

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

202 927 B

(21) A bejelentés száma: 1986/85
(22) A bejelentés napja: 1985.05.24.
(30) Elsőbbségi adatok:
614 184 1984.05.25. US
(83) Letétbe helyezés: ATCC CRL 8752-8754; ATCC CRL
8119; ATCC CRL 8562; ATCC 33348-33364; ATCC
8047; ATCC CRL 8795-97

(51) Int. Cl.⁵

C 12 P 21/08

A 61 K 39/40

C 12 N 5/10

(40) A közzététel napja: 1986.04.28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991.04.29. SZKV 91/04

(72) Feltalálók:

Lostrom, Mark E., Redmond, Washington (US)
Siadak, Anthony W., Seattle, Washington (US)

(73) Szabadalmas:

Genetic Systems Co., Seattle, Washington (US)

(54) **Eljárás humán monoklonális antitestek előállítására gram-negatív
baktériumok szerotípusos lipopoliszacharid-determinánsai ellen**

(57) KIVONAT

Transzformált humán limfocita sejtvonalat hoztak létre, amely gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid molekuláin levő szerotípusos determinánsok elleni humán monoklonális antitesteket választ ki. Ezekről az antitestekről úgy találták, hogy védő hatásúak a homológ baktériumok halálos kimenetes fertőzései ellen. A találmány foglalkozik az ilyen antitesteket magában foglaló gyógyászati készítmények előállításával is.

A leírás terjedelme: 20 oldal (ezen belül 1 ábra)

HU 202 927 B

A találmány tárgya eljárás monoklonális antitestek előállítására gram-negatív baktériumok szerotípusos lipopoliszacharid- determinánsai ellen. Ugyancsak a találmány tárgya eljárás az antitesteket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására.

A gram-negatív baktériumok által okozott betegségek és legsúlyosabb szövődményeik, pl. a bakterémia és endotoxémia, jelentős mértékben okoznak súlyos megbetegedést és elhalálást embereknél.

Az irodalomban leírt számos eset vizsgálata azt jelzi, hogy a gram-negatív baktériumokkal történő fertőzés bizonyos megnyilvánulásai, elsősorban halálos megnyilvánulásai bizonyos hajlamosító tényezőkre vezethetők vissza. Az ilyen fertőzések növekvő gyakorisága figyelhető meg idősebb betegeknel és olyan betegeknel, akik súlyos betegek, pl.- megégés, sebészeti trauma, lassan gyógyuló sebek, narkotikus életvitel vagy rosszindulatú daganatos betegségek. Ezek a fertőzések lehetnek orvosi kezelésből eredők (pl. kórházban szerettek) olyan betegekben, akik hosszan tartó, ismételt kórházi kezelésben részesülnek, és főleg azokban, akik sebészeti beavatkozásban véredényeken belüli műszer-használatban vagy beavatkozási műveletben, pl. vese-katéterezésben, citoszkópiában, gerincsapolásban, gégemetszésben vagy folyadék- és gyógyszer intravénás infúzióban részesülnek, vagy olyan betegekben, akiket immunuszuppresszív szerekkel kortikoszteroidokkal, antimetabolitokkal és/vagy antibiotikumokkal hosszú időn át kezelnek. A sugárkezelés emlős gazdaszervezetekben szintén hajlamosít a gram-negatív baktériumokkal történő fertőzésre.

A gram-negatív baktériumok által okozott betegségek terjesztésében leggyakrabban előforduló organizmusok közt találjuk az *Escherichia coli*-t, a *Klebsiella pneumoniae*-t, az *Enterobacter aerogenes*-t, a *Pseudomonas aeruginosa*-t, a *Serratia marcescens*-t és a *Proteus*, *Bacteroides*, *Providencia* és *Citrobacter* különböző törzseit (Sonnenwirth: „The Enteric Bacilli and Similar Gram-Negative Bacteria” (Enterobacillusok és hasonló gram-negatív baktériumok) *Microbiology*, 2. kiadás, 753–790 oldal, szerkesztők: Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., és McCarty, M.; kiadó: Harper és Row (1973); McCabe, W.R.: „Gram-Negative Bacteremia” (Gram-negatív bakterémia) *Adv. Intern. Med.* (1974) 19, 135–158; és Kreger és munkatársai: „Gram-Negative Bacteremia III. Reassessment of Etiology, Epidemiology and Ecology in 612 Patients” (Gram-negatív bakterémia III. Az etiológia, epidemiológia és ökológia újabb felmérése 612 betegben) *Am. J. Med.* (1980) 68, 332–343). Ezenkívül a *Pseudomonas* és *Klebsiella* más fajtái, valamint az *Aeromonas*, *Salmonella*, *Flavobacterium*, *Frwinia*, *Edwardsiella*, *Pectobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* és *Shigella* nemzetségek tagjai szintén jelentős mértékben részt vesznek a gram-negatív betegségek terjesztésében embereknél (Sonnenwirth, fentebb említett munka, McCabe, fentebb idézett munka, Kreger és munkatársai, fentebb idézett munka).

Az elmúlt néhány évtizedben az antibiotikumokat alkalmazták előszeretettel a gram-negatív baktérium-

eredetű betegségek visszaszorításában. A gram-negatív baktériumok okozta betegségek folyamatos elterjedése, nagy megbetegedési és halálozási gyakorisága azonban az antibiotikum-kezelés korlátozott lehetőségeit sugallják az ilyen organizmusok által okozott betegségek megelőzésében és kezelésében. Lásd pl. Andriole, V.T.: *Pseudomonas Bacteremia: Can Antibiotic Therapy Improve Survival?* (Pseudomonas bakterémia: Képes-e az antibiotikum-kezelés javítani a túlélést?) *J. Lab. Clin. Med.* (1978) 94, 196–199. Ez ösztönözte a kutatást más jellegű megelőzési és kezelési módszerek irányában.

Az emberek vagy kísérleti állatok aktív immunizálása teljes baktériumsejt vakcinákkal vagy tisztított bakteriális endotoxinokkal főleg a lipopoliszacharid molekulákon (LPS) jelen levő kémiai eltérő ismétlődő oligoszacharid determinánsok ellen irányuló fajlagos antitestek kifejlődéséhez vezet (Luderitz és munkatársai: *Immunochemistry of O and R Antigens of Salmonella and Related Enterobacteriaceae* (*Salmonella* és rokon *Enterobacteriaceae*-beli törzsek O és R antigénjeinek immunokémiája) *Bacteriol. Rev.* (1966) 30, 192–255; és Luderitz és munkatársai: *Isolation and Chemical and Immunological Characterization of Bacterial Lipopolysaccharides* (Baktérium-eredetű lipopoliszacharidok izolálása, valamint kémiai és immunológiai jellemzése), *Microbiol. Toxins*, 4. kötet, 145–233 oldal, szerkesztők: Weinbaum, G., Kadis, S., és Ajl, S.J., kiadó: Academic Press (1977), lásd 1. ábra. Ebben a tekintetben fontos megjegyezni, hogy az LPS molekula a legtöbb, ha nem az összes, gram-negatív baktérium külső sejtmembránja fő alkotórészeinek egyike (Nikaido, H.: *Biosynthesis and Assembly of Lipopolysaccharide* (Lipopoliszacharidok bioszintézise és kapcsolása) *Bacterial Membranes and Walls*, szerkesztő: Leive, L., kiadó: Marcel Decker (1973), lásd 2. ábra. A 1. ábra a lipopoliszacharid molekulák helyzetét bemutató gram-negatív sejt- külső membránját ábrázolja. Ez a modell mellőzi az olyan szerkezeteket, mint a tokok, burkok és nyálkarétegek.

A lipopoliszacharidok szintén szerves alkotórészei a bakteriális endotoxinoknak, az LPS molekulák A lipid részei felelősek a mélyreható patofiziológiai hatásokért (pl. láz, alacsony vérnyomás, széttartott érrendszeren belüli vérárvadás, sokk és esetleg halál) a gram-negatív bakteriális septicémia során fellépő vagy kísérletileg endotoxin-injekciókkal indukált endotoxin kibocsátással együtt (Westphal és munkatársai: *Chemistry and Immunochemistry of Bacterial Lipopolysaccharides as Cell Wall Antigens and Endotoxins*. (A bakteriális lipopoliszacharidok, mint sejtfa-antigének és az endotoxinok kémiája és immunokémiája). *Prog. Allergy* (1983) 33, 3–39. A 2. ábra mutatja be a gram-negatív lipopoliszacharidok három területét. Az O-fajlagos lánc terület hosszúláncú poliszacharid, amely ismétlődő oligoszacharid egységekből épül fel. Különböző baktérium-fajokban ezek az oligoszacharid-egységek 1 és 6–7 közötti mennyiségű monoszacharid egységet tartalmaznak. Az LPS szerotípusos determinánsai (lásd szöveg) a molekulának ezen a területén

vannak. A „belső” terület számos monoszacharidot tartalmaz olyan elrendezésben, amely viszonylag változatlan az egyik gram-negatív törzs és egy másik gram-negatív törzs között. Az A lipid terület tulajdonképpen azonos az összes gram-negatív baktériumban, és általában a „belső” területhez keto-dezoxioktansav-részen át kapcsolódik, és a lipopoliszacharid-molekula rögzítőpontjaként szolgál a külső membránhoz.

A fajta-specifikus anti-LPS antitestek immunoterápiás alkalmazásának bevezetését a legkiterjedtebben a *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) tulajdonítható betegség kezelésében tanulmányozták ennek nagyfokú antibiotikum-rezisztenciája miatt. Az ilyen antitestekről, akár aktívan létrehozottak, akár passzívan átvittek, kimutatták, hogy védő hatást fejtenek ki a különböző állati fertőzési modellekben. Áttekintő irodalomként lásd: Pollack, M.: Antibody-Mediated Immunity in *Pseudomonas* Disease and Its Clinical Application (Antitestek által közvetített immunitás *Pseudomonas*-betegségekben, és ennek klinikai alkalmazása). *Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations*, szerkesztők: Alving, B.M. és Finlayson, J. S., 73–79 oldal, kiadó: U.S. Department of Health and Human Services (1979).

Talán még nagyobb fontossággal bír, hogy ha a fertőző törzsek LPS molekuláinak fajta-specifikus részéhez tartozó antitest akut szérum-titere magas, akkor gyakrabban a P. aeruginosa bakterémiában szenvedő betegek túlélése [Pollack, M. és Younk, L.S.: Protective Activity of Antibodies to Exotoxin A and Lipopolysaccharide at the onset of *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in Man (Exotoxin A-hoz és lipopoliszacharidhoz tartozó antitestek védőaktivitása *Pseudomonas aeruginosa* szeptikémia támadása ellen embereknél), *J. Clin. Invest.* (1979) 63, 276–286. Erről a megfigyelésről valójában úgy találták, hogy kiterjesztható a különböző gram-negatív organizmusok által okozott bakterémiák többségére (Zinner, S.H. és McCabe, W.R.: Effect of IgM and IgG Antibody in Patients with Bacteremia Due to Gram-Negative Bacilli/ Az IgM és IgG antitestek hatásai a gram-negatív bacillusoknak tulajdonítható bakterémiában szenvedő betegekben), *J. Infect. Dis.* (1976), 133, 37–45; és Clumeck és munkatársai: Humoral Immunity and Circulating Immune Complexes in Gram-Negative Bacteremia and Septic Shock/ A testnedvek immunitása és keringő immunkomplexek gram-negatív bakterémiában és szeptikus sokkban), *Bacterial Endotoxins and Host Response*, 79–94 oldal, szerkesztő: Agarwal, M.K., kiadó: Elsevier (1980)].

Bár a pontos mód, amellyel az anti-LPS antitestek az ilyen védelmet kifejtik, nincs teljesen körvonalazva (főleg a gram-negatív baktériumok különböző nemzetségeire tekintettel), általában azt gondolják, hogy ezek úgy működnek, hogy megkönnyítik az LPS molekulák eltávolítását a véráramból a retikuloendoteliális rendszer által, vagy érzékenyebb teszik az LPS-t tartalmazó baktériumokat a komplement által közvetített lízisre és/vagy fagocitózisra (Morrison, D.C. és Ryan, J.L. „Bacterial Endotoxins and Host Immune Responses/Bakteriális endotoxinok és gazdaszervezet-immun-

válaszok), *Adv. Immunol.* (1979), 28, 293–450. Elképzelhető, hogy a fenti védelmi vázlatok bármelyike vagy azok kombinációi is működhetnek a súlyos gram-negatív baktériumos betegségekben.

1975-ben Kohler és Milstein számoltak be arról a felfedezésükről, hogy bizonyos egér-sejtvonalakat fuzionálni lehet egér-lépsejtekkel, így olyan hibridómákat hozva létre, amelyek tiszta „monoklonális” antitesteket választhatnak ki (Kohler, G., és Milstein, C., „Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity” (Előre meghatározott fajlagosságú antitesteket kiválasztó fuzionált sejtek folyamatos tenyésztési), *Nature*, (1975), 256, 495–497.

1982-ben egy kivonat (253. számú), amelyet az *Abstracts of the 1982 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (szerkesztette: J. Sadoff és munkatársai) 110. oldalán tettek közzé, bemutatta hibridóma technikával az IgM osztályú egér (rágcsáló) monoklonális antitestjeinek előállítását, amely antitestek védelmet nyújtottak az egereknek azonos (azaz homológ törzs-beli) P. aeruginosa baktériumok által okozott súlyos, halálos kimenetelű fertőzések ellen.

A találmányunk új, emberi transzformált limfocitasejtvonalat és monoklonális antitesteket nyújt, ahol a sejtvonalak és az antitestek fajlagosan kötődnek a gram-negatív baktériumok külső sejt-membránja(i) lipopoliszacharidjain (LPS) levő bizonyos szerotípusos determinánsokhoz. A monoklonális antitesteket az emlősökben használhatjuk homológ gram-negatív baktériumok ellen és lehetővé tehetjük a gram-negatív baktérium-eredetű betegségek patofiziológiai hatásainak gyógyászati vagy megelőző kezelését.

Az ábrák közül az 1. ábra a gram-negatív baktériumok membránjainak és belső falának rajzi megjelenítése, és a 2. ábra egy lipopoliszacharid molekula vázlatos rajzi megjelenítése.

A találmány tehát olyan transzformált limfocita sejteket nyújt, amelyek fajlagos, védőhatású humán monoklonális antitesteket termelnek hozzáférhető lipopoliszacharid molekulák ellen. A „hozzáférhető” kifejezés azt jelenti, hogy a LPS molekulák fizikailag rendelkezésre állnak a monoklonális antitestekkel való közvetlen kölcsönhatáshoz. Eszerint a meghatározás szerint azok az LPS molekulák, amelyek a gram-negatív baktériumokból kijutnak az őket körülvevő környezetbe, szabadon, közvetlenül kölcsönhatásba léphetnek a fajlagos monoklonális antitestekkel és kiürülhetnek a retikuloendoteliális rendszer útján. Ebben az összefüggésben a monoklonális antitestektől az várható, hogy előnyösen közreműködnek a gram-negatív baktériumok széles választéka által okozott súlyos betegségek kezelésében. Ezenkívül azok az LPS molekulák, amelyek a gram-negatív baktériumok külső felületén találhatók, szintén hozzáférhetők a fajlagos monoklonális molekulákkal való közvetlen érintkezéshez, így állítva be a baktériumok komplement által közvetített líziséhez és/vagy fagocitóziséhez szolgáló állapotot. A baktériumokat, amelyekre ez a találmány vonatkozik, tovább lehet definiálni úgy, hogy ezeket a fagocita sejtek vagy

homológ antitestek és szérumban komponensek, pl. komplementekkel való közvetlen kölcsönhatás elpusztítja. Ezekről a mechanizmusokról ismert, hogy kritikus fontosságúak az ilyen organizmusok kiküszöbölésében. Az olyan bakteriális szerkezetek, mint pl. a tokok, burkok és nyálkártegek, amelyek leszűkítik vagy meggátolják a közvetlen „hozzáférhetőség”-et az LPS molekulákhoz, előre láthatóan csökkentik ennek a találmánynak a felhasználási lehetőségeit azoknál a baktériumoknál, amelyek ilyen szerkezetet tartalmaznak, például a tokkal rendelkező *Klebsiella* fajok és a burokkal rendelkező *Escherichia coli*.

Anélkül, hogy a jelen találmány oltalmi körét korlátozni szándékoznánk, megnevezünk számos gram-negatív baktérium törzset és fajt, amelyek különösen érdekesek kóroktani szempontból súlyos emberi betegségek előidézésében. Ezek nagyjából a gram-negatív organizmusok három nagy családjában esnek, mégpedig az Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae és a Pseudomonadaceae családokba. Az Enterobacteriaceae család képviselői pl. az *Escherichia coli*, a *Klebsiella*-fajok, mint pl. a *K. pneumoniae*, *K. azaeana* és *K. Phinoscleromatis*; az Enterobacter-fajok, mint pl. az *E. aerogenes*, *E. cloacea*, *E. hafniae* és *E. agglomarans*; *Serratia marcescens*; *Proteus*-fajok, mint pl. *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* és *P. morganii*; *Providencia stuartii*; és *Citrobacter*-fajok (Sonnenwirth, fentebb idézett munkák, McCaba, fentebb idézett munkák, és Kreger és munkatársai, fentebb idézett munkák, ezek referenciaként épülnek be a találmányba). A Bacteroidaceae család képviselői pl. a *Bacteroides*-fajok, mint pl. a *B. fragilis*, és *Fusobacterium*-fajok (Sonnenwirth, fentebb idézett munka, ez referenciaként épül be a találmányba). A Pseudomonadaceae család képviselői pl. a *P. aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. strutzeri*, *P. maltophilia* (lásd Gilardi, G.L.: *Pseudomonas Species in Clinical Microbiology/ Pseudomonas-fajok a klinikai mikrobiológiában*). *Mt. Sinai. J. Med.* (1976), 43, 710–726, ez referenciaként épül be a találmányba. Más, hasonló organizmusok elleni védelmet is el lehet érni ezzel a találmánnyal.

A fentebb felsorolt *Pseudomonas* fajok a jelen találmány előnyös alkalmazási területét képviselik, ezen belül a *P. aeruginosa* még előnyösebb alkalmazási területet képvisel.

Ismeretes, hogy a gram-negatív baktériumok szóban forgó fajain belül immunológiailag megkülönböztethető törzsek vagy típusok sokasága található. Sok esetben a törzsek vagy típusok közti különbségek az LPS molekulák antigén-szerkezetében való változásokra vonatkoznak, különösen az LPS molekulák O-fajlagos oldalláncain belüli változásokra (lásd 1. ábra). Így szerkezetileg különböző O-fajlagos oldalláncok különböző antigénszerkezeteket mutatnak. Az ilyen antigén-változatok immunológiai felismerése az adott antigén-variánshoz fajlagos antitestek létrehozását eredményezi. Amikor ilyen antitesteket alkalmazunk szerológiai (azaz pl. agglutinációt, ELISA-t, stb. alkalmazó) megkülönböztetésre az egyik vagy másik antigén-variáns

között, az így felismert antigén-variánsokat nevezzük szerotípusoknak és ezekről mondjuk, hogy szerotípusos determinánsokat mutatnak. Így pl. a LPS molekulák O-fajlagos oldalláncai szerotípusos antigén determinánsokat jelentenek. Akik a szakterületen jártasak, méltányolni tudják, hogy mivel a jelen találmány humán monoklonális antitesteket szolgáltat az LPS molekulákon levő szerotípusos determinánsok ellen, ez olyan antitesteket szolgáltat, amelyek fajtaspecifikusak, ami azt jelenti, hogy egy fajtán belül egy bizonyos típusú LPS molekula ellen fajlagosak.

A különböző szerotípusok megválogatásában rendszerezési sémákat lehet hasznosan alkalmazni. Az ilyen rendszerezési sémák illusztrálására alkalmasak a *P. aeruginosa* rendszerezési sémái. A Fisher féle rendszerezési szisztéma *P. aeruginosa*-hoz jól ismert, és részletesen le van írva a következő irodalmi helyen: Fisher és munkatársai: *New Immunotype Scheme for Pseudomonas aeruginosa Based on Protective Antigens* (Új, a védőhatású antigének alapján alapuló immun-rendszerezési séma *Pseudomonas aeruginosa*-hoz). *J. Bacteriol.* (1969), 98, 835–836; ezt az irodalmi helyet referenciaként beépítettük ebbe a találmányba. Ez a rendszer az ismert *P. aeruginosa* törzsek többségét hét csoportba osztályozza: Fisher-féle 1. immun-típus; Fisher-féle 2. immun-típus; Fisher-féle 3. immun-típus; Fisher-féle 4. immun-típus; Fisher-féle 5. immun-típus; Fisher-féle 6. immun-típus; Fisher-féle 7. immun-típus. Hasonlóképpen az International Antigenic Typing Scheme (Nemzetközi antigén-rendszerezési séma) (IATS) szisztémája *P. aeruginosa*-hoz (lásd Brokopp, C.D. és Farmer, J.J., III: *Typing Methods for Pseudomonas aeruginosa/ Rendszerezési módszerek Pseudomonas aeruginosa-hoz*), *Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy*, 89–133 oldal, szerkesztő: Daggert, R.G., kiadó: Academic Press (1979) 17 különböző szerotípust különböztet meg, amelyeket IATS 1. típusnak, IATS 2. típusnak, stb. neveznek. Mind a Fisher-féle (Hanessian, S. és munkatársai: *Isolation and Characterization of Antigenic Components of a New Heptavalent Pseudomonas Vaccine/ Egy új, hét-értékű Pseudomonas vakcina antigén-komponenseinek izolálása és jellemzése*), *Nature*, (1971), 229, 209–210, mind a IATS szerinti (Brokopp és munkatársai, fentebb idézett munka) rendszerezési szisztémánál mindkét szerotípusos sémára vonatkozó antigén-determinánsokról kimutatták, hogy jelen vannak az LPS molekulán. A két rendszerezési szisztéma összehasonlítását és összefüggéseit az 1. táblázat adja meg.

I. táblázat

A két *P. aeruginosa* rendszerezési szisztéma összehasonlítása.

LATS (szerotípus)	Fisher (immun-típus)
1	4
2	3,7
3	–
4	–

LATS (szerotípus)	Fisher (immun-típus)
5	3,7
6	1
7	6
8	6
9	—
10	5
11	2
12	—
13	—
14	—
15	—
16	3,7
17	—

A monoklonális antitesteket a megfelelő gram-negatív baktérium fertőzésének jelenleg vagy valamikor kitett humán donorokból nyert B limfocita-sejtek Epstein-Barr vírussal (EBV) történő sejttel hajtott transzformációjával állítjuk elő. Az így nyert antitest-kiválasztó sejtvonalakat úgy lehet jellemezni, mint folytonosan növekvő limfoblasztoid sejteket, amelyeknek diploid kariotípusa van, Epstein-Barr központi antigén (EBNA) pozitívak, és IgG, IgM, IgA vagy IgD izotípusok valamelyikének, beleértve az IgG1, IgG2, IgG3 és IgG4-altípusokat is, monoklonális antitestjeit választják ki. A sejttel hajtott transzformációs folyamat maga M.E. Lostrom találmánya, és részletesen a 4 464 465 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban van leírva, amely referenciaként van beépítve ebbe a bejelentésbe. A monoklonális antitesteket használhatjuk sértetlen (teljes) formában, vagy fragmensek formájában, mint pl. Fab vagy F(ab')₂, általában inkább érintetlen formában. Bizonyos esetekben kívánatos lehet az antitesteket összekapcsolni más anyagokkal a megfelelő eredmény elérése érdekében. Így pl. az antitesteket össze lehet kapcsolni citotoxikus szerekkel, mint pl. radionukleidekkel, antibiotikumokkal, stb.

Ennek a folyamatnak az alkalmazását a jelen monoklonális antitestek előállítására az ezután következő példák mutatják be. Ezek a példák csupán a találmány egyes kiviteli módjait kívánják illusztrálni, és nem úgy vannak összeállítva, hogy a találmány oltalmi körét korlátozzák.

1. példa

Az 1. példa módszereket mutat be Fisher-féle 2. immun-típusú (11. IATS típusú) *P. aeruginosa* LPS molekulák elleni humán monoklonális antitestek előállítására, továbbá bemutatja az említett antitest védő aktivitását in vivo egy homológ törzs letális támadása ellen.

A. A megfelelő emberi sejt kinyerése.

A megfelelő humán B-sejtek (limfociták) egy meghalt egyén lépéből származtak, akiről ismert volt, hogy epehólyag-fibrózis betegségben szenvedett és koráb-

ban *P. aeruginosa*-val volt fertőzve. A lépét, amelyet autopsziával nyertünk ki, kb. 15 mm vastag szeletekre vágtuk. A sejteket megszabadítottuk a toktól és a sejt-közötti állománytól egy nagy petri-csészében, enyhén átitatva az egyes szeleteket kalcium- és magnéziummentes foszfáttal pufferolt sóoldattal (CMF-PBS), amelyet egy fecskendőhöz rögzített 18. méretű tón keresztül adtunk be. Egymagvú sejteket különítettünk el a lépsejt-készítményből standard centrifugálási technikával Ficoll-Paque alkalmazásával [Bogum, A.: Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes From Human Blood (Egymagvú sejtek és granulociták izolálása emberi vérből). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1968), 21, 97. melléklet, 77–89], és kétszer mostuk CMF-PBS-ben.

Az egymagvú sejtek körül T-sejteket egy módosított E-rozettázási eljárást alkalmazva. Röviden, a sejteket először újra szuszpendáltuk $1 \cdot 10^7$ sejt/ml koncentrációra 20% borjú embrió-szérumot (FCS) tartalmazó PBS-ben 4°C hőmérsékleten. Ennek a szuszpenzióknak 1 ml-ét azután egy $17 \cdot 100$ mm-es kerekfenekű polisztirol-csőbe helyeztük, amelyhez $1 \cdot 10^9$, 2-aminoetil-izotiouronium-bromiddal (AET) kezelt birka vörösvérsejtet adtunk 10%-os (térf./térf.) RPMI 1640 tápközzel képzett oldatból (Madsen, M. és Johnson, H.E.: A Methodological Study of E-rosette formation Using AET Treated Sheep Red Blood Cells/ Módszertani tanulmányok E-rosetta képzéssel kapcsolatban, AET-vel kezelt birka vörösvérsejteket alkalmazva), *J. Immun. Methods* (1979) 27, 61–74. A szuszpenziót enyhén kevertük 5–10 percen át 4°C hőmérsékleten és az E-rozettázott sejteket azután centrifugálással elváoltottuk Ficoll-Paque alkalmazásával 8 percen át $2500 \times g$ -vel 4°C hőmérsékleten. Az E-rozettázásra negatív lép-eredetű egymagvú sejteket (E⁻SpI), amelyek az érintkező felülethez voltak kötve, egyszer mostuk RPMI 1640 tápközzel és ugyanebben újra szuszpendáltuk, de ez tartalmazott 15% (térf./térf.) FCS-t, 2 mmól/l L-glutamint, 1 mmól/l nátrium-piruvátot, 100 nemzetközi egység/ml penicillint, 100 g/ml sztreptomocint, $1 \cdot 10^{-4}$ mó/l hipoxantint, $4 \cdot 10^{-7}$ mó/l aminopterint és $1,6 \cdot 10^{-5}$ mó/l timidint is. Ezt a tápközeget a továbbiakban HAT tápközegnek nevezzük.

45 B. A sejtek sejttel hajtott transzformálása.

Az E⁻SpI sejtek sejttel hajtott transzformálását E⁻SpI sejteknek egy transzformáló sejtvonalal együtt történő tenyésztésével hajtottuk végre. A transzformáló sejtvonal egy Epstein-Barr központi antigén (EBNA) pozitív humán limfoblasztoid sejtvonal volt, amely a GM 1500 limfoblasztoid sejtvonal etil-metánszulfonátos (EMS) mutagenéziséből, majd ezt követő 30 µg/ml 6-tioguanin jelenlétében történő szelekciójából származott, a 6-tioguanidinos szelekció a sejteket hipoxantinguanin foszforibozil transzferáz (HGPRT) hiányosság és így HAT-érzékennyé tette. Ezt a sejtvonalat neveztük 1A2 sejtvonalnak és 1982. márc. 29-én letétbe helyeztük azt ATCC-nél, ATCC CRL 8119 számon. Logaritmikus növekedési fázisban levő 1A2 sejteket szuszpendáltunk HAT tápközegben, majd összekever-

tük az E⁻SpI sejtekkel 30 1A2 sejt/E⁻SpI sejt arányban. A sejtkeveréket 10 laposfenekű, 96 üreges mikrotitráló lemezre helyeztük 155 000 sejt/üreg koncentrációban 200 µl/üreg térfogatban, és a tenyészetet 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 6% CO₂-t tartalmazó nedvesített atmoszférában. A tenyészeteket minden harmadik-negyedik napon tápláltuk, a felülúszó felét friss HAT tápközzel helyettesítve. Az üregeket minden második napon megfigyeltük fordított mikroszkópon a sejtek burjánzásának jeleit keresve. Két héttel azután, hogy a sejteket a lemezre helyeztük, és azután, hogy az 1A2 sejtek a HAT szelekció következtében elhaltak, az üregek táplálását egy új összetételű tápközzel hajtottuk végre, amely csaknem azonos volt a HAT tápközzel, azzal a különbséggel, hogy az aminopterin komponens hiányzott belőle. 18 nappal a lemezre helyezés után megfigyeltük, hogy az üregek mintegy 70%-a tartalmazott burjánzó sejteket és hogy az üregek többségében a sejtek megfelelő sűrűségűek voltak az eltávolításhoz és a felülúszó vizsgálatához anti-P. aeruginosa antitestre.

C. A fajlagos antitestet kiválasztó sejtek kimutatása.

A felülúszókat egy enzimmal kötött immunoszorbens mérési technikát (ELISA) alkalmazva vizsgáltuk át anti-P. aeruginosa antitestekre (Engvall, E.: Quantitative Enzyme Immunoassay (ELISA) in Microbiology/ Mennyiségi enzim-immunmeghatározás (ELISA) a mikrobiológiában, *Med. Biol.* (1977), 55, 193–200. Az antigén-lemezek 96 üreges, laposfenekű mikrotitráló lemezekből álltak, amelyeknek üregei különböző teljes baktériumokat tartalmaztak, amelyeket előzőleg etanollal rögzítettünk az üregek fenekére. A lemezeket 50 µl PBS-ben levő mosott baktériumszuszpenzió [OD (optikai sűrűség)₆₆₀=0,2] üregekbe beadásával, a lemezek 20 percen át 500 xg-vel centrifugálásával, a PBS leszívásával, 75 µl etanol 10 percen át történő hozzáadásával, az etanol eltávolításával és végül levegőn szárítással készítettük elő. Az átvizsgálásban használt különböző antigén-lemezek a következők voltak: 1. P. aeruginosa, Fisher-féle 1–3. immun-típusok (ATCC 27312, 27313, 27314) keveréke; 2. P. aeruginosa, Fisher-féle 4–7. immun-típusok (ATCC 27315, 27316, 27317, 27318) keveréke; 3. Escherichia coli egy klinikai izolátuma; 4. Klebsiella pneumoniae (ATCC 8047); és 5. mikrotitráló lemez baktérium nélkül.

Az ELISA eljáráshoz az antigén-lemezek üregeit először lezártuk 75 µl 5%-os BSA-val 1 órán át, hogy megakadályozzuk a fehérje nem fajlagos kötését. Miután a nem adszorbeált BSA-t eltávolítottuk, a tenyésztő lemez üregeiből a felülúszókat pontos sorrendben helyeztük el az antigén-lemezek megfelelő üregeibe (50 µl/üreg, és a lemezeket egy nedvesített kamrában 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 30 percen át. A felülúszókat ezután eltávolítottuk, az üregeket háromszor mostuk 1%-os BSA-PBS-sel, és 50 µl biotinizett kecske anti-humán immunglobulint (Ig) Tago 2593 szám, 1:10000 arányban hígítva 1%-os BSA-PBS-sel) adtunk minden egyes üreghez. 30 perces in-

kubálás után 37 °C hőmérsékleten nedvesített kamrában, a biotinizett anti-humán Ig-t eltávolítottuk, az üregeket háromszor mostuk 1%-os BSA-PBS-sel, és 50 µl előre elkészített avidin: biotinizett torna-peroxidáz komplexet (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornia) adtunk minden egyes üreghez. 30 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálás után a Vectastain ABC reagens fölöslegét eltávolítottuk, az üregeket ismét mostuk háromszor 1%-os BSA-PBS-sel, és 100 µl szubsztrátumot [0,8 mg/ml orto-fenilén-diamin dihidroklorid 100 mmól/literes citrát-pufferban, (pH 5,0), plusz 0,03% H₂O₂ ionmentesített H₂O-ban, egyenlő térfogatban összekeverve éppen a lemezre helyezés előtt] adtunk minden egyes üreghez. 30 perces, sötétben végzett inkubálás után 50 µl 3 n H₂SO₄-et adtunk minden egyes üreghez a reakció leállítása érdekében. A lemez antigénjének megfelelő antitesteket tartalmazó tenyészet-felülúszókat pozitív színekifejlődés alapján mutattuk ki a megfelelő üregekben és a reakcióerősséget mennyiségileg a 490 nm-nél mért abszorpcióval, Dynatech MR 580 mikro-ELISA leolvasón mértük.

A fenti módszerrel a tenyészet-felülúszók elemzése három olyan üreg azonosításához vezetett (6F11, 4G9 és 10B2), amelyek tartalmaztak anti-P. aeruginosa fajlagosságot Fisher-féle 1–3. immun-típust tartalmazó lemezen, de nem tartalmazták ugyanezt Fisher-féle 4–7. immun-típust tartalmazó lemezen, vagy a kontroll lemezek bármelyikén. Abból a célból, hogy a felismert fajlagos Fisher-féle immun-típust azonosítsuk, csupán egy Fisher-féle immun-típushoz tartozó etanollal rögzített baktériumokat tartalmazó lemezeket készítettünk a fent leírt módon minden egyes immun-típushoz. Az ELISA vizsgálat kivitelezése a fent leírt módon a 6F11, 4G9 és 10B2 üregek tenyészet-felülúszóival az egyes immun-típusoknak megfelelő lemezeken jelezte, hogy ez a három üreg Fisher-féle 2. immuntípusra fajlagos antitesteket tartalmazott.

D. Fajlagos antitesteket termelő sejtek klónozása

A 6F11, 4G9 és 10B2 üregekben levő sejteket számos (két vagy három) klónozási menetnek vetettük alá, amíg a fenti ELISA eljárással mért összes klón-felülúszó a Fisher-féle 2. immun-típust tartalmazó antigén-lemezeken pozitív reakciót adott. A sejteket emberi fityma fibroblaszt félig összefolyó rétegén történő korlátozott hígítással klónoztuk laposfenekű, 96 üreget tartalmazó lemezekben. A tápközzel RPMI 1640 alapon 15% (térf./térf.) FCS-t, 2 mmól/l L-glutamint, 1 mmól/l nátrium-piruvátot, 100 nemzetközi egység/ml penicillint, és 100 µg/ml sztreptomocint tartalmazott. A tenyészeteket minden 3. napon tápláltuk a felülúszó felének kicserélésével friss tápközzel. Általában az üregek a megfelelő limfoblasztoid-sejt sűrűséget az anti-Fisher-féle 2. immun-típus fajlagosság elemzéséhez a lemezre helyezéstől számítva a 2. és 3. hét között érték el.

Így ebben a kísérletben három klónozott, transzformált emberi sejtvonalat nyertünk, amelyek folyamatosak (nem pusztulók) voltak, és amelyek mindegyike

humán monoklonális antitesteket választott ki a Fisher-féle 2 immun-típusú *P. aeruginosa* LPS molekuláin levő szerotípusos determinánsok ellen. Ebben és a következő példákban a sejtvonalak és az antitestek, amelyeket termelnek, ugyanezeket a jelöléseket viselik.

A jelen szabadalmi bejelentés benyújtása előtt a folyamatos transzformált humán sejtvonalat, amelyeket itt 6F11-nek jelöltünk, elhelyeztük az Amerikai Fajtatenyészet Gyűjteményben (ATCC), Rockville, Maryland, ATCC CRL 8562 számon.

Az a tény, hogy a klónok mindegyikéből származó monoklonális antitestek kizárólag egy egyedi (jelen esetben Fisher-féle 2.) immun-típussal reagáltak, azt sugallta, hogy az antitest közvetlenül egy lipopoliszacharid antigén ellen irányul. Mivel az LPS szerotípus összefüggésben van a Fisher-féle immun-típusozási rendszerrel [Hanessian: *Nature* (New Biology) (1971), 229, 209–210]. Ezt tovább vizsgálódó, kiterjesztett ELISA vizsgálatot hajtottunk végre a 6F11, 4G9 és 10B2 felülűzőkkel teljes, rögzített baktériumokat tartalmazó lemezekben, amelyek a *P. aeruginosa* ATCC 33348-33364, *P. aureofaciens*, *E. coli* 0111: B4-nek J5 mutánsa és *Providencia stuartii*-nek egy klinikai izolátuma tizenhét IATS szerotípusú törzseit tartalmazták. A Fisher-féle immun-típusoknak és megfelelő LPS-re alapozott szerotípusainak az IATS-sémában végzett összehasonlításával teljes összhangban (lásd 1. táblázat) az anti-Fisher-féle 2. immun-típusú klón felülűzők csak az IATS-féle 11. törzssel léptek reakcióba. Reakciót egyáltalán nem figyeltünk meg a nem *P. aeruginosa* baktériumok egyikével sem.

A három anti-Fisher-féle 2. immun-típusú monoklonális antitest egyikét tovább jellemeztük. Az ELISA-mérésekben az antitestek erősebb reakcióképességére és a megfelelő sejtvonal jobb növekedési tulajdonságaira alapozva a 6F11 monoklont választottuk.

A 6F11 antitest által felismert molekulafajták biokémiai jellemzését immun-folt elemzéssel hajtottuk végre. Röviden: 20 µg nyers LPS-t (Westphal, O. és munkatársai: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser/ A baktériumokból történő extrakció fenol/vízzel), *Z. Naturforsch.* (1952), 79, 148–155) a hét Fisher-féle immun-típus mindegyikéből, 20 µg kromatográfiával tisztított LPS-t *E. coli* 0111: B4-ből és *Klebsiella pneumoniae*-ből (mindkettő a List Laboratories, Campbell, Kalifornia, gyártmánya), és 50 µg Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumból származó külső membrán-készítményt (Tamm, M. R. és munkatársai: Serological Classification of Neisseria gonorrhoeae With Monoclonal Antibodies/ A Neisseria gonorrhoeae szerológiai osztályozása monoklonális antitestekkel), *Infect. Immun.* (1982), 36, 1042–1053 egyenként nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettünk alá (Hancock, R.E.W. és Carey, A.M.: Outer Membrane of Pseudomonas aeruginosa: Heat and 2-mercapto-ethanol-Modifiable Proteins/ A Pseudomonas aeruginosa külső membránja: hővel és 2-merkapto-etanolal módosítható fehérjék), *J. Bacteriol.* (1977), 140, 901–910. Az elkülönített molekulafajtákat a gélről nitrocellulóz membránra (NCM) vit-

tük át, amint ezt másutt leírták (Towbin, H. és munkatársai: Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications/ Fehérjék elektroforetikus átvitele poliakrilamid gélekről nitrocellulóz lapokra: Eljárás és néhány alkalmazási terület), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979), 76, 4350–4354 és az NCM foltot 1 órán át blokkoltuk PBS-Tweenben [Batteiger, B. és munkatársai: The Use of Tween 20 as a Blocking Agent in the Immunological Detection of Proteins Transferred to Nitrocellulose Membranes (Tween 20, mint blokkolószert alkalmazása a nitrocellulóz membránokra átvitt fehérjék immunológiai kimutatásában). *J. Immunol. Meth.* (1982), 55, 297–307]. A foltot azután 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 ml PBS-Tweenben, amely 3 ml, 6F11 vonalból származó használt tenyészet-felülűzőt tartalmazott. Négyyszer végzett 5 perces öblítés után PBS-Tweenben a foltot 1:5000 hígítású (PBS-Tweenben) nyúl-anti-humán Ig-ben inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A foltot négyyszer PBS-Tween-nel öblítettük, majd 30 ml, 1:2000 hígítású (PBS-Tweenben) torna-peroxidáz-A-fehérjét tartalmazó oldatban (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Kalifornia) helyeztük. Egy órás inkubálás után szobahőmérsékleten a foltot négyyszer átöblítettük PBS-Tweenben, majd 60 ml szubsztátumba merítettük, amelyet a következőképpen készítettünk. 120 mg torna-peroxidáz színekifejlesztő reagenst (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornia) feloldottunk 40 ml hideg metanolban; 120 µl 30%-os H₂O₂-t adtunk hozzá 200 ml Tris-sel puffertolt sóoldatban (TBS - 20 mmól/l Tris, pH 7,4, 0,5 mmól/l NaCl); a két oldatot közvetlenül csak a folthoz adás előtt kevertük össze. Miután a megfelelő szín kifejlődése megtörtént (általában 15–45 perccel a szubsztátum hozzáadása után), a reakciót lefojtottuk, a foltot több alkalommal ionmentesített vízzel átöblítve.

Az eredmények a következők voltak. Pozitív reakciókat csak azokban a nyomokban jegyezhetünk fel, amelyek Fisher-féle 2. immun-típusú nyers LPS-t és Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumokból származó külső membrán készítményt tartalmaztak. Ezeknek a nyomoknak mindegyikében a 6F11 antitestről kitűnt, hogy felismeri a szabályosan elhelyezett molekuláris tulajdonságok egy egész sorát, egy létra-szerű mintát alakítva ki. Ez a profil teljesen egybeesik azzal, amely az LPS poliakrilamid-gél elektroforézis-elemzésében látható SDS jelenlétében, ahol azt mutatták ki, hogy a csíkok által mutatott heterogén méret-profil az LPS molekulák sokaságának tulajdonítható; ezek a súly-növekedésben különböznek, amelyek viszont a molekulánként jelenlévő O-antigén oligoszacharid-oldallánc egységek számának felelnek meg. [Pavla, E.T. és Makela, P.H.: Lipopolysaccharide Heterogeneity in Salmonella typhimurium Analyzed by Sodium Dodecyl Sulfate (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) A lipopoliszacharidok heterogén volta Salmonella typhimuriumban, nátrium-dodecil-szulfát (poliakrilamid-gél elektroforézissel elemezve), *Eur. J. Biochem.*, (1980), 107, 137–143; és Goldman, R.D. és Leive, L.: Hete-

rogeneity of Antigenic-Side-Chain Length in Lipopolysaccharide from Escherichia coli 0111 and Salmonella typhimurium LT2-ből származó lipopoliszacharidokban az antigén- oldallánc-hosszak heterogén voltak], *Eur. J. Biochem.* (1980), 107, 145–153. Összességében ezek az adatok azt jelzik, hogy a 6F11 monoklonális antitest szerológiai fejlágossága közvetlenül a Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumok LPS molekulái ellen irányul. Ezen túl, mivel az LPS molekulák fajlagossága az ismétlődő oligoszacharid egységek és/vagy glikozid-kötések szerkezetén alapul (Westphal és munkatársai: *Prog. Allergy* (1983), 33, 9–39), az adatok azt támasztják alá, hogy a 6F11 monoklonális antitest az oligoszacharid egység bizonyos részeire vagy az ilyen egységek közti kötésekre fajlagos, inkább, mint az LPS központi területe és A lipidje által képviselt szerológiai rögzített szerkezetekre.

A 6F11 monoklonális antitest izotípusát a korábban leírt fajlagossági vizsgálathoz hasonló ELISA vizsgálattal határoztuk meg azzal a különbséggel, hogy a biotinezett kecske anti-humán IgG-t (gamma-láncfajlagos, Tago-gyártmány) vagy biotinezett kecske anti-humán IgM-et (mű-lánc fajlagos, Tago-gyártmány) használtuk a második lépés reagenseként a szélesebb területen reaktív biotinezett kecske anti-humán Ig helyett. Mindkét reagenst 1:500 hígításban alkalmaztuk és az antigén-lemez etanollal rögzített Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumokat tartalmazott. A 6F11 antitest pozitív reakcióját csak anti-IgM reagenssel figyeltük meg Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumokkal, jelezve a monoklonális antitest IgM izotípusát. Akik a szakterületen jártasak, méltányolni tudják, hogy ha ezt a példa szerinti folyamatot több ízben megismétljük és az így nyert LPS-fajlagos monoklonális antitestek izotípusát meghatározzuk, kell, hogy találjunk IgM és IgG izotípusokat egyaránt.

F. In vitro aktivitás

A 6F11 monoklonális antitest in vitro funkcionális aktivitását egy opszonofagocitózis vizsgálatban vizsgáltuk meg, amely vizsgálat összehasonlította a humán neutrofil sejtek radioaktív baktérium-felvételét komplement jelenlétében, amikor a 6F11 monoklonális antitest jelen volt, vagy nem volt jelen.

A radioaktívan jelzett baktériumokat úgy készítettük, hogy 5 ml *Pseudomonas* minimál tápközeget (Auerard és Snell: „Biochemical Factors in Growth”/ Biokémiai tényezők a növekedésben), 7. fejezet, *Manual of Methods for General Bacteriology*, szerkesztő: Gerhardt, P. és munkatársai, kiadó: American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981, 79–111 oldal) inokuláltunk 100 µl (1 µCi) ³H leucinnal (146,5 Ci/mmól, New England Nuclear, Boston, Massachusetts) és Fisher-féle 2. immun-típusú *P. aeruginosa* egy éjszakán át triptonos szója tápközegen nőtt tenyészetének 30 µl-ével. A csövet 37 °C hőmérsékleten rázógépen 4–6 órán át inkubáltuk, ez után a ³H leucin főleg Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldattal, amely még 0,1% zselatint és 5 mmól/l HEPES-t (pH 7,2) is tartalmazott (HBBS/Gel), történő négyszeri mosással eltávolítottuk. A baktériumokat 950 xg-nél 10

percen át centrifugáltuk minden egyes mosásnál és újra szuszpendáltuk HBBS/Gel-ben $6,67 \cdot 10^6$ /ml végső koncentrációra. A humán neutrofil sejteket Furth és Van Zwet szerint izoláltuk [In Vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes (A polimorfmagvú és egymagvú fagociták által végzett fagocitózis és sejten belüli pusztítás in vitro meghatározása), *Handbook of Experimental Immunology* (1973); 2. kötet, szerkesztő: D.M. Weir, 2. kiadás, kiadó: Blackwell Scientific Publications, Oxford; 36,1–36,24], néhány módosítással. 10 ml heparinózott vérből származó „Buffy coat”-ot rétegeztünk Ficoll-Paque alá és centrifugáltuk. A vörös vérséjt (RBC) szemcséket egyszer mostuk RPMI 1640 tápközzel és újra szuszpendáltuk egyenlő térfogatú, 37 °C hőmérsékletű PBS-ben. Ebből a szuszpenzióból 3 ml-t adtunk 6 ml 2%-os (37°C hőmérsékletű PBS-ben) dextránhoz, és az így keletkezett keveréket gyengéden, de alaposan összekevertük időről időre. 20 perces, 37 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után a vörös vérséjteket hagytuk leülepedni, a felülúszót (amely a neutrofil sejteket tartalmazta) eltávolítottuk és kétszer mostuk PBS-sel 4°C hőmérsékleten. A sejteket még egyszer mostuk 4°C hőmérsékletű HBSS-HEPES-sel (pH 7,2) és újra szuszpendáltuk ugyanebben $5 \cdot 10^7$ neutrofil sejt/ml koncentrációra. 0,01 mól/l-es EDTA-ban (pH 7,2) újra helyreállított liofilezett nyúlserum, amely kétszer volt adszorbeálva a hét Fisher-féle immun-típust képviselő élő baktériumokkal [Bjornson, A.B. és Michael, J.G.: Factors in Human Serum Promoting Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Interaction of opsonins With the Bacterium (A *Pseudomonas aeruginosa* fagocitózisát elősegítő tényezők a humán szérumban. I. Az opszoninok kölcsönhatása a baktériumokkal), *J. Inf. Dis.* (1974), 130, S119–S125 kiegészítések], szolgált a komplement forrásaként.

A meghatározáshoz 300 µl Fisher-féle 2. immun-típusú baktérium-szuszenziót adtunk 100 µl 6F11 tenyészet felülúszóhoz (amely 1:1 arányban hővel inaktivált FCS-sel volt hígítva) egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőben és rázógépen inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten 30 percen át. Ezt követte előbb 50 µl komplement, majd 50 µl neutrofil-sejt szuszpenzió hozzáadása 30 perces és 45 perces inkubációs időtartamokkal rázógépen 37 °C hőmérsékleten a megfelelő hozzáadás mindegyike után. A neutrofil sejteket ezután kétszer mostuk, a csöveket megtöltve hideg PBS-sel, centrifugálva 5 percen át 100 g-vel és a felülúszót eltávolítva. 250 µl 0,1 n NaOH-t adtunk hozzá, hogy a neutrofil sejtek lizisét elvégezzük, a csövet 15 percig inkubáltuk, Vortex-szel felráztuk és további 15 percig inkubáltuk, ekkor 250 µl-t a cső tartalmából 3 ml szcintillációs folyadékban (Dimilume 30, United Technologies, Packard) szolubilizáltunk és megszámláltuk, Beckman LS 7000 folyadék-szcintillációs számlálót alkalmazva. Az eredményeket a beadott radioaktívan jelzett baktériumok felhasználásának százalékában fejezzük ki. A bevitt radioaktívan jelzett baktériumokhoz társult Cpm-et a kontroll cső tartalmából 250 µl meg-

számlálásával mértük, amely kontroll csövet éppen úgy alávetettük a fenti eljárásnak azzal a kivétellel, hogy a monoklonális antitesthez hővel inaktivált (56°C, 30 perc) normál nyúlserumot adtunk, és nem végeztünk mosást a be nem fogott baktériumok eltávolítására.

Amint a 2. táblázatból látható, csak a Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumok fagocitózisa ment végbe 6F11 monoklonális antitest és egy komplement aktív forrása jelenlétében. Mikor ezt a kísérletet megisméltük Fisher-féle 1. immun-típusú baktériumokat alkalmazva Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumok helyett, baktérium-felvétel nem volt megfigyelhető, ez így demonstrálta a 6F11 antitest baktériumokat opsonizáló és fagocitózist elősegítő képességének fajlagosságát. Mivel az opsoninok (fajlagos antitestek) és polimorf-magvú leukociták (neutrofil sejtek) kombinált tevékenysége tűnik a *P. aeruginosa*-ra való immunitás elsődleges mechanizmusának (Pollack, fentebb idézett munka), ezek az adatok azt sugallják, hogy a 6F11 antitestek, megfelelő beadási körülmények között, védelmet nyújtanak a Fisher-féle 2. immun-típusú baktériumok ellen.

2. táblázat

6F11 Antitest ^a	Komplement ^b	A bevitt ³ H-Fisher-féle 2. immun-típusú baktérium százalékos felhasználása
-	-	3,8
+	-	6,6
-	+	2,4
+	+	61,7

^a(-)-tenyésztő tápközeg

^b(-)-hővel inaktivált komplement

G. In vivo aktivitás

Hogy a fenti hipotézist megvizsgáljuk, állatok védelmével foglalkozó tanulmányokat hajtottunk végre a 6F11 antitestekkel és többféle Fisher-immun-típusú *P. aeruginosa*-val. A 6F11 antitestet először használt tenyésztet felülszorból koncentráltuk telített ammónium-szulfáttal végzett kicsapással (50% végső koncentráció) (Good, A.H. és munkatársai: Purification of Immunoglobulins and Their Fragments/ Immunoglobulinok és fragmenseik tisztítása), *Selected Methods in Cellular Immunology*, szerkesztők: Mishell, B.B. és Shiigi, S.M., kiadó: W.H. Freeman and Co., San Francisco, Kalifornia, 279-286 (1980). A kicsapott anyagot steril vízben újra helyreállítottuk, erőteljesen dializáltuk PBS-sel szemben és sterilre szűrtük. Negatív kontrollként az azonos folyamatnak alávetett friss tenyésztő tápközeg szolgált. Nőstény BALB/c egereket 20 és 22 g testsúly között két csoportra osztottuk, minden csoport 10 egeret tartalmazott. Egy csoportot intraperitoneálisan (i.p.) inokuláltunk koncentrált 6F11 antitest 0,5 ml-ével (amely kb. 50 µg anti-

testet tartalmazott radioimmunassay-val meghatározva), míg a másik csoport i.p. 0,5 ml koncentrált tenyésztet-tápközegre kapott. Hat órával később az összes állatot i.p. 0,3 ml élő baktérium szuszpenzió hatásának tettünk ki, amely Fisher-féle 2. immun-típusú *P. aeruginosa* baktériumokat tartalmazott. A baktérium-szuszenziót már korábban elkészítettük olyan módon, hogy logaritmusos fázisú növekedésben levő tápközeg-tenyésztetből a baktériumokat centrifugáltuk, kétszer mostuk PBS-ben és újra felszuszpendáltuk a megfelelő sűrűségig PBS-ben. A baktériumos fertőzés $1,2 \cdot 10^8$ élő organizmust képviselt. Az állatokat 5 napos perióduson át figyeltük. 18 órával a baktériumok bejuttatása után az összes állat, amely koncentrált tenyésztet-tápközegre kapott, elpusztult. Ezzel ellentétben azok az állatok, amelyek 6F11 monoklonális antitestet kaptak, mind éltek. Az utóbbi csoport egészen egészségesnek látszott ebben az időpontban, a baktériumos fertőzésnek csak apróbb tüneteivel (pl. a bunda enyhe felborzolódása). Ezek a tünetek is eltűntek 48 órával a beadagolás után, és a baktériumos betegségnek semmiféle bizonyítéka nem maradt a megfigyelési periódus további részében. Hasonló kísérleteket hajtottunk végre más Fisher-féle immun-típusú *P. aeruginosa* fertőzéssel 5LD₅₀ mennyiségben, ez nem eredményezett védelmet 6F11 antitestekkel. Ezek az adatok világosan demonstrálják, hogy a passzívan átvitt 6F11 antitest teljes és fajlagos védelmet nyújt *P. aeruginosa* halálos fertőzést jelentő adagja ellen.

II. példa

A II. példa módszert mutat be Fisher-féle 4. immun-típusú *P. aeruginosa* elleni humán monoklonális antitest előállítására.

Perifériás vér limfocitákat (PBL) alkalmaztunk, amelyeket előzőleg *P. aeruginosa*-val fertőzött emberből nyertünk. Tíz lemezt oltottunk be 2000 E⁻ PBL/üreg-gel plusz 40 000 1A2 sejt/üreg-gel Iscove-féle módosított Dulbecco tápközegben, amely ki volt egészítve 15% (térf./térf.) FCS-sel, 2 mmól/l L-glutamminal, 1000 nemzetközi egység penicillinnel, 100 µl/ml sztreptomocinnel és HAT-tal, ahogyan ezt az I. példában leírtuk. Ezt a tápközeg összeállítást ezután itt Iscove-féle tápközegnek fogjuk nevezni. Az I. példában leírt meghatározási eljárást alkalmaztuk, kivéve, hogy az *E. coli* és *K. pneumoniae* lemezeket nem alkalmaztunk. Az üregek egyikének, amelyet 9D10-nek neveztünk, felülszorbja csak a Fisher-féle 4-7. immun-típusú tartalmazó lemezen volt pozitív, és ezt követően ezt Fisher-féle 4. immun-típusra fajlagosan határoztuk meg, amikor az egyedi immun-típusú antigén-lemezen mértük. A sejtek klónozását a 9D10 üregből besugárzott humán PBL-t ($2,5 \cdot 10^5$ /üreg) alkalmazva tápláló sejtekként 0,5 területű 96 üreges laposfenekű lemezen, és Iscove-féle tápközegre alkalmazva HAT kiegészítés nélkül végeztük, de az eljárás egyébként ugyanaz volt, amelyet korábban leírtunk. A jelen szabadalmi bejelentés benyújtása előtt az itt leírt 9D10 sejtvonalat elhelyeztük az Amerikai Fajta-tenyésztési Gyűjteményben (ATCC), ahol a CRL 8752 jelzést kapta.

A 9D10 antitestet IgM-ként jellemeztük a korábban leírt izotípus meghatározásban és kimutattuk, hogy csupán az IATS-féle 1. törzssel reagál egy IATS szerotípusokra végzett fajlagossági vizsgálatban. A korábban leírt eljárást alkalmazva az immun-folt elemzéshez, a szóban forgó antitest csak a Fisher-féle 4. immun-típusú LPS-sel reagált, valamint a Fisher-féle 4. immun-típusú baktériumokból nyert külső membrán-készítményekkel, létra-szerű profilt mutatva, amely hasonló ahhoz, amelyet a 6F11 antitestnél bemutattunk.

A korábbi eljárásokat alkalmazva az in vitro és in vivo aktivitásokhoz, a következő eredményeket nyertük:

3. táblázat

Opszonofagocitás vizsgálat;
9D10 antitest^a Komplement^b A beadott ³H-Fisher-féle
4. immun-típusú baktériumok százalékos felhasználása

-	-	8,4
+	-	4,9
-	+	9,5
+	+	65,3

^a(-)=tenyésztő tápközeg

^b(-)=hővel inaktivált komplement

Az in vivo adatokkal kapcsolatban lásd a III. példa végén levő táblázatban a 9D10 antitestre vonatkozó adatokat.

III. példa

A III. példa módszert mutat be Fisher-féle 1. és 4. immun-típusú *P. aeruginosa* elleni humán monoklonális antitestek előállítására.

Az alkalmazott limfocita-forrás epehólyag-fibrozisban szenvedő betegtől származott, akinek széruma több Fisher-féle immun-típusú LPS-re a normálisnál nagyobb titert tartalmazott. Ebben az esetben öt lemezt oltottunk be 15000 PBL/üreg + 140 000 1A2 sejt/üreg koncentrációkkal. Ugyanazt az Iscova-féle tápközeg készítményt alkalmaztuk, amelyet a II. példában leírtunk, de kiegészítettük még 0,5 µg/ml ciklosporán A-val abból a célból, hogy funkcionálisan inaktiváljuk a T-sejteket. Nem volt T-sejt legyengítés az ebben a kísérletben alkalmazott AET-SRBC-vel végzett rozettaképzés során. A ciklosporin A jelenlétét addig tartottuk fenn a tápközegben, amíg az alapminta üreget le nem vizsgáltuk.

A tenyésztet felülűszók átvizsgálását a II. példában leírt módon hajtottuk végre. A C5D5 jelzésű üregből nyert felülűszó csak a Fisher-féle 4-7. immun-típusú baktériumokra bizonyult fajlagosnak a korábban leírt egyedi immun-típusú antigén lemezekon vizsgálva. A

C5B7 jelzésű üregből nyert másik felülűszó csak a Fisher-féle 1-3. immun-típusú lemezen reagált, és ez Fisher-féle 1. immun-típusú baktériumokra bizonyult fajlagosnak a korábban leírt egyedi immun-típusú antigén lemezekon vizsgálva. A jelen szabadalmi bejelentés benyújtása előtt a CSB7 és CSD5 sejt vonalakat elhelyeztük az Amerikai Fajta-tenyésztet Gyűjteményben (ATCC), ahol a CRL8753, illetve CRL 8754 megjelölést kapták. Mind a CSD5-ről, mind a CSB7-ről kimutattuk, hogy IgM típusúak, amint ezt a korábban leírt izotípus-elemzéssel meghatároztuk. A CSD5 csupán az IATS-féle 1. törzssel reagált, míg a CSB7 csak az IATS-féle 6. törzssel reagált, amint ez várható is volt a Fisher-féle immun-típusok és az IATS-féle szerotípusok közti összefüggésből.

Az immun-folt elemzésben a szóban forgó C5D5 antitestről kimutattuk, hogy csak Fisher-féle 4. immun-típusú LPS-sel és a Fisher-féle 4. immun-típusú baktériumokból származó külső membrán-készítményekkel reagált, létra-szerű profilt mutatva hasonlóan ahhoz, mint amelyet a 6F11 antitestnél leírtunk.

Egy hasonló immun-folt elemzésben a CSB7 antitest csak a Fisher-féle 1. immun-típusú LPS-sel és a Fisher-féle 1. immun-típusú törzsből származó külső membrán-készítményekkel reagált, létra-szerű profilt mutatva.

Az előzőleg leírt in vitro és in vivo vizsgálatok eredményeit a 4. táblázatban adjuk meg.

4. táblázat

a. Opszonofagocitás vizsgálat
C5D5 Komplement^b A bevitt ³H-Fisher-féle
antitest^a 4. immun-típusú
baktérium
százalékos felhasználása

-	-	8,4
+	-	6,3
-	+	9,5
+	+	56,1

45 C5B7 Komplement^b A bevitt ³H-Fisher-féle
antitest^a 1. immun-típusú
baktérium
százalékos felhasználása

-	-	6,3
+	-	6,9
-	+	17,7
+	+	56,3

^a(-)=tenyésztet-tápközeg

^b(-)=hővel inaktivált komplement

b. In vivo védelmet vizsgáló tanulmányok

C5D5 + 9D10	Élők száma/teljes szám három nappal a baktériumok beadása után
Tápközeg	0/10
C5B7 (Anti-Fisher-féle 4. törzs)	10/10
C5B5 (Anti-Fisher-féle 1. törzs)	1/10
9D10 (Anti-Fisher-féle 4. törzs)	8/10

3 nap után nem volt további változás
A fertőzés (beadás) adagja: 5LD₅₀ élő Fisher-féle
4. immun- típusú baktérium.

IV. példa

A IV. példa módszert mutat be Fisher-féle 5. és 6. immun-típusú *P. aeruginosa* elleni humán monoklonális antitest előállítására, továbbá bemutatja az említett antitestek in vivo védő aktivitását homológ törzsek halálos fertőzése ellen.

Egy epehólyag-fibrózisban szenvedő betegről, akitől tudtuk, hogy krónikus *P. aeruginosa* fertőzésben szenved, perifériás vérmintát nyertünk. Egymagvú sejteket különítettünk el a vérből az I. példában leírtak szerint. Az érzékeny B sejtek sejttel hajtott transzformálását a III. példánál leírtak szerint hajtottuk végre azzal a különbséggel, hogy 23 lemezt oltottunk be 20 000 egymagvú sejt/üreg-gel plusz 80 000 1A2 sejt/üreg-gel kerek fenekű, 96 üreges lemezek (Costar 3799).

A tenyésztet felülűsző átvizsgálását fajlagos antitestekre az I. példában leírt ELISA vizsgálat módosított formáját alkalmazva végeztük. Az antigén-lemezek 96 üreges, laposfenekű mikrotitráló lemezekből (Immunlon II, Dynatech) álltak, amelynek üregei különböző élő baktériumokat tartalmaztak az üregek fenekéhez adszorbeálva. Hogy megkönnyítsük a baktériumok adszorpcióját a műanyaghoz, 50 µl/üreg poli-L-lizint (PLL) (1 µg/ml PBS-ben, pH 7,2) inkubáltunk 30 perccel szobahőmérsékleten. A nem adszorbeált PLL-t azután kiráztuk, a lemezeket egyszer kimostuk PBS-sel, 50 µl, PBS-ben levő, mosott baktérium-szuszpenziót (OD₆₆₀=0,2) adtunk minden egyes üreghez, és a lemezeket inkubáltuk 1 órán át 37 °C hőmérsékleten. A nem adszorbeált baktériumokat a lemez háromszori sóoldat-Tween-es átmosásával [0,9% NaCl, 0,05% (térf./térf.) Tween-20] távolítottuk el. A lemezek baktérium-összetétele ugyanaz volt, mint az I. példánál azzal a kivétellel, hogy *E. coli* vagy *K. pneumoniae* lemezt nem alkalmaztunk. Az ELISA eljárást úgy indítottuk el, hogy először a lemezeket blokkoltuk 200 µl/üreg blokkoló pufferal [PBS, pH 7,2, amely még 5 súly/térf. % nem zsíros tejport, 0,01% (térf./térf.) Antifoam A (Sigma) habgátlót és 0,01 tömeg/térf. % Timerozánt tartalmaz] 60 perccel szobahőmérsékleten. A blokkolás után a lemezeket háromszor mostuk sóoldat-Tween-nel (lásd fentebb). 50 µl PBS-t (pH 7,2), amely még 0,1% Tween 20-at és 0,2% (tömeg/térf.) BSA-t is tartalmazott, helyeztünk minden

egy üregbe. A tenyésztő lemezek üregeiből származó felülűszőkat egy másolat (replika) lemeze helyezettük, az antigén-lemezek megfelelő üregeibe 50 µl-t helyezve, és a lemezeket 30 perccel inkubáltuk szobahőmérsékleten. A felülűszőkat ezután eltávolítottuk, az üregeket háromszor mostuk sóoldat-Tween-nel (lásd fentebb), és 50 µl megfelelően hígított torna-peroxidázt (HRP), amely kecske anti-humán IgG + IgM-hez (Amerikan Qualex International, A 1114 szám+A 1124 szám) volt hozzákapcsolva, adtunk az üregekhez. Ebben a példában a HRP-kecske anti-IgG-t és HRP-kecske anti-IgM-et 1:5000, illetve 1:3000 végső hígításban alkalmaztunk, a hígítást PBS-ben (pH 7,2) végezve, amely még tartalmazott 0,05% Tween 20-at és 0,1% BSA-t, 30 perccel inkubálást követően szobahőmérsékleten, az enzimmel konjugált kecske antitestek főlegét eltávolítottuk és az üregeket háromszor mostuk sóoldat-Tween-nel. Az ELISA mérés további részét, beleértve a szubsztrátum hozzáadását és az ezt követő színkifejlesztést, az I. példában leírtak szerint hajtottuk végre.

A fenti módszerrel végezve a tenyésztet felülűszőkat elemzését, az elemzés két olyan üreg (13Cl és 5G2) azonosításához vezetett, amelyek csak a Fisher-féle 4-7. immun-típusú lemezekon voltak pozitívak. ELISA-val ezt követően egyedi immun-típusú antigén lemezekon meghatároztuk, hogy a 13Cl üregben levő antitest Fisher-féle 5. immun-típusú volt, míg az 5G2 üregben levő antitest Fisher-féle 6. immun-típusra volt fajlagos. Az I. példában leírt módon, de ELISA formát és a jelen példában leírt HRP-anti-humán IgG és HRP-anti-humán IgM reagenseket alkalmazva elvégzett izotípus-meghatározás IgM reagenseket alkalmazva elvégzett izotípus-meghatározás IgM izotípust mutatott ki a fenti Fisher-féle immun-típusú fajlagos antitestek mindegyikéhez.

A 13Cl és 5G2 üregekből származó fajlagos antitest-termelő sejtek klónozását úgy végeztük, hogy a sejteket mindkét üregből egymástól függetlenül számtalan korlátozott hígítású klónozási sornak vetettük alá, amíg az összes vizsgált klónozott felülűsző a fenti ELISA eljárással nem eredményezett pozitív reakciót a megfelelő Fisher-immun-típussal. A klónozást 96 üreges kerekfenekű lemezekon hajtottuk végre, 1•10⁵ besugárzott (2400 Rad) humán PBL-lel, mint tápláló sejtrel üregenként. Hét nappal később további 1•10⁵ besugárzott PBL-t adtunk minden egyes üreghez. Az így létrejött klónozott sejtvonalat, amely anti-Fisher-féle 6. immun-típusú humán monoklonális antitestet termelt, 5G2-vel jelöltük. A klónozó vonalak bármelyike által termelt monoklonális antitest ugyanazt a jelzés viseli, mint a megfelelő vonal, amely előállította azt.

A jelen szabadalmi bejelentés benyújtása előtt az itt leírt 13Cl és 5G2 sejtvonalakat elhelyeztük az Amerikai Fajtatenyésztet Gyűjteményben (ATCC), ahol ezek a CRL 8796 és CRL 8797 jelzést kapták.

Az immun-folt elemzést a hét Fisher-féle immun-típus mindegyikéből nyert külső membrán készítményen (OMP) hajtottuk végre 13Cl és 5G2 monoklonális antitestekkel, amint ezt az I. példában leírtuk, de

némi, következő módosításokkal. A monoklonális antitestet inkubálása és az ezt követő PBS-Tween- és mosási sorozat után az NCM foltok mindegyikét 1 órán át 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk 1:1000 hígításban (PBS-Tween-ben) levő, kecske-anti humán IgG + IgA + IgM-mel (Zymed) kapcsolt alkális foszfátzsal. A foltokat azután ötször öt perces mosásnak vetettük alá PBS-Tween-ben, ekkor pedig az antigén-antitest kölcsönhatást láthatóvá tettük a foltokat 20–30 percig 25 °C hőmérsékleten 30 ml nitro-kék-tetrazólium/5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát (NBT-BCIP) szubsztátumban inkubálva, amint ezt Leary és munkatársai leírták (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80, 4045–4049). A szín kifejtésének leállítására a foltot többször ionmentes vízben leöblítettük. A 13Cl és 5G2 monoklonális antitestek pozitív reakciót csak homológ antitest: bakteriális külső membrán kombináció esetében adtak. Ez azt jelenti, hogy a 13Cl monoklonális antitest csupán a Fisher-féle 5. immun-típusú baktériumok OMP-jével reagált, míg az 5G2 monoklonális antitest csupán a Fisher-féle 6. immun-típusú baktériumok OMP-jével reagált. A reakció mindkét esetben szabályos térfokú csúkok létre-szerű profilját eredményezte, ami arra enged következtetni, hogy az LPS a felismert molekuláris cél. Annak alátámasztására, hogy az LPS a célzott antigén, meg kell továbbá jegyezni, hogy a létre-szerű profilok változatlanok voltak minden esetben, amikor az OMP-eket hővel kezeltük (100 °C, 1 óra), majd 60 °C hőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk K proteináz (Boehringer, Mannheim, NSZK) jelenlétében (10–20 µg/50 µg fehérje a mintában) az elektroforézis előtt. Az utóbbi kezeléssel ismert, hogy elroncsolja a fehérje-antigéneket.

A 13Cl és 5G2 humán monoklonális antitestek in vitro funkcionális aktivitását vizsgáltuk meg opszonofagocitáz baktericid vizsgálatban. Triptonos-szójás tápközegben nőtt, logaritmikus növekedési fázisban levő baktériumokat nyertünk ki a tenyészetből, újra szuszpendáltunk Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldatban, amely még 0,1% zselatint és 5 mmól/l HEPES-t is tartalmazott (HBSS/GEL/HEPES), OD₆₆₀=0,100 értékre, majd ugyanezzel a pufferral 1:1000 arányban felhígítottuk. Egészséges önkéntesek alvadt vérből származó szérum szolgáltatott humán komplement-forrásként. Használat előtt kilenc rész szérumot egyesítettünk 1 rész 0,1 mól/l-es EDTA-val (pH 7,2), majd adszorbeáltattuk P. aeruginosa hét Fisher-féle immun-típusával, amint ezt az I. példában részletesen leírtuk. Hogy megakadályozzuk az alternatív út komplement-komponenseinek aktiválódását, az adszorbeált szérumot tovább kezeltük zymosan-nal (Sigma) a properdin eltávolítása céljából, amint ezt Bjornson és Michael leírták [*J. Inf. Dis.* (1974), 130. Kiegészítés, S 119–S 125].

A reakciót 1,5 ml-es, polipropilénből készült kúpos csőben úgy indítottuk meg, hogy 100 µl baktérium-suszpenziót egyesítettünk 50 µl, monoklonális antitestet tartalmazó felhígítással. 30 percen át szobahőmérsékleten végeztünk inkubálást után 50 µl komplementet, 50 µl neutrofil sejt-suszpenziót és 250 µl HBSS/GEL/HEPES-t adtunk minden egyes csőhöz. A csöveket további

egy órán át inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten, rázógépen, ezután 10 µl-t minden csőből összekevertünk 3 ml folyékony triptonos-szójás agarral (45 °C hőmérsékleten) és a keveréket triptonos-szójás agarlemezekre öntöttük. Miután az agart megfelelő ideig szilárdulni hagytuk, a lemezre további 3 ml folyékony triptonos-szójás agart rétegeztünk. A lemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten, és a következő napon a keletkezett baktérium-telepeket megszámloltuk Quebec telepszámlálóval. Megfelelő kontrollokat is vettünk fel, hogy megvizsgáljuk az antitest fajlagosságát, valamint azt, hogy a baktericid aktivitás vajon az opszonofagocitózis eredménye volt vagy sem; a kontrollokat úgy készítettük, hogy (1) nem a megfelelő monoklonális antitestet adtuk a megfelelő antitest helyett, illetve (2) a neutrofil sejteket HBSS/GEL/HEPES-sel helyettesítettük. Amint az alábbi 5. táblázatból látható, a 13Cl és 5G2 monoklonális antitestek baktericid hatásuk voltak homológ törzseiket illetően. Az eredmények minden esetben azt jelzik, hogy az opszonizált baktériumok fagocitáz-felvétel a humán neutrofil sejtek által elsődlegesen felelős a baktérium-szám csökkenéséért. Ezeknek a kísérleteknek a megismétlése nem homológ antitest-baktérium kombinációkkal nem eredményezett bakteriális felvételt, így demonstrálva a fenti antitestek, mint opszonizáló antitestek mindegyikének funkcionális fajlagosságát.

5. táblázat

Opszonofagocitáz baktericid vizsgálat		
13Cl antitest ^a	Neutrofil sejtek ^b	Baktérium-telepek száma ^c
–	–	844
+	–	721
–	+	756
+	+	11

^a(–)=humán anti-Fisher-féle 2. immun-típusú 6F11 monoklonális antitest

^b(–)=HBSS/GEL/HEPES csupán

^c=a kísérlet Fisher-féle 5. típusú baktériummal volt végrehajtva

5G2 antitest ^a	Neutrofil sejtek ^b	Baktérium-telepek száma ^c
–	–	451
+	–	422
–	+	570
+	+	166

^a(–)=humán anti-Fisher-féle 2. immun-típusú 6F11 monoklonális antitest

^b(–)=HBSS/GEL/HEPES csupán

^c=a kísérlet Fisher-féle 6. típusú baktériummal volt végrehajtva

Az I. példában részletesen leírt folyamatot alkalmazva a monoklonális antitestek in vivo aktivitásának becslésére a következő eredményeket nyertük (6. táblázat), amelyek világosan demonstrálták, hogy a 13C1 és 6G2 antitestek védelmet nyújtanak a homológ törzs halálos adagja ellen.

6. táblázat
In vivo védelemre vonatkozó tanulmányok

13C1	élők száma/teljes szám 3 nappal a beadás után
13C1 (Anti-Fisher-féle 5. immun-típus)	10/10
CSB7 (Anti-Fisher-féle 1. immun-típus)	0/10
További változás 3 nap után nem történt	
Fertőzőési adag: 5 LD ₅₀ élő Fisher-féle 5. immun-típusú baktérium	
5G2	élők száma/teljes szám 3 nappal a beadás után
5G2 (Anti-Fisher-féle 6. immun-típus)	10/10
C5B7 (Anti-Fisher-féle 1. immun-típus)	0/10
További változás 3 nap után nem történt	
Kihívási adag: 5 LD ₅₀ élő Fisher-féle 6. immun-típusú baktérium	

V. példa

Az V. példa módszert mutat be Fisher-féle 7. immun-típusú *P. aeruginosa* elleni humán monoklonális antitest előállítására, továbbá bemutatja az említett antitest védő aktivitását in vivo a homológ törzs halálos kimenetelű fertőzése ellen.

Egy epehólyag-fibrózisos betegről, akiről ismert volt, hogy krónikus *P. aeruginosa* fertőzésben szenved, perifériás vérmintát vettünk. Egymagvú sejteket különítettünk el a vérből olyan módon, ahogyan ezt az I. példában leírtuk. Az érzékeny B sejtek sejttel hajtott transzformálását a II. példában leírtak szerint hajtottuk végre azzal a kivétellel, hogy nyolc lemezt oltottunk be 8000 EPBL plusz 60 000 1A2 sejt/üreg-gel kerekfenekű, 96 üreges lemezekre.

A tenyésztet felülűszóinak átvizsgálását fajlagos antitestekre a IV. példában leírtak szerint hajtottuk végre. Az üregek egyikének, a 8E7 jelűnek felülűszója pozitív eredményt adott, de csak a Fisher-féle 4–7. immun-típusú lemezekre, ezt később Fisher-féle 7. típusra fajlagosan határoztuk meg, amikor az egyedi immun-típusú antigén-lemezekre határoztuk meg. Az izotípus meghatározás, amelyet a IV. példában leírtak szerint végeztünk, megmutatta, hogy ez IgM izotípusú, a Fisher-féle 7. immun-típusra fajlagos antitest.

A 8E7 üreg fajlagos antitest-termelő sejteinek klónozását a IV. példában leírt folyamatot követve hajtottuk végre. Az így létrejött klónozott sejtvonalat, amely anti-Fisher-féle 7. immun-típusú humán monoklonális antitestet termelt, 8E7-nek jelöljük. Az ez által a vonal által termelt monoklonális antitest ugyanezt a jelzést viseli. A jelen szabadalmi bejelentés benyújtása előtt az itt leírt 8E7 sejtvonalat elhelyeztük az Amerikai Fajta-tenyésztési Gyűjteményben (ATCC) ahol ez a CRL 8795 jelzést kapta.

A IV. példában leírt módon végrehajtott immun-folt elemzés a hét Fisher-féle immun-típus mindegyikéből nyert külső membrán-készítményeken (OMP) 8E7 monoklonális antitesttel csak a Fisher-féle 7. immun-típusú baktériumból nyert OMP-n mutatott pozitív reakciót. A reakció szabályos térfokú csíkok létrehozását eredményezte, ami arra vall, hogy az LPS a felismert molekuláris cél. Az immun-folt profil-változatlan maradt, amikor a Fisher-féle 7. immun-típusú OMP-t melegítettük és K-proteinnal kezeltük (lásd IV. példa) az elektroforézis előtt, tovább erősítve azt a feltevést, hogy az LPS a cél-antigén.

Az I. példában részletezett folyamatot alkalmazva a 8E7 monoklonális antitest in vivo aktivitásának becslésére a következő eredményeket nyertük (7. táblázat), amelyek világosan demonstrálták, hogy a 8E7 antitest védelmet nyújt a Fisher-féle 7. immun-típusú baktériumok halálos kihívást jelentő adagja ellen.

7. táblázat
In vivo védelemre vonatkozó tanulmányok

8E7	élők száma/teljes szám 3 nappal a beadás után
8E7 (Anti-Fisher-féle 7. immun-típus)	10/10
CSB7 (Anti-Fisher-féle 1. immun-típus)	1/10
További változás 3 nap után nem történt	
Fertőzőési adag: 5 LD ₅₀ élő Fisher-féle 7. Immun-típusú baktérium	

VI. példa

A VI. példa módszereket mutat be a *P. aeruginosa*-tól különböző *Pseudomonas*-fajok LPS molekuláin levő szerotípusos determinánsok elleni humán monoklonális antitestek előállításához. A példa továbbá módszereket mutat be az így termelt humán monoklonális antitestekből olyanok kiválasztására, amelyek védő hatást mutatnak emlősökben homológ baktériumok halálos adagja ellen.

Az I–IV. példákban leírt eljárásokat lehet ismételni, kiindulási anyagként olyan limfocitákat alkalmazva, amelyeket más *Pseudomonas*-fajoknak (pl. *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri* és *P. maltophilia*) kitett humán donorokból nyertünk ki. A lehetséges donorkat úgy lehet átvizsgálni, ahogyan ezt a IV. példában bemutattuk, hogy

meghatározzuk azokat a személyeket, akik a különböző *Pseudomonas* fajok és ilyen fajokon belül különböző altípusok hatásának voltak kitéve. Az I-IV. példákban leírt folyamatokat elvégezve örökös humán sejtvonalakat hozunk létre, amelyek típus-fajlagos humán monoklonális antitesteket választanak ki a *Pseudomonas* ilyen fajai egyedi típusainak LPS molekulái ellen. Ezeknek a monoklonális antitesteknek a további elemzése az I-IV. példákkal összhangban azonosíthatja azokat az antitesteket, amelyek védő hatásúak a homológ törzsnek tulajdonítható fertőzés halálos következményei ellen.

VII. példa

A VII. példa módszereket mutat be a *Pseudomonas* nemzetségtől eltérő gram-negatív baktériumok törzseinek LPS molekuláin levő szerotípusos determinánsok elleni humán monoklonális antitestek előállítására. A példa továbbá módszert mutat be az így nyert humán monoklonális antitestekből olyanok kiválasztására, amelyek védő hatást mutatnak emlőskben homológ baktériumok halálos adagja ellen.

A I-IV. példákban leírt eljárásokat lehet ismételni, kiindulási anyagként olyan limfocitákat alkalmazva, amelyeket gram-negatív baktériumok más törzseinek (pl. *E. coli*, *K. Pneumoniae*, *P. vulgaris* és *S. marcescens*) kitett humán donorokból nyertünk ki. A lehetséges donorokat át lehet vizsgálni, hogy azonosítsuk azokat a személyeket, akik korábban az ilyen baktériumok különböző törzseinek voltak kitéve. A korábbiakban leírt folyamatokat kivitelezve folytonos humán sejtvonalakat hozhatunk létre, amelyek az *E. coli*, illetve *P. vulgaris*, illetve *S. marcescens* LPS molekuláin levő szerotípusos determinánsok elleni humán monoklonális antitesteket választanak ki. Ezeknek a humán monoklonális antitesteknek a korábban leírt módon végzett elemzése kimutatja, mely antitestek védő hatásúak a homológ törzsnek tulajdonítható fertőzés halálos következményei ellen, feltéve, hogy a homológ törzs megcélzott LPS molekulái „hozzáférhető” (lásd az LPS molekulák „hozzáférhetőség”-ére vonatkozó korábbi fejtegetéseket).

Farmakológiai készítmények és alkalmazás

A jelen találmány szerinti antitesteket be lehet építeni komponensként olyan gyógyászati készítményekbe, amelyek terápiás vagy profilaktikus mennyiségben tartalmazzák a jelen találmány szerinti monoklonális antitestek legalább egyikét egy gyógyászati hatásos hordozóval. Egy gyógyászati hordozó lehet bármilyen összeférhető, nem toxikus anyag, amely alkalmas arra, hogy a monoklonális antitestet a beteghez továbbítsa. Steril víz, alkohol, zsírok, viaszok és közömbös szilárd anyagok alkalmazhatók hordozóként. Gyógyászati elfogadott adjuvánsok (pufferoló szerek, diszpergáló szerek) szintén beépíthetők a gyógyászati készítménybe. Az ilyen készítmények tartalmazhatnak egyedi monoklonális antitesteket, úgy, hogy ez csak egy bizonyos baktérium-törzs vagy típus ellen fajlagos. Ez azt az előnyt nyújtja, hogy tökéletesen fajlagos anyag lé-

vén nem tartalmaz többlet-antitesteket. Az ilyen terméknek viszont hátránya az, hogy annyira fajlagos, hogy nem lehet széles az alkalmazási köre. Egy másik módszer szerint egy, gyógyászati készítmény tartalmazhat kettő vagy több monoklonális antitestet „koktél”-t képezve. Így pl. *P. aeruginosa*-nál egy koktél, amely az immun-típusok vagy szerotípusok mindegyike elleni humán monoklonális antitesteket tartalmazza, univerzális termék lehet a szóban forgó baktérium általános típusainak nagy többsége elleni aktivitással. Más fajok és törzsek esetében éppen úgy alkalmazhatók egyedi antitestek, vagy antitestek keverékei.

Különös érdekességek azok a gyógyászati készítmények, amelyek legalább két, általában legalább három, még általánosabban legalább négy, gyakrabban legalább hét, de akár még tíz vagy több humán monoklonális antitestet is tartalmaznak. Különös érdekességek legalább két humán monoklonális antitest kombináció, amelyek fajlagosan reagálnak legalább két Fisher-féle immun-típussal, pontosabban a Fisher-féle 1., 2., 3., 4., 5., 6. és 7. immun-típusból kettővel, de előnyösen legalább négygyel. Az előnyös kompozíciók legalább négy Fisher-féle immun-típussal reagálnak, még előnyösebben öt-hat immun-típussal és legelőnyösebben mind a hét immun-típussal.

A különböző komponensek molarányai általában nem különböznek jobban, mint 1:10 arányban, de leginkább 1:1–2 molarányban találhatók meg a készítményben bármelyik másik komponensre vonatkoztatva.

A jelen találmány szerinti humán monoklonális antitestek és gyógyászati készítményeik főleg szájon át és parenterálisan használatosak. A gyógyászati készítményeket előnyösen parenterálisan lehet beadni pl. szubkután, intramuszkuláris vagy intravénás formában. Így a jelen találmány parenterális beadáshoz való készítményeket szolgáltat, amelyek humán monoklonális antitesteket vagy azok „koktél”-ját tartalmazzák elfogadható hordozóban, előnyösen vizes hordozóban oldva. A vizes hordozók széles választéka alkalmazható, pl. víz, pufferolt víz, 0,4%-os sóoldat, 0,3%-os glicin-oldat, stb. Ezek az oldatok steril és általában mentesek a szilárd részecskéktől. Ezeket a készítményeket hagyományos, jól ismert technikákkal lehet sterilizálni. A készítmények tartalmazhatnak gyógyászati lag elfogadható kiegészítő anyagokat, amelyek a hozzátétőlegesen fiziológiás körülményekhez szükségesek, mint pl. pH beállító és pufferoló szerek, tónus-beállító szerek és hasonlóak, pl. nátrium-acetát, nátrium-klorid, kálium-klorid, kalcium-klorid, nátrium-laktát, stb. Az antitest koncentrációja ezekben a készítményekben széles határok közt változhat, pl. kevesebb, mint 0,5%-tól, de inkább 1%-tól akár 15 vagy 20 tömeg%-ig is és ezt elsődlegesen a folyadék-térfogat, viszkozitás, stb., alapján, de még inkább előnyösen a kiválasztott beadási mód alapján szabják meg.

Így intramuszkuláris injekcióhoz szolgáló tipikus gyógyszerkészítményt lehet elkészíteni 50 mg monoklonális antitestből és 1 ml steril, pufferolt vízből. Intravénás infúzióhoz való tipikus készítmény 250 ml steril

Ringer-oldatot és 150 mg monoklonális antitestet tartalmaz. Parenterálisan beadható készítmények elkészítéséhez aktuális módszerek ismertek vagy nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen jártasak, és ilyenek részletesen le is vannak írva pl. a *Remington's Pharmaceutical Science* c. könyvben [15. kiadás, kiadó: Mac Publishing company, Easton Pennsylvania (1975)], amelyet referenciaként építünk be ebbe a bejelentésbe.

A jelen találmány szerinti antitesteket tárolás céljából lehet liofilezni, és használat előtt megfelelő hordozóban helyreállítani. Erről a technikáról már kimutatták, hogy hatásos hagyományos immunglobulinokkal, és a szakterületen ismert liofilezési és helyreállítási technikákat lehet alkalmazni. Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy a liofilezés és a helyreállítás az antitest-aktivitás változó mértékű veszteségéhez vezethet (pl. hagyományos immunglobulinoknál az IgM antitestek nagyobb aktivitás-vesztés felé mutatnak, mint az IgG antitestek), és hogy az alkalmazási szinteket ehhez kell igazítani, hogy kiigyenlítsük a veszteségeket.

A jelen humán monoklonális antitesteket vagy koktéjjaikat tartalmazó készítményeket be lehet adni gram-negatív baktériumok elleni profilaktikus és/vagy terápiás kezeléshez. A gyógyászati alkalmazásban a készítményeket a már gram-negatív baktériumokkal fertőzött betegek adjuk be olyan mennyiségben, amely alkalmas kigyógyítani a beteget vagy legalább részben visszaszorítani a fertőzést és következményeit. Azt a mennyiséget, amely képes véghezvinni ezt, mint „terápiásan hatásos adag”-ot nevezzük meg. Az ehhez az alkalmazáshoz hatásos adag függ a fertőzés súlyosságától és a beteg saját immun- rendszerének általános állapotától, de általában az 1–200 mg antitest/testsúly kg tartomány, 5–25 mg/kg-os adagokkal előnyös alkalmazni. Figyelembe kell venni, hogy a jelen találmány szerinti anyagokat általában súlyos betegség állapotában alkalmazhatjuk, azaz életet fenyegető vagy potenciálisan életet fenyegető helyzetekben, különösen bakterémiában és endotoxémiában. Ilyen esetekben az extra anyagok távollétének és az „idegen anyag” kiűrités távollétének szempontjai a jelen találmány szerinti humán monoklonális antitestekkel ki vannak elégítve, ezért lehetséges és kívánatosnak is érezhető a kezelő orvos részéről, hogy ezeknek az antitesteknek jelentős fölöslegét adja be.

A profilaktikus alkalmazásban a jelen antitesteket vagy koktéjjaikat tartalmazó készítményeket olyan pácienseknek adjuk be, akik még nincsenek megfertőzve gram-negatív baktériumokkal, hogy növeljük a páciens ellenállóképességét egy ilyen lehetséges fertőzéssel szemben. Egy ilyen mennyiséget „profilaktikusan hatásos adag”-ként határozzuk meg. Ebben a felhasználásban a pontos mennyiségek ismét függnek a páciens egészségi állapotától és immunitásának általános szintjétől, de általában a 0,1 mg/kg és 25 mg/kg közti tartományban, elsősorban a 0,5 mg/kg és 2,5 mg/kg közti tartományban vannak.

A készítmények egyszeri vagy többszöri beadását adagolási szintekkel és mennyiségekkel lehet végre-

hajtani, ahol a megfelelő formát a kezelő orvos választja ki. Bármilyen esetben a gyógyászati kiszerezési formáknak olyan mennyiségű, jelen találmány szerinti antitesteket (egy- vagy többfelét) kell szolgáltatniuk, amely elegendő a páciensek hatásos kezeléséhez.

Bár az itt leírt találmány több eljárást részletesen bemutatott illusztráció céljából a megértés tisztasága érdekében, nyilvánvaló, hogy bizonyos változtatások és módosítások gyakorlatilag is végrehajthatók az ez után következő szabadalmi igénypontok által megszá-
bott oltalmi körön belül.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás folyamatosan élő sejtvonala előállítására, mely egy gram-negatív baktérium hozzáférhető lipopoliszacharid molekuláin levő szerotípusos determinánsokkal fajlagosan reagáló humán monoklonális antitesteket választ ki, *azzal jellemezve*, hogy gram-negatív baktériumokkal fertőzött humán donorokból származó B limfocitákat immortalizálunk és gram-negatív baktériumok szerotípusos determinánsai elleni humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalaikat szelektáljuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a B limfocitákat sejttel hajtott transzformációval immortalizáljuk.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Pseudomonadaceae családba tartozó gram-negatív baktériumokhoz kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalaikat szelektáljuk.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Pseudomonas szerotípusos determinánsához kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalaikat szelektáljuk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Pseudomonas aeruginosa szerotípusos determinánsához kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalaikat szelektáljuk.
6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Fisher-féle 1–7. immun-típusú lipopoliszacharidokhoz kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalaikat szelektáljuk.
7. Eljárás gram-negatív baktériumok hozzáférhető lipopoliszacharid molekuláin levő szerotípusos determinánsokhoz specifikusan kötődő humán monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy gram-negatív baktériumok szerotípusos determinánsaihoz kötődő humán monoklonális antitesteket termelő immortalizált sejtvonalaikat tápközegben tenyésztünk, majd a monoklonális antitesteket elválasztjuk.
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy sejttel hajtott transzformációval immortalizált sejtvonalaikat tenyésztünk.
9. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Pseudomonadaceae családba tartozó gram-negatív baktériumokhoz kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalaikat tenyésztünk.
10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Pseudomonas szerotípusos determinánsához kötő-

dő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalakat tenyésztünk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* szerotípushoz kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalakat tenyésztünk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Fisher-féle 1-7. immun-típusú lipopoliszacharidokhoz kötődő humán monoklonális antitesteket termelő sejtvonalakat tenyésztünk.

13. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ATCC CRL 8562, CRL 8752, CRL 8753, CRL 8754, CRL 8795, CRL 8796 vagy CRL 8797 sejtvonalakat tenyésztjük.

14. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 7. igénypont szerint előállított humán monoklonális antitesteket gyógyászatilag alkalmazható hordozóanyaggal vagy -anyagokkal szokásos dózisformává alakítjuk.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy többféle különböző szerotípusos determináns-

hoz kötődő humán monoklonális antitestet alkalmazunk.

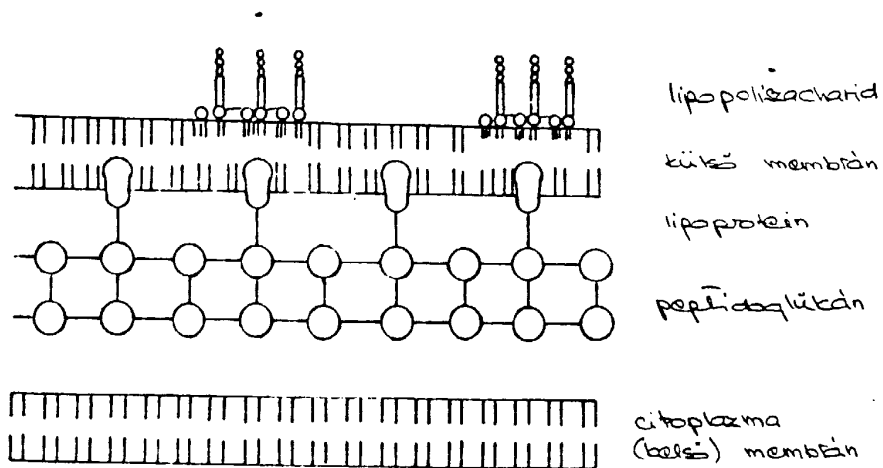
16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy többféle azonos species különböző szerotípusához kötődő humán monoklonális antitestet alkalmazunk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy többféle *Pseudomonas aeruginosa* különböző szerotípusához kötődő humán monoklonális antitestet alkalmazunk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy különböző *Pseudomonas aeruginosa* Fisher-féle 1-7. immun-típusú lipopoliszacharidokra specifikus humán monoklonális antitesteket alkalmazunk.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ATCC CRL 8562, CRL 8752, CRL 8753, CRL 8754, CRL 8795, CRL 8796 vagy CRL 8797 sejtvonalak által termelt humán monoklonális antitesteket alkalmazunk.

1. ábra



2. ábra

