h. prophlogistische Bakterien, haben sich mit Entwicklung und Wechsel klinisch verwendeter Antibiotika verändert. Als Ergebnis davon haben sich infektiöse Krankheiten, die durch die Bakterien hervorgerufen werden, welche im allgemeinen nur eine niedrige Pathogenität oder Virulenz aufwiesen, vermehrt. Mithin gehören *P. aeruginosa* derzeit zu den wesentlicheren pathogenen Bakterien, die infektiöse Krankheiten hervorrufen, deren ernsthafte Symptome oft zum Tod von Patienten führen, insbesondere dann, wenn deren Immunität infolge fortgesetzter Verabreichung von Immunosuppressiva gering ist, und zwar bei Patienten, die Krebs haben oder Verbrennungen oder dergleichen erlitten haben.

15 Unter den verschiedenen präventiven oder therapeutischen Methoden gegen bakterielle Infektionen ist die Chemotherapie unter Verwendung von Antibiotika oder antimikrobiellen Mitteln am bedeutendsten. Tatsächlich wurden hierzu verschiedene Antibiotika entwickelt, einschliesslich Streptomycin, Kanamycin, Penicillin, Cephalosporin etc., die gegen fast alle gram-positiven Bakterien (z.B. *Staphylococci*) und gram-negative Bakterien (z.B. *E. coli*) wirken und einen deutlichen klinischen Effekt hervorrufen. Es gibt jedoch nur wenige medizinische Produkte, die gegen *P. aeruginosa* wirksam sind. Auch diese medizinischen Produkte wirken auf *P. aeruginosa* nur bakteriostatisch und nicht bakterizid. Sie können daher das Wachstum von *P. aeruginosa* verhindern, zeigen jedoch klinisch keinen bemerkenswerten therapeutischen Effekt.

20 30 Eine weitere präventive oder therapeutische Methode stellt die Antikörper-Therapie dar, die die Verabreichung von Immunoglobulin umfasst. Diese Methode wird oft in Kombination mit einer Chemotherapie durchgeführt und lenkt heute grosse Aufmerksamkeit als Ersatz für eine Chemotherapie auf sich. Ein Serum mit hohem Antikörpertiter kann durch aktive Immunisierung von Tieren, wie Pferden oder Kaninchen, erhalten werden; die Antikörper-Therapie kann durch Verabreichung eines solchen Serums erfolgen. In der Tat wurden die damit zu erzielenden bemerkenswerten therapeutischen Wirkungen an experimentellen Infektionen an verschiedenen Tieren bestätigt. Von Diphtherietoxin und Vipertoxin weiß man, dass die Antikörper-Therapie unter Verwendung von Seren, die von Tieren stammen, auch beim Menschen äusserst wirksam ist. Die Einführung eines heterogenen Proteins, das von Tieren stammt, in einen menschlichen Körper, führt jedoch zu einem ernsthaften Nebeneffekt, wie Anaphylaxe, oder anderen allergischen Reaktionen. Es ist daher äusserst wünschenswert, ein Immunoglobulin vom Menschen mit einem hohen Antikörpertiter gegen Bakterien zu entwickeln, das einen deutlichen therapeutischen Effekt gegen bakterielle Infektionen zeigt.

40 45 Konventionelle Immunoglobulin-Präparationen vom Menschen gewinnt man durch Sammeln von Blut von gesunden Personen oder von bakterien-infizierten Patienten, wobei das Blut einer Fraktionierung unterworfen wird, um eine Immunoglobulinfraktion zu erhalten; diese Immunoglobulinfraktion wird gereinigt und durch Zugabe von Ethylenglykol agglutinierende Materialien daraus entfernt; darauf folgt eine Behandlung mit Protease, Sulfonierung, DEAE-Säulenchromatografie etc.; anschliessend wird das sich ergebende Produkt zu intramuskulär oder intravenös injizierbaren Präparationen formuliert. Diese Präparationen erweisen sich als vorteilhaft, indem sie nicht zu Anaphylaxe oder anderen Nebeneffekten führen, wie dies bei der Verabreichung von Immunoglobulin aus Tieren beobachtet wird. Sie weisen jedoch einige andere Nachteile auf. Einer der Nachteile ist, dass ihr Antikörpertiter gegen Bakterien niedrig ist, so dass eine ausreichende therapeutische Wirkung nicht zwingend erzielt werden kann. Ein weiterer Nachteil ist, dass es schwierig ist, die Präparationen in stabiler Form mit einem hohen Antikörpertiter in grossen Mengen zur Verfügung zu stellen, da sie durch das Sammeln von Blut von gesunden Personen oder von bakterien-infizierten Patienten gewonnen werden, und das konstante und kontinuierliche Gewinnen von Seren mit einem hohen Antikörpertiter ist ziemlich schwierig. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass sie mit Hepatitisvirus, z.B. HB-Virus, Adult-T-Zellen-Leukämie-Virus (ATLV, HTLV) etc. kontaminiert sein können, da als Ausgangsmaterial Blut von einer Vielzahl unbekannter Personen erhalten wird. Um diese Nachteile zu überwinden, ist die Herstellung eines humanen monoklonalen Antikörpers in hohem Masse wünschenswert, der zur Prophylaxe und Therapie bakterieller Infektionen verwendet wird und herkömmliche Immunoglobulin-Präparationen vom Menschen sowie monoklonale Antikörper von Mäusen ersetzen kann.

50 55 60 65 Wenn ein Antikörper an die Oberfläche einer Bakterienzelle gebunden wird, beschleunigt sich die Phagocytose einer Makrophase auf der Bakterienzelle (d.h. Beschleunigung der Phagocytose infolge Opsonierung), oder es erfolgt die Spaltung der Bakterienzelle durch ein Komplement. Als Target-Anti-

gen auf der Oberfläche der Bakterienzelle von *P. aeruginosa* kennt man Lipopolysaccharid (LPS), äussere Membranproteine, Flagellum, Pilus etc.

Sawada et al berichteten, dass eine grössere Menge an monoklonalen Mäuse-Antikörpern, die ein äusseres Membranprotein erkennen, zur Bekämpfung von Bakterien erforderlich ist, verglichen mit einem monoklonalen Mäuse-Antikörper, der LPS erkennt (J. Infect. Dis. 150, 570–576 (1984)).

LPS besteht aus O-Polysaccharid, das ein O-Antigen darstellt, aus einem äusseren Kernoligosaccharid, das verschiedenen Spezies in gewissem Masse gemeinsam ist, aus einem inneren Kernoligosaccharid, das im allgemeinen allen Enterobakterien fast gemeinsam ist, sowie aus Lipid A. Das O-Polysaccharid-Antigen, das sich an der äussersten Oberfläche einer Bakterienzelle befindet, besteht aus sich wiederholenden Einheiten aus zwei bis fünf Zuckerresten, und seine Struktur schwankt in starkem Masse. Die Strukturen fast aller O-Antigene von Standard-Serotyp-Stämmen von *P. aeruginosa* sind bereits bestimmt worden (Acta Microbiol. Hung. 35, 3–24 (1988)).

Da die Strukturbestimmung von O-Antigenen durch chemische Analyse zeitaufwendig und mühsam ist, werden Antiseren oder monoklonale Mäuse-Antikörper gegen die O-Antigene aus den Standardstämmen zur Klassifizierung der Stämme von *P. aeruginosa* verwendet. In anderen Worten, ein unbekannter Stamm von *P. aeruginosa* wird in Übereinstimmung mit der immunologischen Reaktivität mit bekannten Antikörpern oder Antiseren klassifiziert. Die Klassifizierung kennt man als Serotyp und typische Beispiele der Serotyp-Klassifizierung sind die folgenden: Typen 1 bis 17 gemäss der Klassifizierung nach Homma et al (Japan. J. Exp. Med. 44, 1 (1974)); Typen 1 bis 7 gemäss der Klassifizierung nach Fisher et al (J. Bacteriol., 98, 835 (1969)); Typen A bis M gemäss der Klassifizierung durch das Serotyping Komitee für die japanische Pseudomonas Aeruginosa Gesellschaft (nachfolgend als «Japanisches Komitee» bezeichnet) (Japan. J. Exp. Med. 45, 329 (1976)); Typen 1 bis 17 gemäss der Klassifizierung durch das International Antigenic Typing System (IATS) (Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 256–264 (1983)) etc. Diese Klassifizierungen und ihre gegenseitigen Beziehungen sind in Tabelle 1 gezeigt (Japan. J. Exp. Med. 46, 329 (1976)).

Tabelle 1:
Serotyp-Klassifizierung von *P. aeruginosa*

| | Japanisches Komitee 1976 | Homma et al 1974 | IATS 1983 | Fisher et al 1969 |
|----|-----------------------------|---------------------|---------------|----------------------|
| 30 | A | 1 | 3 | — |
| | B | 2, 7, 13, 16 | 2, 5, 16 | 3, 7 |
| 35 | C | 3 | 8 | 6 |
| | D | 4 | 9 | — |
| | E | 5 | 11 | 2 |
| 40 | F | 6 | 4 | — |
| | G | 8 | 6 | 1 |
| | H | 9 | 10 | 5 |
| | I | 10 | 1 | 4 |
| 45 | J | 11 | 15 | — |
| | K | 12 | 13 | — |
| | L | 14 | — | — |
| 50 | M | 15, 17 | — | — |
| | — | — | 7, 12, 14, 17 | — |

Es ist bekannt, dass ein gegenüber einem bestimmten O-Antigen spezifischer Antikörper eine starke präventive oder therapeutische Wirkung auf Infektionen zeigt, die durch *P. aeruginosa* des Serotyps hervorgerufen werden, zu dem das genannte O-Antigen gehört, jedoch keine Wirkung gegen *P. aeruginosa* eines jeden anderen Serotyps zeigt.

Die Verwendung einer Mischung aus 13 oder 17 monoklonalen Antikörpern, die jeweils für *P. aeruginosa*-Stämme von 13 oder 17 Serotypen verantwortlich sind, würde zur Behandlung von Infektionen wirksam sein, die durch jeden der Stämme hervorgerufen werden. Die Herstellung einer solchen Mischung ist jedoch sehr mühsam. Vom praktischen Standpunkt aus ist die klinische Verwendung einer solchen Präparation schwierig durchzuführen.

Bisher wurden verschiedene Untersuchungen an experimentell infizierten Tieren und klinische Studien vorgenommen, wobei sich herausstellte, dass verschiedene Antiseren und monoklonale Antikörper, die spezifisch auf Kernglycolipid gram-negativer Bakterien reagieren, gram-negative Infektionen wirksam verhindern, insbesondere den Endotoxinschock (WO 8 404 458; WO 8 501 659; EP-A 0 174 204; JA-A 61 130 300; Mutharia et al.: Inf. Immun., 45, 631–636 (1984); Teng et al: Proc. Natl. Acad. Sci.,

USA, 82, 1790–1794 (1985); Gigliotti & Shene: J. Inf. Dis., 151, 1005–1011 (1985); Braude et al: J. Inf. Dis., 136 (Suppl), S167–173 (1977); Nellesand Niswander: Inf. Immun., 46, 677–681 (1984); Pollack et al: J. Clin. Invest., 72, 1874–1881 (1983); Young et al: Clin. Res., 30, 522A (1982); Young et al: Clin. Res., 32, 518A (1984)).

5 Die vorgenannten Antiseren oder monoklonalen Antikörper, die auf der Basis von Kernglycolipid-Antigen hergestellt werden, werden an verschiedene gram-negative Bakterien gebunden. Dies zeigt offensichtlich, dass sich das verbundene Epitop in einer inneren Kernkomponente, umfassend Heptose, KDO etc., oder in der Lipid-A-Komponente befindet.

10 Sawada et al erhielten einen monoklonalen Antikörper, der ein Kernantigen von *P. aeruginosa* erkennt (Annual Reports of the 21st Meeting of the Japan Pseudomonas Aeruginosa Society 16, 1987). Tierversuche zeigten jedoch, dass der monoklonale Antikörper Versuchstiere vor Infektionen nicht wirksam schützte und gegen die innere Kern- oder Lipid-A-Komponente nur schwach wirksam ist, um die Tiere vor den genannten Infektionen zu schützen.

15 Wie vorstehend festgestellt, sind sowohl ein monoklonaler Antikörper gegen ein äusseres Membranprotein als auch konventionelle Antikörper gegen einen LPS-Kern therapeutisch nicht wirksam, obwohl deren Bindungsspektren in *P. aeruginosa* sehr breit sind. Andererseits besitzt ein monoklonaler Antikörper auf O-Antigen nur eine sehr eingeschränkte Verwendbarkeit, weil er nur auf *P. aeruginosa*, das einen relevanten Serotyp aufweist, wirkt. Infolgedessen ist die Entwicklung von Immunoglobulin-Präparationen, die breitere Bindungsspektren und signifikante präventive und therapeutische Wirkung auf *P. aeruginosa*-Infektionen aufweisen, in hohem Masse wünschenswert.

20 Die Lösung der vorgenannten Aufgabe besteht darin, ein allen Stämmen von *P. aeruginosa* gemeinsames Antigen aufzufinden, und einen humanen monoklonalen Antikörper zu entwickeln, der das gemeinsame Antigen erkennt, ein breites Bindungsspektrum aufweist und gegenüber durch *P. aeruginosa* verschiedener Serotypen hervorgerufenen Infektionen prophylaktisch und therapeutisch wirksam ist.

25 Es wurden grosse Anstrengungen unternommen, um ein Verfahren zur Herstellung eines humanen monoklonalen Antikörpers, der zur Verhinderung und Behandlung von durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen infektiösen Krankheiten wirksam ist, sowie ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von humanen Immunoglobulin-Präparationen mit hohem Titer, die den monoklonalen Antikörper enthalten, in industriellem Massstab zur Verfügung zu stellen. Die Erfinder haben ihr besonderes Augenmerk auf eine Oligosaccharid-Komponente des äusseren Kerns in LPS, die *P. aeruginosa* gemeinsam ist, gerichtet, und versucht, eine Zelllinie zur Herstellung eines humanen Antikörpers, der die genannte Oligosaccharid-Komponente erkennt, unter Verwendung von B-Lymphocyten, bereitzustellen. Als Ergebnis dieser Anstrengungen ist es nunmehr gelungen, einen humanen monoklonalen Antikörper zu erhalten, der das äussere Kernoligosaccharid, das eine spezifische chemische Struktur besitzt und zur Verhinderung und Behandlung von durch *P. aeruginosa* verschiedener Serotypen hervorgerufenen infektiösen Krankheiten wirksam eingesetzt wird, in spezifischer Weise erkennt. Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper ist dadurch gekennzeichnet, dass er an Stämme von *P. aeruginosa*, die zu den Serotypen A, F, G, H, K und M gehören, gebunden wird, und unterscheidet sich von den bekannten serotyp-spezifischen monoklonalen Antikörpern, die O-Antigen-Polysaccharid erkennen und nur an einen spezifischen 30 Stamm von *P. aeruginosa* eines hervorgehobenen Serotyps gebunden werden können. Außerdem wird der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper an *E. coli*-Stämme des Serotyps 026 gebunden. Insbesondere sind die Antigendeterminante oder das Epitop für den erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper in der Nähe von Rhamnose- oder Galactosamin-Resten in der äusseren Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* positioniert. Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper ist auch dadurch gekennzeichnet, dass er prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit bei experimentell infizierten 35 Mäusen zeigt.

40 Die bekannten monoklonale Antikörper gegen den Kern von LPS werden an eine Vielzahl von gram-negativen Bakterien gebunden, was nahelegt, dass deren Epitope im inneren Kern oder der Lipid-A-Komponente von LPS angeordnet sind. Die prophylaktische Wirksamkeit der bekannten Antikörper ist bei 45 experimentell infizierten Tieren relativ niedrig.

45 Wie aus dem vorstehenden verständlich ist, unterscheidet sich der monoklonale Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung deutlich dadurch von den vorgenannten Anti-Kernglycolipid-Antikörpern, dass ersterer mit der äusseren Kernkomponente reagiert, welche den Stämmen von *P. aeruginosa* in hohem Masse gemeinsam ist, und dass ersterer einen bedeutenden prophylaktischen und therapeutischen Effekt bei experimentell infizierten Tieren aufweist.

50 Der von Sawada et al (siehe oben) hergestellte humane monoklonale Antikörper, der ein Kernantigen von *P. aeruginosa* erkennt, wird zu 75% an *P. aeruginosa* des Serotyps A, zu 100% an B, 0% an E, 43% an G, 100% an H und 60% an I gebunden und unterscheidet sich im Bindungsspektrum vom monoklonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung. Somit erkennt der Antikörper nach Sawada et al ganz offensichtlich ein Epitop, das vom Epitop des Antikörpers der Erfindung unterschiedlich ist. Andererseits wurde beim Antikörper nach Sawada et al gezeigt, dass dieser keine prophylaktische Wirksamkeit bei experimentell infizierten Tieren aufwies. Demzufolge unterscheidet sich der monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung, der die äussere Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* erkennt, vom 55 humanen monoklonalen Anti-Kern-Antikörper nach Sawada et al.

55 Demgemäß ist es ein erstes Ziel der vorliegenden Erfindung, einen humanen monoklonalen Antikör-

per bereitzustellen, der ein Oligosaccharid der äusseren Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* erkennen kann und an Stämme von *P. aeruginosa* verschiedener Serotypen mit hoher Frequenz gebunden wird und zur Verhinderung und Behandlung infektiöser, durch *P. aeruginosa* hervorgerufener Krankheiten auf wirksame Weise eingesetzt wird. Ein anderes Ziel der Erfindung ist es, eine Zelllinie vom Menschen bereitzustellen, die zur kontinuierlichen Herstellung des genannten monoklonalen Antikörpers befähigt ist. Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, Immunoglobulin-Präparationen mit hohem Titer zur Verhinderung oder Behandlung von durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen infektiösen Krankheiten bereitzustellen, welche mindestens einen erfindungsgemässen monoklonalen Antikörper enthalten. Noch ein Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers und der genannten Zelllinie vom Menschen zur Verfügung zu stellen. Diese und andere Ziele der vorliegenden Erfindung werden für den Fachmann aus dem vorstehend gesagten und der nachfolgenden Beschreibung erkennbar.

Der monoklonale Antikörper der Erfindung, der das Oligosaccharid der äusseren Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* erkennt, soll einen monoklonalen Antikörper vom Menschen bedeuten, der durch einen einzigen, einen Antikörper erzeugenden Klon hergestellt wird, wobei der Antikörper befähigt ist, sich an Stämme von *P. aeruginosa* verschiedener Serotypen, insbesondere an Serotyp A, G, F, H, K und M, mit hoher Frequenz zu binden.

Der erfindungsgemässen monoklonale Antikörper kann beispielsweise durch die folgenden Vorgehensweisen hergestellt werden.

- 20 B-Lymphocyten vom Menschen, die sensibilisiert werden mit
(1) *P. aeruginosa* (lebende Bakterien oder durch Formalin oder Erhitzen getötete Bakterien) oder
(2) der R-Mutante von *P. aeruginosa*, die kein O-Antigen-Polysaccharid aufweist, oder
(3) vorzugsweise LPS, abgeleitet von der R-Mutante,
werden einer Zellfusion mit Myelomzellen oder B-Lymphoplastoidzellen unterworfen, worauf man das
25 sich ergebende Hybridom kontinuierlich *in vitro* wachsen lässt, wodurch eine Zelllinie erzeugt wird, die zur kontinuierlichen Herstellung des angestrebten Antikörpers befähigt ist. Die erzeugte Zelllinie wird *in vitro* kultiviert, und der im Kulturmedium sekretierte Antikörper wird extrahiert und gereinigt, um den angestrebten Antikörper in grossen Mengen zu erhalten.

Der hier verwendete Serotyp stimmt mit der Klassifizierung gemäss dem Japanischen Komitee überein und wird auf der Grundlage des Unterschiedes in der immunologischen Reaktion unter Verwendung eines Antiserums oder eines monoklonalen Mäuse-Antikörpers, welche gegenüber dem Standardstamm von *P. aeruginosa* des jeweiligen Serotyps spezifisch reaktiv sind, bestimmt.

LPS steht für ein Lipopolysaccharid und stellt einen Hauptbestandteil der äusseren Membran gram-negativer Bakterien dar. LPS besteht aus
35 (1) einem Glycolipid, bezeichnet als Lipid A,
(2) einem inneren Kernoligosaccharid, enthaltend 2-Keto-3-desoxyoctonsäure, Heptose, Ethanolamin, Phosphat etc.,
(3) einem äusseren Kernoligosaccharid, bei dem sich die Bestandteile, abhängig von der Spezies, unterscheiden, und das, soweit *P. aeruginosa* betroffen ist, Glucose, Rhamnose, Galactosamin, Alanin etc., enthält, und
(4) einem Polysaccharid, bezeichnet als O-Antigen, das den Serotyp bestimmt,
wobei das genannte Lipid A an die genannten inneren und äusseren Kernkomponenten und das genannte O-Antigen an die genannte äussere Kernkomponente gebunden sind.

Das äussere Kernoligosaccharid von LPS, welches in vielen Stämmen von *P. aeruginosa* gemeinsames Antigen darstellt, ist an der Stelle angeordnet, an die das O-Polysaccharid gebunden wird. Auf diese Weise wird das äussere Kernoligosaccharid in unmittelbarer Nähe des O-Polysaccharids, das an der äussersten Aussenseite der Bakterienzelloberfläche angeordnet ist, positioniert.

Bekanntlich variieren chemische Struktur und Zusammensetzung des äusseren Kernoligosaccharids in Abhängigkeit der Stämme (Wilkinson, Rev. Infect. Dis. 5, S941–S949 (1983)). Die Bestandteile des Oligosaccharids sind jedoch vielen Stämmen von *P. aeruginosa* gemeinsam und umfassen Glucose, Rhamnose, Galactosamin, Alanin etc. als Hauptbestandteile.

Der hier verwendete Begriff «monoklonaler Antikörper» bedeutet einen Antikörper, der eine einheitliche molekulare Struktur aufweist und durch einen einzigen Antikörper erzeugenden Klon hergestellt wird, welcher seinerseits durch Zellfusion (*Nature*, 256, 495 (1975)) oder EB-Virus-Transformation (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 190 (1973)) erhalten werden kann.

Die Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers gemäss der Erfindung umfasst die folgenden Stufen:

- (1) Herstellung von B-Lymphocyten vom Menschen, die mit einem Antigen sensibilisiert werden;
(2) Herstellung der Zelllinie, die den spezifischen monoklonalen Antikörper durch Immortalisieren der
60 in (1) hergestellten Zellen erzeugt;
(3) Kultivierung der in (2) hergestellten Zelllinien;
(4) Reinigung des monoklonalen spezifischen Antikörpers aus der in (3) erhaltenen Kultur; und
(5) Herstellung einer Immunoglobulin-Präparation mit hohem Titer, welche den in (4) gereinigten spezifischen monoklonalen Antikörper enthält.
65 Jede dieser Stufen wird im folgenden näher erläutert.

STUFE 1:

Als B-Lymphocyten vom Menschen können Lymphocytenzellen vom Menschen verwendet werden, die einen Antikörper auf das äussere Kernoligosaccharid von LPS von *P. aeruginosa* produzieren, wobei die Lymphocyten durch Zentrifugation unter Verwendung einer Lymphocyt-Trennflüssigkeit, wie Lymphoprep® oder Mono-Poly-Resolving-Medium® (Flow Lab.) aus peripherem Blut abgetrennt werden können. Es können auch B-Lymphocyten verwendet werden, die aus Geweben oder Organen (z.B. Lymphknoten, Milz), die für Diagnose- oder Therapiezwecke extrahiert wurden, oder aus dem Blut der Nabelschnur oder dergleichen stammen. Es ist wünschenswert, die Zellen von Personen zu gewinnen, die in der Vergangenheit mit *P. aeruginosa* infiziert wurden und deren Zellen durch die Infektion sensibilisiert sind. Geeignete Personen, von denen die Zellen gewonnen werden können, kann man durch vorheriges Messen des Antikörpertiters ihrer Seren auswählen, welcher gegen mit Formalin behandelte *P. aeruginosa*-Zellen oder gegen von *P. aeruginosa* abgeleitetes LPS erhoben worden ist. Alternativ können B-Lymphocyten vom Menschen von beliebigen Personen, ungeachtet ihrer Krankengeschichte in der Vergangenheit, erhalten werden. Solche Lymphocyten werden vor dem Einsatz zur Zellfusion mit mit Formalin behandelten *P. aeruginosa* oder vorzugsweise mit von *P. aeruginosa* abgeleiteten LPS vermischt. Das heisst, durch Formalinbehandlung abgetötete *P. aeruginosa* oder vorzugsweise LPS aus *P. aeruginosa* werden den B-Lymphocyten als Antigen zugefügt. Ausserdem können Lösungen, die Lymphokine enthalten, wie B-Zellen-Proliferationsfaktoren und B-Zellen-Differenzierungsfaktoren (z.B. Pflanzenlectine, wie Pokeweed-Mitogen (PWM), Bakterienkomponenten, wie Cowan I, Human-Lymphocyt-Mischkultur, Milz, Thymus oder eine Blutzellenkultur aus der Nabelschnur) zu den B-Lymphocyten vom Menschen zur *in vitro* Sensibilisierung zugegeben werden, worauf Proliferation und Differenzierung erfolgen, um antikörperproduzierende Zellen zu ergeben. Die auf diese Weise erhaltenen B-Lymphocyten vom Menschen ein Antikörper-Molekül auf der Zelloberfläche auf und können für begrenzte Zeit eine geringe Menge an Antikörper freisetzen, sie sind jedoch nicht unsterblich.

STUFE 2:

Um die vorstehenden, sensibilisierten B-Lymphocyten vom Menschen in kontinuierlich proliferierbare, unsterbliche Zelllinien umzuwandeln, werden die sensibilisierten Human-Lymphocyten und Myelomzellen in Gegenwart von Polyethylenglykol einer Zellfusion unterworfen. Die verwendeten Myelomzellen sind Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Mangelmutanten (z.B. P3X63-Ag 8 (P3), P3X63-Ag 8.653), die von Mäuse-Myelomzellen stammen, HPRT-Mangelmutanten, die von der Human-Myelomzelle U-266 stammen, HPRT-Mangelmutanten, die von einer Maus-Human-Heteromyelomzelle stammen, die durch Zellfusion zwischen Mäuse- und Human-Myelomzellen oder einer Maus-Myelomzelle, wie SHM D-33, und einer Human-Lymphocyt-B-Zelle erhalten wird. HPRT-Mangelmutanten, die von Human-B-Lymphoblastoidzellen stammen, können anstelle von Myelomzellen eingesetzt werden.

Das verwendete Polyethylenglykol (PEG) kann beispielsweise PEG 1000 bis 6000 in einer Konzentration von 30 bis 50% (G/V) sein. Die Fusionseffizienz kann durch Inkorporation von Lectin, Poly-L-Lysin, Dimethylsulfoxid etc., gesteigert werden.

Die Fusion kann beispielsweise in derselben Weise, wie von Köhler et al (Nature, 256, 495 (1975)) beschrieben, durchgeführt werden, wobei Mäusezellen fusioniert werden, um ein einen monoklonalen Mäuse-Antikörper erzeugendes Hybridom zu erhalten. Die sensibilisierten Human-Lymphocyten und HPRT-defizienten Myelomzellen oder Human-Maus-Heteromyelomzellen werden beispielsweise in einem Verhältnis von 3 bis 1:1 miteinander vermischt, 45% (G/V) PEG 1500 bis 6000 werden anteilweise während 0,5 bis 1 Minute zugefügt, und die sich ergebende Mischung 0,5 bis 3 Minuten lang stehen gelassen. Zu dieser Mischung werden 10 bis 50 ml eines Kulturmediums, das kein Serum enthält, während 5 bis 10 Minuten zugegeben, anschliessend werden 2 ml FCS zugefügt und die Mischung bei 37°C 10 bis 60 Minuten lang inkubiert. Nach Zentrifugieren wird frisches Kulturmedium zugefügt, um eine Zellkonzentration von 10^5 bis 10^6 /ml einzustellen. Eine Mikroplatte mit 96 Vertiefungen wird mit der auf diese Weise erhaltenen Zellsuspension inkuliert, und zwar mit 2×10^4 bis 2×10^5 Zellen pro Vertiefung. Am nächsten Tag wird die halbe Menge durch ein Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-haltiges Medium (HAT-Medium) oder ein Hypoxanthin-Azaserin-haltiges Medium (HAZ-Medium) ersetzt, die Kultivierung wird bei 32 bis 37°C unter 5% CO₂ durchgeführt. Das Kulturmedium wird während ungefähr 10 bis 20 Tagen durch HAT-Medium oder HAZ-Medium und anschliessend während ungefähr 3 bis 5 Tagen durch ein Hypoxanthin-Thymidin-haltiges Medium (HT-Medium) oder ein Hypoxanthin-haltiges Medium (H-Medium) ersetzt. Der Ersatz erfolgte auf der Basis der halben Menge in Intervallen von drei Tagen während zwei oder drei Wochen, um eine proliferative Kolonie, d.h. ein Hybridom, zu erhalten. Es ist ebenfalls möglich, ein Hybridom durch die kombinierte Verwendung von Metabolismusinhibitoren ohne Einsatz einer HPRT-Mangelmutante zu selektieren.

Die Antikörpertiter des Kulturmediums gegen 17 Stämme von durch Formalinbehandlung abgetötete *P. aeruginosa* oder gegen ihre LPS, wobei die genannten Stämme eine Liste von 17 Serotypen verzeichnen, werden mittels ELISA oder Radioimmunoassay gemessen, und die angestrebte Zelle, die den spezifi-

schen Antikörper auf die äussere Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* erzeugt, wird mit Hilfe der Western-Blotting-Methode selektiert. Das Klonen wird zwei- oder dreimal mittels der limitierenden Verdünnungsmethode oder der Agarosemethode wiederholt, um eine stabile Zelllinie mit einer hohen Proliferationsrate und einer hohen Produktion des spezifischen Antikörpers zu erhalten.

- 5 Die aus sensibilisierten Human-B-Lymphocyten hergestellten Zelllinien gemäss dem Zellfusionverfahren (Hybridomverfahren) können kontinuierlich proliferiert werden und erzeugen den spezifischen Antikörper in stabiler Form in einer grossen Menge.

STUFE 3:

- 10 Die auf diese Weise erhaltenen Hybridome ($0,5$ bis 5×10^5 Zellen/ml) werden in einer beruhigten oder bewegten Kultur unter Verwendung eines üblichen Kulturmédiums für tierische Zellen in einem Gefäss, wie einer Zellkulturlasche oder -platte, mit Hilfe eines CO₂-Inkubators bei 32 bis 37°C unter 2 bis 10% CO₂ kultiviert. Insbesondere bei Kulturen in grossem Massstab können ein Kolbenfermenter, ein Hohlfasersystem oder dergleichen, wie sie für tierische Zellen konstruiert werden, eingesetzt werden. Das übliche Kulturmédium kann beispielsweise ein Medium (z.B. RPMI1640, Eagle's MEM), enthaltend 2 bis 20% Serum von Rinderfötus, Kalb, Rind, Pferd, vom Menschen oder dergleichen, ein serumfreies Medium, enthaltend für das Zellwachstum erforderliche Zusatzstoffe (z.B. Insulin, Transferrin, Ethanolamin, Selenit, Rinderalbumin, Lipid) oder dergleichen sein.

- 15 20 Die Kultivierung des Hybridoms kann ebenso anstelle der vorgenannten in vitro Kultivierung erfolgen, indem man intraperitoneal impft und das Hybridom in Tieren, wie einer nackten Maus, züchtet. Werden eine Maus oder eine nackte Maus herangezogen, werden $0,5$ bis $2,5 \times 10^7$ Zellen pro Maus geimpft. Vorzugsweise wird Pristan oder Anti-Asialo-GM₁-Antikörper vor der Impfung verabreicht. Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder Milzextraktion können ebenfalls für den Erfolg der Impfung hilfreich sein.

25 STUFE 4:

- 30 Die Reinigung des Antikörpers kann nach konventionellen biochemischen Verfahren erfolgen (z.B. Ammoniumsulfatfällung, Ethanolfällung, PEG-Fraktionierung, Ionenaustrauschchromatografie, Gelfiltration, Affinitätschromatografie, HPLC, Elektrophorese). Beim Reinigungsverfahren sollte darauf geachtet werden, dass eine Agglutinierung oder Absenkung der Antikörperaktivität vermieden werden. Zu diesem Zweck kann Human-Serumalbumin (HSA) in einer Menge von 0,05 bis 2% zugegeben werden. Die Zugabe von Aminosäuren, wie Glycin oder Alanin, insbesondere von basischen Aminosäuren, wie Lysin, Arginen oder Histidin, von Kohlenhydraten, wie Glucose oder Mannitol, von Salzen, wie Natriumchlorid, etc., kann manchmal bevorzugt sein. Es kann zu Agglutinierungen kommen, insbesondere im Falle eines IgM-Antikörpers, und eine Behandlung mit β-Propiolacton, Essigsäureanhydrid oder dergleichen wirkt gegen eine solche Agglutinierung. In einem solchen Fall wird intravenöse Verabreichung ermöglicht.

40 STUFE 5:

Der gereinigte monoklonale Antikörper kann nach einem an sich konventionellen Verfahren, wobei man beispielsweise durch einen Membranfilter zur Entfernung von Bakterien filtert, in sterilisierte Ampullen mit Stabilisatoren abfüllt und lyophilisiert, zu einer biologischen Präparation formuliert werden.

- 45 50 Die erfindungsgemäße Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers kann lediglich eine Art des humanen monoklonalen Antikörpers auf die äussere Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* als präventives oder therapeutisches Mittel für Infektionen mit *P. aeruginosa* umfassen. Vorzugsweise umfasst die Herstellung zusätzlich mindestens eine Art eines humanen monoklonalen Antikörpers, der ein unterschiedliches Epitop einer unterschiedlichen chemischen Struktur im äusseren Kernoligosaccharid von LPS von *P. aeruginosa* erkennen kann.

- 55 60 Die Herstellung kann auch einen humanen monoklonalen Antikörper beinhalten, der jedes andere Oberflächenantigen von *P. aeruginosa* erkennen kann, wie O-Antigen, äussere Membranproteine, Flagellum, Pilus, pathogene Faktoren von *P. aeruginosa*, wie Exotoxine, oder Exoenzyme, wie Elastase und Proteasen. Die erfindungsgemäße Herstellung kann nach Kombination mit jeder herkömmlichen Herstellung von Human-Immunoglobulin angewandt werden. Die Herstellung kann auch nach Kombination mit jedem humanen-monoklonalen Antikörper auf andere als *P. aeruginosa*-Bakterien, Viren, Fungi, Protozoen, Krebszellen, und mit anderen konventionellen Human-Immunoglobulin-Präparationen erfolgen. Außerdem kann der erfindungsgemäße humane monoklonale Antikörper einer herkömmlichen Human-Immunoglobulin-Präparation einverlebt werden, um eine Immunoglobulin-Präparation mit hohem Titer auf *P. aeruginosa* herzustellen.

- 65 Der humane monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung wird an die Oberfläche von *P. aeruginosa*-Zellen gebunden, insbesondere an die äussere Kernkomponente des LPS der Zelloberfläche, welches in vielen Stämmen von *P. aeruginosa* gemeinsames Antigen darstellt. Die Bindung des Antikörpers führt zur Opsonierung der *P. aeruginosa*-Zelle, wodurch Phagocytose und Bakteriolysis von Phagocyten auf der Zelle sowie die Aktivierung von Komplementen, die die Zellspaltung beschleunigt, gestei-

gert werden. Demgemäß können durch *P. aeruginosa* hervorgerufene experimentelle Mäuse-Infektionen durch Verabreichung des erfindungsgemässen humanen monoklonalen Antikörpers behandelt werden.

Zur Verhinderung und Behandlung von Infektionskrankheiten durch *P. aeruginosa* oder von Infektionen durch *P. aeruginosa* enthaltende Bakterien kann der erfindungsgemäss humane monoklonale Antikörper an einen erwachsenen Patienten in einer Menge von ungefähr 0,5 bis 500 mg, vorzugsweise 5 bis 50 mg, verabreicht werden.

Wie vorstehend ausgeführt, besteht der Hauptvorteil des erfindungsgemässen humanen monoklonalen Antikörpers darin, dass er einen hohen Antikörpertiter auf sein Antigen besitzt, eine ausgezeichnete therapeutische Wirkung im System experimenteller Mäuse-Infektionen zeigt, und wirksam gegen verschiedene *P. aeruginosa* unterschiedlichen Serotyps ist. Andere Vorteile des Antikörpers der Erfindung sind die folgenden.

Da er ein Protein humanen Ursprungs ist, treten keine Nebeneffekte (z.B. Anaphylaxe) auf, wie sie bei der Verabreichung eines heterogenen Proteins beobachtet werden. Da er aus einer bestimmten spezifischen Zelllinie erzeugt wird, ist die Möglichkeit einer Kontaminierung mit unbekannten bioriskanten Materialien viel geringer, verglichen mit herkömmlichen Immunoglobulinen, die aus menschlichem Blut, das aus einer Anzahl unbekannter Personen stammt, hergestellt werden. Der erfindungsgemäss humane monoklonale Antikörper wird mit einem hohen Antikörpertiter *in vitro* in stabiler Form in einer grossen Menge erzeugt, und sein Herstellungsverfahren ist vorteilhafter als herkömmliche Verfahren, die menschliches Blut unter vereinfachter Qualitätskontrolle verwenden.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen detailliert erläutert, selbstverständlich soll die Erfindung jedoch durch diese Beispiele nicht eingeschränkt werden.

BEISPIEL 1

Herstellung einer humanen monoklonalen Antikörper MH-4H7-produzierenden Zelllinie, hergestellt durch Human-Maus-Zellfusion:

(1) Herstellung von Human-Lymphocyten aus peripherem Blut und deren Züchtung.

Peripheres Blut (100 ml) mit einem hohen Antikörpertiter gegen *P. aeruginosa*-Oberflächenantigene wurde einem gesunden freiwilligen Spender entnommen. Einem Zentrifugenröhrrchen (50 ml, Sumitomo Bakelite) wurden Mono-Poly-Resolving-Medium® (Fow Lab.) zugefügt und peripheres Blut (20 ml) langsam darübergelegt, dann wurde mit einer Zentrifuge niedriger Geschwindigkeit (BS-20BH, Tommy Precision Ind.) bei 1500 Upm (Roter-TS-7) bei Raumtemperatur 30 Minuten lang zentrifugiert, wodurch Erythrocyten und Lymphocyten abgetrennt wurden.

Der die Lymphocyten enthaltende Teil wurde gesammelt und dreimal mit einem Dulbecco's modified Eagle's minimum essential Medium (nachfolgend als D-MEM bezeichnet) gewaschen, worauf die Auszählung der Zellzahlen erfolgte, um Lymphocytenzellen von $1,2 \times 10^8$ zu erhalten.

Die Lymphocytenzellen (6×10^7) wurden in einem Lymphocyt-Kulturmedium (66 ml), enthaltend mit Formalin abgetötete Zellen von *P. aeruginosa* (IID1001 (Typ A) und IID1020 (Typ G), jeweils 0,0002%) suspendiert, und die Suspension wurde auf Mikroplatten mit 24 Vertiefungen (Costar, Nr. 3424) in einer Menge von $1,5 \times 10^6$ Lymphocytenzellen/Vertiefung gegeben und bei 37°C unter 5% CO₂ sechs Tage lang kultiviert. Das vorstehend genannte Lymphocyt-Kulturmedium bedeutet RPMI-1640-Medium, das 20% (V/V) inaktiviertes Fötal-Kälberserum (CFS), 0,05 mg/ml Natriumpyruvat, 5×10^{-5} Mol 2-Mercaptoethanol, 30 µg/ml Transferrin, abgeleitet von Kälberplasma (United States Biochemical Corp.) und 0,01% (V/V) Pflanzenlectin, abgeleitet von Pokeweed (Gibco Lab.), enthält.

(2) Zellfusion

Human-Maus-Heteromyelomzellen (SHM-D33, ATCC Nr. CRL1668) wurden in D-MEM, enthaltend 15% FCS, subkultiviert, $2,5 \times 10^7$ Zellen wurden zweimal mit D-MEM gewaschen.

Andererseits wurden periphere Blutzellen gewonnen, die sechs Tage lang in Mikroplatten mit 24 Vertiefungen gemäss Beispiel 1(1) gezüchtet wurden, um $7,4 \times 10^7$ Lymphocytenzellen zu ergeben. Die Zellen wurden dreimal mit D-MEM gewaschen und in einem Zentrifugenröhrrchen mit den vorstehenden Human-Maus-Heteromyelomzellen vermischt und dann zentrifugiert, um Präzipitate zu ergeben.

Den Präzipitat im Zentrifugenröhrrchen wurde 1 ml einer Polyethylenglykol (PEG)-Lösung (0,45 g PEG4000 (Merck), 0,45 ml PBS(-) und 0,1 ml Dimethylsulfoxid) im Laufe ungefähr 1 Minute unter Rollen des Röhrrchens zugefügt und die Mischung bei Raumtemperatur 1 Minute lang stehen gelassen. Dann wurde dem Röhrrchen unter Rollen des Röhrrchens mit einer Rate von 2 ml/Min. D-MEM zugefügt, was viermal wiederholt wurde. Unter Verwendung von D-MEM, enthaltend 10% FCS, anstatt D-MEM, wurde die vorgenannte Vorgehensweise dreimal wiederholt. Schliesslich wurden 1,5 ml FCS dem Röhrrchen zugefügt und die Mischung 20 Minuten lang bei 37°C stehen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren gesammelt und in 40 ml D-MEM-Medium suspendiert, enthaltend FCS (15%), Natriumpyruvat (0,05 mg/ml), Insulin (0,2 E/ml), Oxalessigsäure (0,15 mg/ml), Azaserin (1 µg/ml) und Hypoxanthin

(100 µM), wobei das genannte Medium nachfolgend als «HA-Z-selektives Medium» bezeichnet wird. Die Suspension wurde auf Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon Nr. 3040) in einer Menge von 100 µl/Platte gegeben, so dass eine Vertiefung $6,5 \times 10^4$ Myelomzellen aufnahm. Die jeweiligen Mikroplatten wurden vorher mit 100 µl der Suspension gegen das vorstehend genannte Medium belegt, so dass jede Vertiefung Maus-BALB/c Milzzellen (1×10^5) und Maus-BALB/c-peritoneale Exudatzellen (1×10^4) enthalten konnte. Die Platten waren bei 37°C einen Tag lang unter 5% CO₂ inkubiert worden. Die Mikroplatten wurden bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert, und die Hälfte des Kulturmediums wurde durch HAZ-Selektionsmedium in Intervallen von zwei oder drei Tagen ersetzt. Nach einer Woche wurde die Hälfte des Kulturmediums durch H-Medium ersetzt, das azaserinfreies, HAZ-selektiven Medium entspricht. Danach wurde die Hälfte des Mediums durch azaserin- und hypoxanthinfreies, Hybridom kultivierendes D-MEM-Medium in Abständen von zwei oder drei Tagen ersetzt, wobei das Medium ein D-MEM-Medium ist, das FCS (15%), Natriumpyruvat (0,05 mg/ml), Insulin (0,2 E/ml) und Oxalessigsäure (0,15 µg/ml) enthält. Die Produktion von Antikörper auf P. aeruginosa-Oberflächenantigen wurde durch Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) an Kulturüberständen der Vertiefungen bestimmt, die zum Zeitpunkt von drei Wochen nach der Zellfusion Zellwachstum zeigten, wobei Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon Nr. 3912), an die P. aeruginosa durch Glutaraldehyd fixiert wurde, verwendet wurden. Es wurden die Standardstämme von P. aeruginosa von 17 verschiedenen Serotypen gemäß Homma's Klassifizierung in diesem Versuch eingesetzt, welche vom Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, oder von ATCC erhältlich sind. Der Versuch offenbarte, dass in einer Vertiefung ein IgM-Antikörper erzeugt wurde, der in starkem Masse mit mehreren Standardstämmen von P. aeruginosa verschiedener Serotypen reagiert. Das Heterohybridom in der Vertiefung wurde weitergezüchtet und mit Hilfe der limitierenden Verdünnung kloniert, wodurch eine als MH-4H7 bezeichnete Zelllinie erhalten wurde, die einen Human-IgM-Antikörper in stabiler Form erzeugt. Die Bezeichnung «MH-4H7» kann hier ebenfalls als Name des humanen monoklonalen Antikörpers verwendet werden, der durch die Zelllinie MH-4H7 erzeugt wird. Das Hybridom MH-4H7 wurde unter der Hinterlegungsnummer FERM P-9996 am 19.April 1988 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, in Tsukuba, Ibaraki-ken, Japan, hinterlegt. Diese Hinterlegung wurde am 26. April 1989 in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag umgewandelt und erhielt die Hinterlegungsnummer FERM BP-2402. Der humane monoklonale Antikörper MH-4H7 war ein IgM (µ, lambda).

Ein dem vorgenannten ähnliches IgM-produzierendes Hybridom wurde von einem anderen Donor, dessen Serum einen hohen Antikörpertiter auf P. aeruginosa-Oberflächenantigen zeigte, durch Abtrennung von Lymphocyten, Aktivierung von spezifischen B-Zellen in vitro und die vorstehende Zellfusion erhalten.

BEISPIEL 2

Untersuchung des Bindungsspektrums des humanen monoklonalen Antikörpers MH-4H7 durch ELISA.

(1) Messung von Anti-P. aeruginosa-Antikörper durch ELISA

Der Antikörpertiter gegen P. aeruginosa-Oberflächenantigen wurde wie folgt gemessen. P. aeruginosa wurde in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) (pH 7,2; enthaltend 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 2,99 g/l NaHPO₄, 12H₂O und 0,2 g/l KH₂PO₄) suspendiert, um ein Absorptionsvermögen von 0,2 bei einer Wellenlänge von 600 nm zu ergeben. Die Suspension wurde in Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon Nr. 3912) in einer Menge von 50 µl/Vertiefung gegeben, dann wurde bei 2000 Upm 15 Minuten lang zentrifugiert. 2%-iger Glutaraldehyd wurde jeder Vertiefung in einer Menge von 50 µl/Vertiefung zugefügt, um die Bakterienzelle an die Mikroplatte zu fixieren. Nach Entfernen der Bakteriensuspension aus den Mikroplatten wurde die Mikroplatte mit 3%-iger PBS-Lösung, enthaltend Rinderserumalbumin (BSA), mit einer Menge von 120 µl/Vertiefung belegt und bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert, um den ungebundenen Teil der Assay-Platte zu blockieren. Die sich ergebende Mikroplatte wurde als die mit Antigenen beschichtete Platte im nachfolgenden Verfahrensschritt verwendet. Gewünschtenfalls kann eine solche Mikroplatte bei -20°C gelagert werden.

Vor dem Assay wurde die Mikroplatte mit 0,05%-igem Tween 20, enthaltend PBS-Lösung (PBST), dreimal gewaschen. PBST wurde in die Vertiefungen in einer Menge von 50 µl/Vertiefung gegeben, es wurde eine Probe (Serum, Ascites oder Kulturüberstand), gegebenenfalls verdünnt mit PBS, in einer Menge von 50 µl/Vertiefung zugefügt, dann erfolgte 2stündige Inkubation bei 37°C. Die Probe wurde von der Platte entfernt, die dreimal mit PBST gewaschen wurde. Alkalischer phosphatase-konjugierter affinitätsgereinigter Ziegen-Anti-Human-Immunglobulin-Antikörper (Kirkegaard & Perry Lab. Inc.) (sekundärer Antikörper), verdünnt mit PBS-Lösung enthaltendem 1%-igen BSA, wurde der Mikroplatte in 500- bis 1000fachem Überschuss in einer Menge von 100 µl-/Vertiefung zur 2stündigen Inkubation bei 37°C zugefügt. Zur Messung des IgG-Antikörpertiters und des IgM-Antikörpertiters wurden alkalischer phosphatase-konjugierter Ziegen-Anti-Human-IgG-Antikörper bzw. alkalischer phosphatase-konjugierter Ziegen-Anti-Human-IgM-Antikörper verwendet. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers wurde die Mikroplatte dreimal mit PBST gewaschen. Eine Substratlösung, d.h. eine wässrige Lösung, enthaltend Natrium-p-nitrophenylphosphat (3 mg/ml) in 10%igem Diethanolamin-Puffer (pH 9,1), enthaltend 0,2 mg/ml NaN₃ und 0,1 mg/ml MgCl₂.6H₂O, wurden der Mikroplatte in einer Menge von

CH 681 012 A5

100 µl/Vertiefung zugefügt, worauf die Reaktion bei 37°C erfolgte. Die Bindungsaktivität des Antikörpers (OD₄₀₅) wurde an Multiskan® (Titertek) gemessen.

5 (2) Bindungsvermögen von MH-4H7 an Serotyp-Standardstämme von *P. aeruginosa*.

Das Bindungsvermögen von MH-4H7 an die Serotyp-Standardstämme von *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe von ELISA untersucht, wie in Beispiel 2(1) beschrieben. Die Stämme wurden vom Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, erhalten und in Herzinfusions-Agarmedium gezüchtet. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

10

Tabelle 2:
Bindungsaktivität von MH-4H7 an Serotyp-Standardstämme von *P. aeruginosa*
gemäss der Klassifizierung des Japanischen Komitees

15

| Serotyp | Stamm | ELISA-Wert |
|---------|----------------------|------------|
| A | IID 1001 (ATCC27577) | 1,78 |
| B | IID 1002 (ATCC27578) | 0 |
| B | IID 1007 (ATCC27583) | 0 |
| 20 B | IID 1013 (ATCC27589) | 0 |
| B | IID 5004 | 0 |
| C | IID1021 | 0 |
| D | IID 1004 (ATCC27580) | 0 |
| 25 E | IID 1130 | 0 |
| F | IID 1006 (ATCC27582) | 1,77 |
| G | IID 1008 (ATCC27584) | 1,88 |
| 30 G | IID 1020 | 1,98 |
| H | IID 1009 (ATCC27585) | 1,33 |
| I | IID 1010 (ATCC27586) | 0 |
| J | IID 1011 (ATCC27587) | 0 |
| 35 K | IID 1012 (ATCC27588) | 1,80 |
| L | IID 5141 | 0 |
| M | IID 5018 | 0 |
| M | IID 1015 | 0 |

40

Die Tabelle 2 zeigt, dass MH-4H7 selektiv an die Serotyp-Standardstämme der Typen A, F, G, H und K von *P. aeruginosa* gebunden wurde.

45

(3) Bindungsvermögen von MH-4H7 an klinische Isolate.

Im vorstehenden Versuch wurde gezeigt, dass MH-4H7 an die Serotyp-Standardstämme der Typen A, F, G, H und K gebunden werden kann. Demzufolge wurde das Bindungsvermögen von MH-4H7 an mehrere klinische Isolate dieser Serotypen als auch der Typen B, E, I und M, die klinisch mit hoher Frequenz isoliert werden, untersucht. Als Ergebnis wurde MH-4H7 an klinische Isolate vom Typ A (70%), Typ F (80%), Typ G (86%), Typ H (60%), Typ K (75%) und Typ M (45%) gebunden, wie in Tabelle 3 gezeigt. Klinische Isolate der Typen B, E und I (jeweils 20 Stämme) wurden nicht an MH-4H7 gebunden.

55

60

65

CH 681 012 A5

Tabelle 3:
Bindungsaktivität von MH-4H7 an klinische Isolate

| | Serotyp | Stamm | ELISA-Wert (OD405) |
|----|---------|----------|--------------------|
| 5 | A | sp 6745 | 0,53 |
| | | sp 6746 | 1,46 |
| | | sp 6783 | 1,10 |
| | | sp 6818 | 2,03 |
| 10 | | sp 6830 | 0,13 |
| | | sp 6840 | 1,17 |
| | | sp 6708a | 1,82 |
| | | sp 9710 | 1,67 |
| 15 | | sp 9711 | 1,07 |
| | | sp 9731 | 0 |
| | | sp 9762 | 0 |
| | | sp 9763 | 0 |
| 20 | | sp 9768 | 1,26 |
| | | sp 9780 | 1,75 |
| | | sp 10029 | 0,33 |
| | | sp 10040 | 0 |
| 25 | | sp 10060 | 0,39 |
| | | sp 10648 | 1,78 |
| | | sp 10676 | 0 |
| | | | |
| 30 | F | sp 6770 | 2,15 |
| | | sp 6771 | 0 |
| | | sp 6808 | 0,49 |
| | | sp 6851 | 2,24 |
| | | sp 6921 | 1,53 |
| | | | |
| 40 | G | sp 9701 | 2,23 |
| | | sp 9709 | 2,31 |
| | | sp 9712 | 0 |
| | | sp 9714 | 2,29 |
| 45 | | sp 9717 | 0,06 |
| | | sp 9718 | 2,28 |
| | | sp 9738 | 2,23 |
| | | sp 9785 | 1,29 |
| 50 | | sp 9743 | 2,31 |
| | | sp 9792 | 1,98 |
| | | sp 9755 | 2,26 |
| | | sp 9761 | 0 |
| 55 | | sp 9767 | 2,45 |
| | | sp 9772 | 2,33 |
| | | GN 11187 | 2,44 |
| | | TL 2378 | 2,33 |
| 60 | | TL 2424 | 2,43 |
| | | | |

CH 681 012 A5

**Tabelle 3 (Fortsetzung):
Bindungsaktivität von MH-4H7 an klinische Isolate**

| | Serotyp | Stamm | ELISA-Wert (OD ₄₀₅) |
|----|---------|----------|---------------------------------|
| 5 | | sp 6788 | 2,44 |
| | | sp 9728a | 2,44 |
| 10 | H | sp 6896 | 0 |
| | | sp 6931 | 0 |
| | | sp 7503 | 2,23 |
| | | sp 7507 | 2,44 |
| | | sp 7514 | 2,42 |
| 15 | | sp 7520 | 2,40 |
| | | sp 7522 | 0 |
| | | sp 7532 | 0 |
| | | sp 7555 | 2,42 |
| 20 | | sp 10054 | 0 |
| | | sp 10068 | 0,04 |
| | | sp 10678 | 2,06 |
| | | sp 10681 | 1,71 |
| 25 | K | sp 9751 | 1,96 |
| | | sp 7861 | 0,06 |
| | | sp 7873 | 1,96 |
| 30 | M | sp 9716 | 0 |
| | | sp 9730 | 0 |
| | | sp 9744 | 0,03 |
| | | sp 9748 | 0 |
| | | sp 9749 | 0,44 |
| 35 | | sp 9752 | 0 |
| | | sp 9775 | 0 |
| | | sp 10067 | 2,19 |
| | | sp 10675 | 0 |
| 40 | | sp 6763 | 2,29 |
| | | sp 6764 | 2,24 |
| | | sp 6765 | 2,22 |
| | | sp 6782 | 0,85 |
| 45 | | sp 6794 | 0,59 |
| | | sp 6833 | 0 |
| | | sp 6852 | 2,31 |
| | | sp 6890 | 0 |
| 50 | | sp 6892 | 2,15 |
| | | sp 6895 | 0 |
| | | sp 6908 | 1,02 |
| | | | |
| 60 | | | |

BEISPIEL 3

Untersuchung der Agglutinierungsaktivität des humanen monoklonalen Antikörpers MH-4H7 an Serotyp-Standardstämme von *P. aeruginosa*

Die Agglutinierungsaktivität von MH-4H7 an mit Formalin behandelte Serotyp-Standardstämme von *P. aeruginosa* wurde gemessen und ausgedrückt durch eine Minimum-Agglutinierungskonzentration des Antikörpers. Jeder der in Tabelle 4 aufgelisteten Standardstämme wurde auf Herzinfusions-Agarmedium, das mit 1%-igem Formalin behandelt worden war, gezüchtet und bei 37°C über Nacht stehengelassen. Die sich ergebenden abgetöteten Zellen wurden in PBS(-) suspendiert, um ein Absorptionsvermögen von 0,2 bei einer Wellenlänge von 600 nm zu ergeben. 50 µl-Anteile der Suspension wurden in Mikroplatten mit 96 U-förmigen Vertiefungen (Sumitomo Bakelite) gegeben. Den Platten wurden MH-4H7-Lösungen (jeweils 50 µl) in 2facher Serenverdünnung zugefügt. Als Vergleich wurden Lösungen, enthaltend einen humanen monoklonalen Antikörper, d.h. Anti-B-Typ-hMcAb (IgM), der O-Antigen vom Typ B erkennt, anstatt der MH-4H7-Lösungen zugegeben. Die Reaktionsmischungen wurden über Nacht bei 4°C stehengelassen, und es wurde die An- oder Abwesenheit von Agglutinierung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4:
Minimum-Agglutinierungskonzentration von MH-4H7

| Antikörper | Stämme (Serotyp) | Minimum-Agglutinierungskonzentration |
|------------------|------------------|--------------------------------------|
| MH-4H7 | IID 1001 (A) | 2,3 µg/ml |
| | IID 1006 (F) | 2,5 µg/ml |
| | IID 1020 (G) | 5,0 µg/ml |
| | IID 1009 (H) | 2,5 µg/ml |
| | IID 1012 (K) | 1,25 µg/ml |
| | IID 1002 (B) | n.b.* |
| Anti-B-Typ-hMcAb | IID 1002 (B) | 1,25 µg/ml |

* nicht bestimmt; > 25 µg/ml

MH-4H7 zeigte Agglutinierungsaktivität an bindungs-positive Stämme, ermittelt durch ELISA (Tabelle 2), derselben Grösse wie der Anti-B-Typ-hMcAb an den Stamm von Serotyp B, obwohl sich die Grösse von Stamm zu Stamm etwas unterscheidet.

BEISPIEL 4

Charakterisierung der Erkennungsstelle des humanen monoklonalen Antikörpers MH-4H7 mit Hilfe der Western-Blotting-Analyse.

(1) Western-Blotting-Analyse von Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharide wurden aus Serotyp-Standardstämmen von *P. aeruginosa*, IID1001 (Typ A) und IID1020 (Typ G), gemäss dem von Westphal & Jann beschriebenen Verfahren gesammelt (Methods Carbohydr. Chem., 5, 83–91, (1965)). Auf diese Weise wurden *P. aeruginosa* bis zur späten exponentiellen Phase in Herzinfusions-Nährmedium (Nisuu Pharmaceuticals) gezüchtet und die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt. Die nassen Zellen wurden mit 45%-igem Phenol bei 68°C behandelt und bei 3000 Upm 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 10°C zentrifugiert, wobei Lipopolysaccharide in die wässrige Schicht extrahiert wurden. Die wässrige Schicht wurde mit Cetyltrimethylammoniumbromid behandelt, um Nukleinsäuren zu entfernen, und mit Ethanol gefällt, um Lipopolysaccharide zu ergeben.

Die aus IID1001 und IID1020 erhaltenen Lipopolysaccharide wurden jeweils mit einer Pufferprobe, enthaltend Tris-Puffer (31 mM), pH 6,8, SDS (1,5%), Glycerin (5%), Mercaptoethanol (2,5%) und Bromphenol Blau (0,005%), bei 100°C 5 Minuten lang behandelt, einer Elektrophorese an 12,5%-igem Polyacrylamidgel, enthaltend 0,2% SDS, unterworfen und auf einen Durapore®-Filter (Millipore) gegeben. Die Bindungsstelle des humanen monoklonalen Antikörpers MH-4H7 wurde an der Membran durch ein enzym-markiertes Antikörper-Färbeverfahren unter Verwendung des alkalischen phosphatase-konjugierten Ziegen-Anti-Human-IgM-Antikörpers (Kirkegaard & Gaithersburg Perry Lab. Inc.) identifiziert. Als phoretisches Bestimmungsmuster von LPS wurde dieselbe Testprobe in derselben Weise einer Elektrophorese unterworfen, das Gel wurde durch Silberfärbung mit Hilfe eines Bio-Rad-Kits entwickelt.

Die Silberfärbung zeigt im Bereich höheren Molekulargewichtes die Anwesenheit einer Gruppe von Banden in Leiterform gemäss LPS vom glatten Typ, das O-Polysaccharid enthält, an. Die charakteristischen Banden können der Heterogenität der Anzahl der sich wiederholenden Einheit des O-Polysaccharids zugeordnet werden. Einzelne breite oder einige wenige Banden, die man im Bereich niedrigeren Mo-

CH 681 012 A5

lekulargewichtetes beobachtet, werden LPS vom R-Typ oder vom SR-Typ zugeordnet, bei denen O-Polysaccharid fehlt oder die nur einige wenige, sich wiederholende Einheiten aufweisen.

Als Ergebnis wurde in beiden Stämmen von IID1001 und IID1020 an der Stelle der Lipopolysaccharide vom R-Typ oder SR-Typ, denen O-Polysaccharid überhaupt fehlt oder die ein kurzes O-Polysaccharid aufweisen, eine starke Farbentwicklung beobachtet. Eine positive Reaktion mit MH-4H7 wurde nicht beobachtet, und es trat lediglich eine schwache Farbentwicklung in dem Bereich auf, der den Banden in Leiterform entspricht, die durch die Silberfärbung entdeckt werden, wobei LPS vom glatten Typ mit einer Struktur von sich wiederholenden O-Polysacchariden umfasst wird.

10 (2) Western-Blotting-Analyse SDS-behandelter Zellen:

Wester-Blotting wurde an SDS-behandelten Zellen von Serotyp-Standardstämmen von *P. aeruginosa*, IID1001 (Typ A), IID1006 (Typ F), IID1008 (Typ G), IID1020 (Typ G), IID1009 (Typ H) und IID1012 (Typ K) durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils in Herzinfusions-Nährmedium gezüchtet, in dem in Beispiel 3(1) beschriebenen Puffer suspendiert und bei 100°C 30 Minuten lang einer SDS-Behandlung unterworfen. Die so erhaltene Probe wurde an 12,5%-igem Polyacrylamidgel, enthalten 0,2% SDS, mit der Anwendungsmenge der Probe, die 2 mg nassen Zellen entspricht, einer Elektrophorese unterworfen und in derselben Weise wie in Beispiel 3(1) auf ein Durapore®-Filter gegeben. Die enzym-markierte Antikörperfärbung wurde an diesem Filter durchgeführt. In jedem Stamm wurde eine Farbentwicklung durch die Wirkung von MH-4H7 nur in dem Bereich beobachtet, der dem R-Typ- oder SR-Typ-Lipopolysaccharid entspricht, und der Bereich höheren Molekulargewichtes ergab keine Farbentwicklung.

BEISPIEL 5

25 Abtrennung und Fraktionierung von Polysaccharid- und Lipid-A-Anteilen von LPS von *P. aeruginosa* und Untersuchung des Bindungsvermögens der sich ergebenden Fraktionen an den humanen monoklonalen Antikörpern MH-4H7

30 (1) Abtrennung des Polysaccharidanteils vom LPS von *P. aeruginosa* IID1001:

Gemäss dem Verfahren von Wilkinson & Galbraith (Eur. J. Biochem., 52, 331 (1975)) wurde der Polysaccharidanteil aus LPS von *P. aeruginosa* IID1001 abgetrennt und das erhaltene Polysaccharid fraktioniert. Das heisst, LPS (10 mg) wurde in 1%-iger Essigsäure gelöst und bei 100°C 90 Minuten lang erhitzt, um die Ketosebindung im 2-Keto-3-desoxyoctonat (KDO)-Rest, die im inneren Kern von LPS vorliegt, selektiv zu hydrolysieren. Die Reaktionsmischung wurde mit Chloroform extrahiert, um eine Lipid-A-Präparation zu erhalten. Zur Fraktionierung wurde die Mutterlauge, aus der freies Lipid A somit entfernt worden war, einer Sephadex® G-50-Säulenchromatografie (Pharmacia, Uppsala) (Säulenabmessung: 1 x 70 cm), äquilibriert mit 50 mM Pyridin/Acetatpuffer, pH 5,5, unterworfen. Die Elution von O-Polysaccharid, SR-Kernoligosaccharid und R-Kernoligosaccharid wurde durch die nachfolgend beschriebene, colorimetrische Bestimmung entdeckt.

Neutrale Zucker wurden durch die Phenol-Schwefelsäure-Methode (M. Dubois et al, Anal. Chem. 28, 350 (1956)) entdeckt. Aminozucker wurden entdeckt, indem man die Probe mit 2 N H₂SO₄ bei 100°C 2 Stunden lang hydrolysierte und das hydrolysierte Produkt dem MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochlorid)-Verfahren unterwarf (A. Tsuji et al, Chem. Pharm. Bull. 17, 217 (1969)). Das Polysaccharid und die Kernoligosaccharide vom R-Typ und SR-Typ wurden durch Lyophilisierung der relevanten Fraktionen gewonnen.

45 (2) Bindungsvermögen von MH-4H7 an die jeweilige von Lipopolysaccharid abgeleitete Fraktion

50 Es wurde die kompetitive Reaktion in ELISA zur Untersuchung des Bindungsvermögens von MH-4H7 an die jeweiligen Fraktionen herangezogen, die das Polysaccharid, das SR-Kernoligosaccharid, das R-Kernoligosaccharid und das Lipid A aus *P. aeruginosa* IID1001 enthalten, welche alle in Beispiel 4(1) erhalten wurden. Somit wurde eine Mischung des Kompetitors und des Antikörpers bei 37°C 1 Stunde lang inkubiert und ELISA unterworfen, wobei Mikroplatten mit 96 Vertiefungen verwendet wurden, die mit *P. aeruginosa*-Zellen belegt worden waren, wobei die Inhibitionsrate gemessen wurde. Die Menge der Kompetitoren entsprach derjenigen von 100 nmol der neutralen Zucker gemäss der in Beispiel 4(1) genannten Phenol-Schwefelsäure-Bestimmung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

60

65

5 Tabelle 5:
Bindungsvermögen von MH-4H7 an Fraktionen von Polysaccharid und
Kernoligosaccharide vom R-Typ und SR-Typ

| Kompetitive Substanz | Inhibierungsrate (%) |
|--------------------------------|----------------------|
| Polysaccharide | 0 |
| Kernoligosaccharide vom SR-Typ | 72 |
| Kernoligosaccharide vom R-Typ | 99 |

10 Bei Verwendung von Lipid A als Kompetitor in einer höheren Dosis als 50 µg/ml wurde im ELISA eine Inhibition nicht beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt an, dass MH-4H7 an Lipid A nicht gebunden wird.

15 Dieser Versuch offenbarte, dass MH-4H7 an das Kernoligosaccharid vom R-Typ, dem O-Polysaccharid fehlt, sowie an das Kernoligosaccharid vom SR-Typ, das eine sich wiederholende Einheit von O-Polysaccharid besitzt, gebunden wird. Deshalb befindet sich die Antigendeterminante (Epitop) von MH-4H7 am Kernteil von LPS von *P. aeruginosa*.

20 Wie in Beispiel 5(1) angeführt, wurde der KDO-Rest mittels Essigsäure während der Abtrennung der Polysaccharide hydrolysiert. Demzufolge zeigt die Bindung von NH-4H7 an die Kernfraktion, dass das Epitop von MH-4H7 nicht mit einem KDO-Rest im inneren Kernteil assoziiert ist.

BEISPIEL 6

25 Bindungsvermögen des humanen monoklonalen Antikörpers MH-4H7 an LPS verschiedener gram-negativer Bakterien

30 Das Bindungsvermögen von MH-4H7 an LPS verschiedener gram-negativer Bakterien, und zwar andere als *P. aeruginosa*, wurde durch die kompetitive Reaktion im ELISA untersucht, wie in Beispiel 5(2) beschrieben. Als ein festes Antigen wurden Mikroplatten mit 96 Vertiefungen verwendet, an die *P. aeruginosa* IID1020-Zellen (Typ G) fixiert worden waren. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 6-(1) aufgeführt. Die Intensität der Bindung wird durch die Inhibierungsrate der Farbentwicklung im ELISA gezeigt. Die Konzentration des Kompetitors betrug 50 µg/ml. Lipopolysaccharide aus *Escherichia coli* J5, *E. coli* 0111:84, *Salmonella minnesota* R595 und *S. minnesota-wilder*-Typ wurden von List Biological Laboratories Inc., Campbell, erhalten. Lipopolysaccharide aus *P. aeruginosa* IID1001 (Typ A) und IID1020 (Typ G) wurden durch Phenolextraktion hergestellt, wie in Beispiel 4(1) dargelegt.

35 Tabelle 6-(1):
Bindungsvermögen von MH-4H7 an LPS aus verschiedenen gramnegativen Bakterien (1)

| Ursprung von LPS | Chemotyp | Konzentration (µg/ml) | Inhibierungsrate (%) |
|---------------------------------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| <i>E. coli</i> J5 | R _c | 50 | 0 |
| <i>E. coli</i> 0001:B4 | S | 50 | 0 |
| <i>S. minnesota</i> R595 | R _e | 50 | 0 |
| <i>S. minnesota</i> wild | S | 50 | 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> IID 1001 (Typ A) | S | 50 | 91 |
| <i>P. aeruginosa</i> IID 1020 (Typ G) | S | 50 | 98 |

50 Tabelle 6-(1) zeigt, dass MH-4H7 weder an R-Typ-LPS, erhalten von *E. coli* J5 und *S. minnesota* R595, noch an S-Typ-LPS, erhalten von deren Ursprungsstamm, gebunden wird. Angesichts der Versuchsergebnisse aus Beispiel 5(2) wird gefolgt, dass das Epitop von MH-4H7 nicht im LPS-Teil, der Enterobacteriaceae gemeinsam ist, wie der inneren Kernkomponente, bestehend aus Heptose und KDO oder Lipidkomponente, sondern in der für *P. aeruginosa* charakteristischen äusseren Kernkomponente angeordnet ist.

55 In Übereinstimmung mit der vorstehenden Verfahrensweise wurden zusätzliche Untersuchungen unter Verwendung anderer gram-negativer Bakterien, die in Tabelle 6-(2) aufgelistet sind, durchgeführt. Die eingesetzten LPS-Proben wurden von List Biological Laboratories Inc., Campbell, erhalten, *Pseudomonas fluorescens* wurde von Ribi Immunochem-Research Inc., Hamilton, gekauft. Die LPS-Konzentration betrug ohne Ausnahme 50 µg/ml. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 6-(2) aufgeführt.

Tabelle 6-(2):
Bindungsvermögen von MH-4H7 an LPS aus verschiedenen gramnegativen Bakterien (2)

| | Ursprung von LPS | Inhibierungsrate (%) |
|----|------------------------------------|----------------------|
| 5 | Escherichia coli D31m4 | 0 |
| | Escherichia coli K235 | 0 |
| | Escherichia coli 026:B6 | 98 |
| 10 | Escherichia coli 055:B5 | 11 |
| | Escherichia coli 0127:B8 | 0 |
| | Salmonella typhimurium | 0 |
| | Klebsiella pneumoniae | 0 |
| 15 | Yersinia enterocholitica | 2 |
| | Vibria cholerae Inaba 569B | 0 |
| | Serratia marcescens | 0 |
| | Pseudomonas fluorescens | 0 |
| 20 | Pseudomonas aeruginosa (F-D Typ 1) | 100 |

Wie vorstehend gezeigt, übt MH-4H7 eine Kreuzreaktion mit LPS aus E. coli 026:B6, und zwar in starkem Masse, und mit LPS aus E. coli 055:B5, und zwar in schwachem Masse, jedoch keine Reaktion mit LPS aus anderen Bakterien aus. Das bedeutet, dass diese beiden Stämme von E. coli, insbesondere Serotyp (026)-Stämme von E. coli, eine chemische Struktur im LPS-Teil aufweisen, der dem in der äusseren Kernkomponente des LPS von P. aeruginosa gemeinsam ist, wobei die Struktur zur Bindung an den monoklonalen Antikörper MH-4H7 befähigt ist.

30 BEISPIEL 7

Therapeutischer Effekt des Antikörpers MH-4H7 auf experimentelle P. aeruginosa-Infektionen in Mäusen

Es wurde der therapeutische Effekt des humanen monoklonalen Antikörpers MH-4H7 auf experimentelle Infektionen bei Mäusen, hervorgerufen durch klinische Isolate von P. aeruginosa, zwei Stämme vom Typ A und vier Stämme vom Typ G, untersucht. ICR-slc-Mäuse (4 Wochen alt, männlich, 10 Tiere pro Gruppe) wurden intraperitoneal mit einer Suspension, enthaltend die Zelle und 5% Mutin, inkokuliert. Nach 1 Stunde wurde der Antikörper MH-4H7 (0,1 µg/Maus) intraperitoneal verabreicht. Die Beurteilung des therapeutischen Effektes wurde auf der Grundlage der Überlebensrate nach einer Woche vorgenommen. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 7 gezeigt, woraus ersichtlich ist, dass der Antikörper MH-4H7 zur Behandlung experimenteller Infektionen, die durch mehrere Stämme von P. aeruginosa vom Serotyp A und G hervorgerufen wurden, wirksam ist.

45 TABELLE 7-(1): Therapeutischer Effekt von MH-4H7 auf klinische Isolate von P. aeruginosa von Serotyp A

| 50 Dosis (µg/Maus) | Überlebensrate (%) | | Inokulierte Menge: (CFU/Maus) | |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | sp6818 $4,5 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^5$ | IID1001 $1,5 \times 10^6$ | $7,3 \times 10^6$ |
| 55 0,1 | 80 | 70 | 80 | 40 |
| 60 --- | 50 | 10 | 20 | 10 |

TABELLE 7-(2): Therapeutischer Effekt von MH-4H7 auf klinische Isolate
von *P. aeruginosa* von Serotyp G (1)

| Dosis (ug/Maus) | Überlebensrate (%) | | Inokulierte Menge: (CFU/Maus) | |
|--------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | sp 6788 $3,0 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^5$ | sp 9701 $1,3 \times 10^6$ | $5,1 \times 10^6$ |
| 0,1 | 100 | 90 | 100 | 90 |
| --- | 30 | 0 | 60 | 20 |

TABELLE 7-(3): Therapeutischer Effekt von MH-4H7 auf klinische Isolate
von *P. aeruginosa* von Serotyp G (2)

| Dosis (ug/Maus) | Überlebensrate (%) | | Inokulierte Menge: (CFU/Maus) | |
|--------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | sp 9785 $1,3 \times 10^6$ | $5,1 \times 10^6$ | sp 9755 $4,6 \times 10^3$ | $1,1 \times 10^5$ |
| 0,1 | 100 | 50 | 90 | 70 |
| --- | 60 | 20 | 30 | 20 |

BEISPIEL 8
Identifikation des Epitops, erkannt durch den humanen monoklonalen Antikörper NH-4H7
(1) Bindungsvermögen von MH-4H7 auf eine Gruppe von *P. aeruginosa*-Mutanten, die einen Mangel im LPS-Teil aufweisen, der von *P. aeruginosa* PAC1 abgeleitet ist.

Das Epitop, das in der äusseren Kernkomponente von LPS angeordnet ist und durch MH-4H7 erkannt wird, wurde identifiziert durch die Verwendung von *P. aeruginosa*-Stämmen PAC 608, PAC 557, PAC 556 und PAC 611, denen ein Teil der äusseren Kernkomponente fehlt, die vom *P. aeruginosa*-Stamm PAC1 oder PAC1R abgeleitet ist, wobei der Stamm PAC1R seinerseits wiederum von PAC1 abgeleitet ist. Die Stämme PAC1, PAC1R und die defekten Mutanten wurden von Pouline M. Meadow (London University College) erhalten. Die Stämme wurden jeweils auf Mikroplatten mit 96 Vertiefungen gegeben, in Übereinstimmung mit der Offenbarung in Beispiel 2(1), und ELISA unterworfen, um die Bindungsaktivität an MH-4H7 zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8-(1) aufgeführt.

55

60

65

Tabelle 8-(1):
Bindungsvermögen von MH-4H7 an *P. aeruginosa*-Mutanten, die einen Mangel
in der äusseren Kernkomponente von LPS aufweisen

| | Stamm | Chemotyp | ELISA-Wert (OD ₄₀₅) |
|----|-----------|----------|---------------------------------|
| 5 | PAC 1 | S | 0,30 |
| | PAC 1R | S | 0,25 |
| 10 | PAC 608 | SR | 1,11 |
| | PAC 557 | R | 1,13 |
| | PAC 556 | R | 0,02 |
| 15 | PAC 611 | R | 0,06 |
| | IID 1001* | S | 0,68 |

* normaler Vergleich

Die Strukturen der äusseren Kernkomponente von Lipopolysacchariden von PAC1R und den vorgenannten Mutanten sind bekannt (P.S.N. Rowe & P.M. Meadow, Eur. J. Biochem., 132, 329–333 (1983)). Der äussere Kern von LPS, der im Elternstamm PAC1R aufgefunden wird, besteht aus Galactosamin, Alanin, Glucose und Rhamnose. Dem Mutant PAC556, der keine Reaktion mit MH-4H7 zeigt, fehlt nur Rhamnose. Demzufolge wird gefolgert, dass das Epitop von MH-4H7 in der Nähe des Rhamnose-Restes oder des Galactosamin-Restes, durch den der Rhamnose-Rest substituiert ist, angeordnet ist.

(2) Bindungsvermögen von MH-4H7 an Monosaccharide und Derivate davon.

Zum Zwecke weiterer Untersuchungen der Beteiligung des Rhamnose-Restes am Epitop wurde das Bindungsvermögen von MH-4H7 an Monosaccharide und deren Derivate durch die ELISA-kompetitive-Reaktion in Übereinstimmung mit Beispiel 5(2) untersucht. Als ein immobilisiertes Antigen wurden Mikroplatten mit 96 Vertiefungen verwendet, auf die *P. aeruginosa* IID1001 (Typ A) fixiert wurde. Methylrhamnosid, einer der verwendeten Kompetitoren, wurde erhalten, indem man eine Mischung von Rhamnose und Methanol in Gegenwart von 1%-iger Salzsäure bei 100°C 4 Stunden lang erhielt. Das so erhaltene Methylrhamnosid enthielt ungefähr 90% alpha-Anomer. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 8-(2) aufgeführt.

Tabelle 8-(2):
Bindungsvermögen von MH-4H7 an Monosaccharide und Derivate davon

| | Monosaccharid | Konzentration (mM) | Inhibierungsrate (%)* |
|----|--------------------|--------------------|-----------------------|
| 40 | Methyl-L-rhamnosid | 500 | 100 |
| | | 50 | 22 |
| | L-Rhamnose | 500 | 50 |
| 45 | | 50 | 9 |
| | D-Glucose | 500 | 0 |

* Prozentsatz des ELISA-Wertes (OD₄₀₅) mit und ohne Kompetitor.

Tabelle 8-(2) zeigt, dass MH-4H7 spezifisch an Methylrhamnosid und Rhamnose gebunden wird. Demgemäß wird die Schlussfolgerung gezogen, dass das Epitop von MH-4H7 mit dem Rhamnose-Rest im äusseren Kernlipopolysaccharid einiger Stämme von *P. aeruginosa* tief assoziiert ist.

Patentansprüche

- 55 1. Humaner monoklonaler Antikörper, der prophylaktische und therapeutische Wirkung auf infektiöse Krankheiten besitzt, die durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufen sind, wobei sich das Epitop in der äusseren Kernkomponente von LPS von *Pseudomonas aeruginosa* befindet.
2. Humaner monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er das Epitop in LPS, welches *P. aeruginosa*-Stämmen des Serotyps A, F, G, H, K und M, klassifiziert gemäss der Klassifizierung des Japanischen Komitees, gemeinsam ist, erkennt.
- 60 3. Humaner monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sich das Epitop in der Nähe des Rhamnose- oder Galactosamin-Restes in der äusseren Kernkomponente von LPS von *P. aeruginosa* befindet.
4. Humaner monoklonaler Antikörper gemäss Anspruch 1 oder 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass er gegenüber LPS, das aus *Escherichia coli*-Stämmen des Serotyps 026 stammt, reaktiv ist.

CH 681 012 A5

5. Humaner monoklonaler Antikörper gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass er ein IgM ist.
6. Humane Immunoglobulin-Präparation, die eine wirksame Menge mindestens eines humanen monoklonalen Antikörpers gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.
- 5 7. Prophylaktisches oder therapeutisches Mittel, das eine wirksame Menge mindestens eines humanen monoklonalen Antikörpers gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.
8. Hybridom, das zur Herstellung des humanen monoklonalen Antikörpers gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5 befähigt ist.
9. Hybridom MH-4H7 nach Anspruch 8 hinterlegt unter der Bezeichnung FERM BP-2402.
10. Verfahren zur Herstellung eines humanen monoklonalen Antikörpers nach Anspruch 1, wobei man ein Hybridom durch Zellfusion von Human-Lymphocyt-B-Zellen, die zur Herstellung des gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5 definierten Antikörpers befähigt sind, mit Heteromyelomzellen aus humanen und Mäuse-Zellen herstellt, das genannte Hybridom züchtet und den erzeugten Antikörper aus dem Kulturerstand gewinnt.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man das Hybridom MH-4H7 nach Anspruch 9 herstellt und züchtet und den erzeugten Antikörper aus dem Kulturerstand gewinnt.
12. Humaner monoklonaler Antikörper MH-4H7, hergestellt gemäss dem Verfahren nach Anspruch 11.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65