

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 82 03018

⑤4

Anticorps monoclonaux.

⑤1

Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 45/02, 39/395; G 01 N 33/54.

⑫2

Date de dépôt..... 24 février 1982.

③3

③2

③1

Priorité revendiquée : Suisse, 27 février 1981, n° 1343/81 et 4 décembre 1981, n° 7773/81.

④1

**Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 35 du 3-9-1982.**

⑦1

Déposant : F. HOFFMAN-LA ROCHE & CIE société anonyme, résidant en Suisse.

⑦2

Invention de : Theophil Staehelin, Christian Stähli et Vincenzo Miggiano.

⑦3

Titulaire : Idem ⑦1

⑦4

**Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin & Schrimpf,
26, avenue Kléber, 75116 Paris.**

La présente invention concerne des anticorps contre des protéines, à savoir contre l'interféron de leucocyte humain (ILH) naturel ou obtenu par la technologie de l'ADN recombinant.

5 Il est possible que l'ILH représente une thérapeutique intéressante pour le traitement des maladies virales et néoplasiques. L'évaluation de cette substance et son développement possible en un médicament largement utilisé sont restreintes par la difficulté qu'il y a à purifier et à
10 caractériser la substance active de la manière appropriée. Un test qui pourrait être réalisé en moins de 24 h serait une contribution importante à la purification recherchée et à la caractérisation requise de l'ILH.

Dans le cadre de l'invention, on a maintenant trouvé que
15 pour purifier et déterminer l'ILH de manière parfaite on peut avoir recours à une collection d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre l'interféron de leucocyte naturel ou obtenu par la technologie de l'ADN recombinant.

L'invention concerne donc une collection d'anticorps
20 monoclonaux, caractérisée en ce que ses éléments sont dirigés contre l'interféron de leucocyte humain (ILH) naturel ou obtenu par la technologie de l'ADN recombinant.

Le mot de "collection" dénote sous ce rapport la totalité des anticorps ainsi que chaque élément pris en particulier.

25 Selon un aspect particulier de l'invention, les anticorps monoclonaux sont sécrétés par différents hybridomes.

Dans le cadre de l'invention on a montré que les
divers anticorps monoclonaux ne sont pas mutuellement inhibants, c'est-à-dire se lient ensemble à l'ILH, tandis que
30 d'autres sont mutuellement inhibants, c'est-à-dire qu'ils ne se lient pas simultanément à l'ILH. En outre, on a montré que la collection se compose de groupes d'anticorps monoclonaux, dont les éléments reconnaissent différents épitopes (déterminants antigéniques) d'ILH.

Une caractéristique de la collection d'anticorps monoclonaux selon l'invention tient à ce qu'au moins un anticorps ne reconnaît pas ILH γ_3 .

5 Dans le cadre de l'invention, on a montré en outre que la collection mentionnée ci-dessus se compose d'un groupe d'anticorps qui diffèrent l'un de l'autre dans leurs isotypes. 8 anticorps présentent une structure d'IgG, tandis qu'un présente une structure d'IgM. Parmi les 8 anticorps à structure d'IgG, 7 ont une chaîne lourde γ_1 et un a une chaîne
10 lourde γ_{2b} .

Un autre caractère de la collection d'anticorps monoclonaux selon l'invention tient à ce qu'un anticorps (IgM) ne neutralise pas l'activité antivirale de l'interféron de leucocyte humain.

15 Comme on l'a déjà mentionné, la collection de ces anticorps monoclonaux se caractérise en outre en ce qu'elle consiste en groupes d'anticorps, dont les éléments reconnaissent différents épitopes d'ILH. Un autre aspect de l'invention concerne donc l'application d'un élément de ce groupe d'anti-
20 corps pour un test sandwich en phase solide d'ILH. Dans le cas du test sandwich mentionné ci-dessus, on munit un anticorps d'un marquage approprié. A cet effet on peut envisager n'importe quel marquage approprié dans ce but, mais on préfère un marquage radioactif ou un marquage
25 enzymatique.

Un autre aspect de l'invention concerne l'application d'un anticorps provenant de la collection mentionnée ci-dessus à la purification d'ILH. La purification d'ILH au moyen de l'anticorps monoclonal s'effectue de préférence par
30 chromatographie d'affinité. Pour une purification à l'échelle commerciale l'affinité doit être suffisamment élevée pour que l'interféron soit retenu de façon pratiquement quantitative également avec de grands volumes qui passent dans la colonne avec une vitesse pas trop faible. Avec un seul anticorps

ceci n'est pas possible pour toutes les sous-classes d'interféron. Dans ce but une collection d'anticorps monoclonaux dont les différents membres présentent une affinité élevée pour des sous-classes particulières d'interféron est particulièrement appropriée.

La préparation des anticorps monoclonaux s'effectue selon une technologie de fusion cellulaire classique, dans laquelle on fusionne des cellules de myélome avec des cellules de rate de souris qui ont été immunisées avec ILH. Les hydridomes obtenus sécrètent des anticorps monoclonaux contre l'interféron de leucocyte naturel ou obtenu par la technologie de l'ADN recombinant.

La réalisation du test sandwich en phase solide pour la détermination d'ILH peut s'effectuer selon des procédés classiques, mais on peut retrouver une simplification substantielle, par opposition au procédé sandwich en phase solide classique, en faisant incuber des anticorps non marqués et marqués depuis le début ensemble et une fois seulement.

La purification de l'ILH au moyen d'un anticorps monoclonal peut s'effectuer selon des procédés classiques, grâce auxquels on a trouvé que la chromatographie d'affinité convient particulièrement. Dans cette chromatographie d'affinité on utilise de préférence comme support l'Affi-Gel 10 (Laboratoire BioRad, Richmond, Californie).

On a montré de façon surprenante que selon le procédé sandwich en phase solide selon l'invention, l'interféron de leucocyte humain est détectable jusqu'à une concentration de U/ml dans le sérum.

D'un autre côté, on a montré que l'on peut purifier l'interféron de leucocyte humain obtenu par la technologie de l'ADN recombinant avec un anticorps monoclonal selon l'invention de manière simple tel qu'il soit utilisable pour les essais cliniques.

Les exemples suivants précisent l'invention.

Exemple 1Préparation des anticorps monoclonauxA) Préparation d'interféron

L'interféron de leucocyte humain partiellement purifié
5 (IFL) est disponible en quantité suffisante pour l'immuni-
sation des souris. On utilise cinq préparations d'IFL:

a) IFL γ (a) principal pic de la fraction selon l'étape 8
du Tableau 3 de DOS n° 29 47 134 avec une pureté approchée
de 10-15% (estimée par électrophorèse sur gel de polyacryla-
10 mide-dodécylsulfate de sodium) et une activité spécifique dans
le test antiviral;

b) IFL α ; c) IFL β ; d) IFL γ ; et e) IFL δ .

Les fractions IFL α , β et γ consistent dans chaque cas en
mélanges des diverses espèces (α_1 , α_2), (β_1 , β_2 , β_3)
15 et (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , γ_5). Il s'agit de "fractions d'épau-
lement" de l'espèce purifiée correspondante, qui sont rassem-
blées à partir de différentes préparations (voir étape 9
du Tableau 3 de la DOS mentionnée ci-dessus). La fraction
IFL δ est l'épaulement de l'espèce δ . Outre les espèces α
20 β , et γ sur la colonne de Lichosorb-diol (voir étape 8
du Tableau 3 de la DOS mentionnée ci-dessus) on voit occasion-
nellement une fraction δ . On la purifie comme dans l'étape 9
selon la Tableau 3 de la DOS ci-dessus mentionnée, d'après
quoi il est évident que l'espèce δ ne présente pas de sous-
25 espèce et est uniforme. La pureté de b), c) et d) est comprise
entre 20 et 40% selon l'activité biologique spécifique et
selon l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécyl-
sulfate de sodium. La pureté de e) est au plus de 5%.

Détermination de l'activité d'interféron

30 On détermine l'activité d'interféron au moyen du test
d'"inhibition de l'effet cytopathique" (CPE) selon la
demande de brevet américain n° 4 241 174 (n° d'ordre 963 256).

B) Immunisation des souris

On immunise tout d'abord 3 souris femelles Balb c/J âgées de 8 semaines avec IFL γ (a) dans l'adjuvant complet de Freund. Chaque souris reçoit environ 150 μ g de protéine totale contenant 20-25 μ g d'interféron dans 0,25 ml à 5 positions différentes (0,05 ml dans chaque position): par voie sous-cutanée dans les régions iliaques gauche et droite et dans les régions axillaires gauche et droite ainsi que sous forme d'injection intrapéritonéale.

53 jours plus tard on procède à une seconde immunisation comme suit: on sépare l'IFL γ (a) d'interféron par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide (15%)-dodécylsulfate de sodium dans 3 gels cylindriques de 0,6 x 11 cm. On charge environ 300 μ g de protéine totale dans 0,3 ml (dialysé contre un tampon de dosage) contenant environ 40-50 μ g d'interféron. [Cette purification est effectuée essentiellement selon le procédé de Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685]. Après l'électrophorèse, on découpe les gels en disques de 2 mm d'épaisseur. On immerge ceux-ci pendant 10 minutes dans 0,5 ml de solution de chlorure de sodium tamponné au phosphate (tampon au phosphate de potassium 0,01 M, pH 7,3; chlorure de sodium 0,14 M) contenant 0,1% de Triton X-100 dans des tubes à essai en propylène. On recherche dans le tampon l'activité d'interféron dans une dilution en série selon le test d'inhibition CPE. Les disques 6 et 7 (numérotés à partir de l'extrémité inférieure de chaque gel) présentent l'activité d'interféron la plus élevée (dans chaque cas environ 25% de l'activité du gel total). Dans chaque cas on découpe finement un disque présentant l'activité la plus élevée avec une lame de rasoir sur une plaque de verre, on le transfère dans une seringue d'1 ml contenant 0,2 ml de chlorure de sodium 0,15 M et on l'injecte à chaque souris. On injecte la suspension de gel par voie intra-péritonéale, après quoi on injecte 0,2 ml de BCG (Bacille Calmette-Guérin; Serum Institut Berne).

Au bout de 12 jours, on recherche l'activité de neutralisation d'interféron dans le sérum de chaque souris. Le sérum de la souris n°3 présente une neutralisation à 50% de 10 unités par ml d'IFL γ (a) à une dilution de 1:72 000, mais ne neutralise pas la même concentration d'IFL brut (pureté inférieure à 0,1%) même à une dilution de 1:100. Les souris n°1 et n°2 présentent des titres de neutralisation de moins de 1:1000 contre IFL γ (a).

70 jours après la seconde immunisation, la souris n° 3 reçoit pendant 3 jours de suite une injection de rappel intrapéritonéale avec un mélange d'IFL α , β et γ contenant environ 50 μ g de l'interféron et 15 μ l de sérum de souris normale comme protéine support (dans 0,2 ml de chlorure de sodium 0,15 M). 48 heures après la dernière injection on sacrifie la souris et on prélève la rate pour la préparation des anticorps monoclonaux.

C) Cultures cellulaires et fusions cellulaires

On utilise les matières et les milieux suivants. On peut obtenir chez Gibco la modification d'Iscove du milieu Eagle modifié de Dulbecco (IMDMEM). On complète fraîchement avec du pyruvate de sodium (1 mM), de la glutamine (1,5 mM), du 2-mercapto-éthanol (5×10^{-5} M), de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (100 μ g/ml). Le milieu HAT complet se compose d'IMDMEM ainsi complété ainsi que d'hypoxanthine (10^{-4} M), d'aminoptérine (4×10^{-7} M), de thymidine ($1,5 \times 10^{-5}$ M) et de sérum de foetus de veau à 15%. On prépare une solution à 50% (p/v) de polyéthylène-glycol 4000 (PEG 4000, Merck) dans IMDMEM.

La fusion avec une lignée cellulaire de myélome résistante à l'azaguanine non productive est réalisée, avec de faibles modifications, selon le procédé de Stahl et coll. dans J. Immunol. Methods 32, 297-304. Dans cette fusion on fusionne 48×10^6 cellules de rate nucléées avec 25×10^6 cellules de myélome de la lignée FO (Fazekas de St. Groth et Scheidegger dans J. Immunol. Methods 35, 1-25 (1980). On

lave les cellules de rate et les cellules de myélome dans de l'IMDMEM dépourvu de sérum. On les remet alors en suspension dans le même milieu, on mélange dans le rapport mentionné ci-dessus pour la fusion et on sédimente dans 40 ml d'IMDMEM dépourvu de sérum dans un tube à essais en polypropylène conique de 50 ml à 200 g pendant 15 minutes, puis on élimine complètement par aspiration le surnageant. Au sédiment cellulaire on ajoute goutte à goutte en agitant constamment 0,5 ml de PEG 4000 à 50% afin de remettre en suspension et de disperser les cellules. Au bout d'environ 90 secondes, on ajoute goutte à goutte 10 ml d'IMDMEM dépourvu de sérum à la température ambiante en agitant constamment pendant 4 à 5 minutes. Après avoir attendu encore 15 minutes sans agiter, on sépare de gros amas cellulaires en prélevant avec soin avec une pipette de 10 ml. On dilue le mélange de fusion à 250 ml avec du milieu HAT complet puis on le dispose dans des réservoirs "Costar cluster wells" (1 ml/réservoir), qui contiennent déjà 1 ml de milieu HAT complet et 10^5 cellules péritonéales de souris comme couche nutritive. On fait incuber les cultures dans une atmosphère à 5% de CO_2 /95% d'air à 85% d'humidité. On alimente les cultures deux fois par semaine en remplaçant la moitié du milieu (1 ml) par du milieu HAT frais.

25 D) Détection des hybridomes spécifiques d'interféron par un test de liaison phase solide-anticorps (SABA)

Ce procédé est adapté d'après le principe décrit dans Catt et Tregear [Science 158, 1570-1572 (1967)] et convient pour la détection des anticorps d'hybridome (voir également Stähli et coll. dans J. Immunol. Methods 32, 297-304 (1980) ainsi que Kennet, R.H. dans Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 81, p 77-91 (1978). Les préparations d'interféron d'IFL α , β , γ et δ sont diluées individuellement dans des tubes à essais en polypropylène avec une solu-

tion de chlorure de sodium tamponnée au phosphate (STP) à une concentration finale d'environ 0,2 à 0,5 μ g d'interféron/ml (environ 1-3 μ g de protéine totale par ml; sauf pour IFL δ où l'on a environ 10-15 μ g de protéine totale par ml), pour en revêtir des plaques de microtitrage en chlorure de polyvinyle (Cooke Laboratory Products Division, Dynatech Laboratories, Inc.) comme dans le cas de Stähli et coll. loc. cit. On dispose 50 μ l de la solution d'interféron dans chaque réservoir et on laisse reposer pendant au moins 4 h à la température ambiante dans une chambre humide ou on maintient à (sic) 4°C pendant plusieurs semaines. Avant l'emploi on remplit les réservoirs avec de la sérum-albumine de boeuf (SAB) à 3% dans le STP et on laisse reposer pendant 30 à 60 minutes afin de bloquer toutes les positions de liaison protéiques. On lave alors les plaques 4 fois avec du STP. On fait incuber 50 μ l de surnageant des cultures d'hybridome dans à chaque fois 2 réservoirs pendant au moins 4 h à la température ambiante. On procède à des expériences témoin (liaison non spécifique) sur des plaques qui ne sont revêtues que de SAB à 3%. Après avoir lavé 4 fois avec du STP, on ajoute à chaque réservoir 50 μ l d'anticorps Ig anti-souris de mouton (purifié par chromatographie d'affinité et marqué avec 125 I; 50 000 à 100 000 cpm pour 20 à 30 ng d'anticorps dans STP contenant SAB à 1%) et on fait incuber à la température ambiante pendant au moins 4 h. On lave les plaques 4 à 5 fois avec du STP puis on répartit entre les divers réservoirs, dont on mesure alors la radio-activité dans un spectromètre à scintillation gamma.

E) Résultats

30 a) Tri initial par liaison anticorps (SABA) contre des fractions d'IFL partiellement purifiées

152 des 240 cultures présentent une croissance des

hybridomes. On recherche dans les surnageants les anticorps spécifiques de l'interféron dans le test SABA, lorsque les cultures sont confluentes à environ 20-30% (12-29 jours après la fusion). On teste parallèlement la liaison anticorps avec IFL α , IFL β , IFL γ et IFL δ . Sur les 152 cultures, 13 surnageants présentent une liaison anticorps élevée contre toutes les quatre préparations d'interféron partiellement purifiées. Le milieu de 4 autres hybridomes présente une activité de liaison plus faible (3 à 4 fois plus forte que la liaison non-spécifique) contre toutes les quatre préparations d'interféron. On jette ces cultures. Les milieux de tous les autres hybridomes (135 cultures en croissance) donnent des liaisons non spécifiques contre toutes les quatre préparations d'IFL. Sur les 13 hybridomes spécifiques, 9 sont caractérisés comme représentatifs de l'invention. Leur désignation est LI-1, LI-2, LI-3, LI-5, LI-6, LI-7, LI-8, LI-9 et LI-12.

Comme il est clair d'après la figure 1, la liaison anticorps des 9 hybridomes spécifiques présente un comportement différent envers les 4 préparations d'interféron partiellement purifiées. LI-1, LI-2, LI-3, LI-5, LI-6, LI-7 et LI-8 présentent une caractérisation identique avec la séquence de liaison suivante: IFL α < IFL δ < IFL γ < IFL β . Pour LI-9 l'ordre de liaison est IFL δ < IFL γ < IFL β . LI-12 est différent de tous les autres.

b) Liaison anticorps (SABA) contre l'interféron de leucocyte hautement purifié

On immobilise six espèces d'interféron purifiées (pures à $\geq 80\%$) (cf étape 9 du tableau 3 de la DOS 29 47 134) par adsorption sur des plaques de microtitrage en chlorure de polyvinyle. Dans ce cas il s'agit d'IFL α_1 , α_2 , β_2 , γ_2 et γ_3 ainsi que d'IFL-K de la lignée cellulaire

KG-1 [Koeffler, H.P. et coll. Science 200, 1153-1154 (1978)], qui est purifié par analogie avec les étapes 1 à 9 du tableau 3 de la DOS mentionnée. Comme on n'observe aucune séparation claire entre les différentes espèces dans les étapes 8 et 9, on rassemble la principale fraction avec l'activité d'interféron. Elle représente donc un mélange de différentes espèces. L'adsorption de l'interféron (50 μ l par dépression) s'effectue pendant la nuit avec environ 0,5 μ g d'interféron et 2 μ g de SAB par ml de STP puis par un blocage des positions de liaison protéique avec du STP à 3% comme il est dit ci-dessus.

La figure 2 montre l'anticorps qui se lie avec le milieu de culture des 9 hybridomes spécifiques contre les 6 interférons différents purifiés. On peut encore différencier divers groupes d'anticorps avec différents comportements de liaison caractéristiques. Le groupe 1 comprend les anticorps LI-1 et LI-2, qui ont des caractéristiques de liaison identiques, mais qui ne reconnaissent pas IFL γ_3 . Le groupe 2 comprend les anticorps LI-3, LI-5, LI-6, LI-7 et LI-8 avec une différenciation possible de deux sous-groupes. Le sous-groupe 2a (LI-3, LI-5 et LI-6) présente une liaison globale plus forte (figure 1 et figure 2) que le sous-groupe 2b (LI-7 et LI-8), grâce à quoi ce dernier sous-groupe se lie relativement plus fortement à l'IFL α_1 purifié et à l'IFL-K purifié que le premier. Selon le comportement de liaison à l'interféron des anticorps restants selon la figure 2 et la figure 3, LI-9 possède la plupart des caractéristiques du sous-groupe 2b. LI-12 apparaît à son tour comme unique.

Si l'on considère le fait de la forte liaison anticorps à différents interférons purifiés, il est très peu probable que l'un quelconque de ces anticorps ne soit pas dirigé contre l'interféron, mais contre des contaminants. Ceci est également indiqué pour la plupart de ces anticorps

par la capacité de neutraliser l'activité biologique de l'interféron. LI-1, LI-2, LI-3, LI-5, LI-6, LI-7, LI-8 et LI-9 annulent l'inhibition de la CPE virale sur les cellules MDBK induites par l'interféron. On teste la neutralisation de l'interféron avec de l'IFL (a) partiellement purifié et/ou de l'IFL-K, IFL γ_1 , IFL α_2 purifié et de l'interféron de leucocyte brut. Aucun des anticorps n'est en position de neutraliser l'interféron de leucocyte brut. LI-12 ne neutralise aucun des interférons testés (voir tableau 1 à ce propos).

2) Isotypes des chaînes lourdes et légères des anticorps d'interférons monoclonaux

Les anticorps monoclonaux du milieu de culture d'hybridome sont tout d'abord liés à des plaques de microtitrage revêtues d'interféron comme il est dit ci-dessus pour le test SABA. Après lavage, on les fait incuber avec de l'antisérum Ig anti-souris de lapin spécifique d'un isotype (Nordic). Pour la détection on utilise de l'IgG anti-lapin de chèvre, que l'on marque avec de la peroxydase de moringa. Comme substrat enzymatique, on utilise du 2,2'-azino-di-(3-éthyl-benzothiazoline-sulfate) et du peroxyde d'hydrogène. Les résultats sont rassemblés au tableau 1, seconde colonne. Sept des anticorps testés ont les chaînes immunoglobuliniques γ_1/k , une a γ_{2b}/k et une a μ/k . Tous les sept anticorps γ_1/k ainsi que le γ_{2b}/k neutralisent l'interféron, tandis que le μ/k ne neutralise pas l'interféron, comme il est de même évident d'après le tableau 1.

L'aptitude des anticorps selon l'invention à se lier avec une affinité élevée aux interférons obtenus par la technologie de l'ADN recombinant est évidente d'après le tableau 6.

3) Clonage et stabilisation des hybridomes spécifiques d'interférons

Pour la préparation de lignées d'hybridome stables, on clone tous les 9 hybridomes spécifiques en limitant la dilution dans des plaques de microtitrage avec des cellules péritonéales de souris comme couche nutritive [Hengartner H. et coll. in Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 81, 92-99 (1978)]. On commence le clonage au moment du transfert des cultures d'origine dans des flacons ou peu après. On teste les clones contre IFL β avec le test SABA. Les résultats de ce premier clonage des 9 hybridomes sont donnés au tableau 2.

A partir de chaque hybridome on cultive de façon intensive deux à quatre clones fortement positifs et on ne se contente pas de les injecter i.p. à des souris pour la production d'ascite, mais on les congèle également. Dans la plupart des cas on rassemble les clones choisis d'un hybridome pour simplifier et réduire le travail. A partir de tous les 9 hybridomes on obtient du liquide d'ascite pour la production d'anticorps sur une grande échelle. Les cellules d'ascite sont de même transférées dans des cultures et congelées.

4) Groupement des anticorps selon leurs interactions avec ILH

Le principal groupe des sept hybridomes, qui produit de l'immunoglobuline γ_1/k , peut être divisé en deux groupes sur la base de leur interaction d'anticorps avec les interférons purifiés. Le premier groupe (LI-1 et LI-2) ne reconnaît pas l'IFL γ_3 purifié, tandis que le second groupe (LI-3 et LI-5 à LI-8) reconnaît IFL γ_3 . La liaison quantitative relative des anticorps monoclonaux à six interférons purifiés différents (voir figure 2) et la différence entre

anticorps neutralisants et non neutralisants donnent une information pour la différenciation de différents épitopes (déterminants antigéniques) d'ILH et pour la démonstration de différences de structure entre différents interférons purifiés. D'après le comportement de liaison des anticorps (voir figure 2) il est clair que LI-1 et LI-2 reconnaissent une structure différente de tous les autres anticorps et que IFL γ_3 est structuralement différent de tous les autres interférons testés, car il ne présente pas l'épitope reconnu par LI-1 et LI-2. LI-12, anticorps non neutralisant, reconnaît avec à peu près la même affinité, bien que peut-être plus faible, un déterminant moins variable qui est présent chez tous les interférons testés. Les résultats quant à la liaison anticorps et quant à la neutralisation d'interféron indiquent qu'au moins trois épitopes différents d'ILH peuvent être reconnus et définis par la collection des anticorps monoclonaux.

Exemple 2

Détermination de l'interféron

20 1) Sélection d'une paire appropriée d'anticorps monoclonaux

Pour la différenciation entre la liaison spécifique de deux anticorps au même épitope et la liaison additive à divers épitopes, on teste la liaison des anticorps seuls et par paires et dans toutes les combinaisons possibles à l'interféron immobilisé. On utilise des surnageants de cultures d'hybridome confluentes sans autre purification comme source d'anticorps. On ajoute de l'interféron de leucocyte partiellement purifié (IFL β pur à 20-30%) en quantités définies (0,1 à 0,2 μg d'interféron/ml) à des plaques de microtitrage en chlorure de polyvinyle comme il est dit dans l'exemple 1 pour le SABA. Le blocage de toutes les positions de liaison protéique avec du SAB à 3% suit. On fait

incuber à la température ambiante pendant 7 h 50 μ l de solution d'anticorps composée dans chaque cas de 25 μ l de deux surnageants de culture ou de 2 x 25 μ l du même anticorps. On lave les plaques avec du STP (phosphate de potassium 0,01 M, pH 7,3; chlorure de sodium 0,14 M) et on fait incuber pendant 5 h avec un excès d'immunoglobuline Ig anti-souris de mouton marqué avec 125 I dans un volume de 50 μ l par réservoir afin de mesurer la quantité d'anticorps monoclonaux qui sont liés à l'interféron (Tableau 3). La liaison de deux anticorps est considérée comme additive lorsque la liaison de ces anticorps excède celle qui se produit avec 50 μ l de l'anticorps individuel à liaison la plus forte. Sur la base de ce critère on trouve que LI-1 se lie de façon additive avec presque tous les autres anticorps et que LI-9 donne la meilleure liaison additive avec LI-1.

On purifie LI-1 et LI-9 provenant du liquide d'ascite selon des procédés classiques, c'est-à-dire par précipitation au sulfate de sodium (saturation à 50%) et chromatographie sur DEAE-cellulose, jusqu'à au moins 90%, comme on l'évalue par électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide. On marque 20 μ g de chaque anticorps avec 125 I selon le procédé de la chloramine-T à une activité spécifique d'environ 20 μ Ci/ μ g. On sépare l'iode libre de l'anticorps marqué par filtration sur gel sur Sephadex G-25 en présence de STP et de SAB à 1%.

On adsorbe pendant la nuit des anticorps non marqués LI-1 et LI-9 à environ 20 μ g par ml de STP sur des plaques de microtitrage en PVC (Cooke Laboratory, Products Division, Dynatech Laboratories, Inc.) (100 μ l/dépression). Pendant 30 à 60 minutes on bloque toutes les positions de liaison protéique avec du SAB à 3% dans STP. On fait incuber de l'interféron de leucocyte purifié de la lignée cellulaire myéloïde KG-1 à une concentration de 10 unités/100 μ l de STP et du SAB à 1% avec un des anticorps marqué avec

^{125}I ($1,3 \times 10^5$ cpm) dans des réservoirs revêtus d'anticorps. Des réservoirs témoin contiennent de l'anticorps marqué, mais pas d'interféron. Après incubation pendant 3 h à la température ambiante, on retire le liquide et on lave
5 4 fois les réservoirs des plaques avec du STP puis on en détermine la radioactivité dans un spectromètre à scintillation gamma. Les résultats sont donnés au Tableau 4. La combinaison de LI-1 avec LI-9 donne une liaison anticorps du type sandwich dépendant de l'interféron. La meilleure combinaison
10 est LI-9 avec LI-1 marqué en solution. Pour cette raison les autres expériences ont été effectuées avec Li-9 immobilisé et Li-1 marqué.

a) Procédé d'incubation en une étape

On revêt chaque réservoir d'une plaque de microtitrage
15 en PVC avec 100 μl de Li-9 (15 $\mu\text{g/ml}$ dans STP) à la température ambiante pendant la nuit ou à 4°C pendant des jours ou des semaines dans une chambre humide. Avant l'emploi on retire la solution de LI-9 et on remplit les réservoirs avec du SAB à 3% pendant 30 à 60 minutes puis on lave 4 fois
20 avec du STP. On ajoute à chaque réservoir environ 140 000 cpm de LI-1 marqué à ^{125}I (environ 4 ng, activité spécifique environ 20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) dans 0,1 ml de STP contenant du SAB à 1% et 100 à 150 μg d'IgG humaine par ml. On ajoute au réservoir des solutions d'interféron diluées de façon corres-
25 pondante (1-20 μl) et on mélange en agitant brièvement. Au bout de 2 à 3 heures d'incubation à la température ambiante, on verse la liqueur sur du papier d'absorption. On lave la plaque 4 à 5 fois avec du STP et on mesure la radioactivité des différents réservoirs dans un spectromètre à scintillation gamma. Dans le cas de concentrations élevées d'in-
30 terféron (supérieures à environ 5000-6000 U/ml) une inhibition partielle se produit. Les résultats obtenus sont reproduits dans la figure 3 et le Tableau 5.

b) Procédé d'incubation à deux étapes

On prépare des plaques de microtitrage en PVC revêtues de LI-9 et saturées avec SAB comme il est dit ci-dessus. On fait incuber à la température ambiante pendant 30 minutes

5 50 μ l par réservoir d'une solution d'interféron dans le STP contenant du SAB à 1% , puis on lave les plaques 4 fois avec du STP. On ajoute alors à chaque réservoir 50 μ l de 125 I LI-1 (environ 150 000 cpm/4 ng) PBS contenant du SAB à 1% et 150 μ g d'IgG humaine par ml, puis on maintient les

10 plaques à la température ambiante pendant 2 h et on lave 4 fois avec du STP et on mesure la radioactivité comme il est dit ci-dessus. Les résultats obtenus sont reproduits dans la figure 4. Par opposition avec le procédé en une étape, on n'observe pas d'inhibition partielle à une concentration élevée d'interféron.

15

c) Détermination de l'interféron inactivé antiviral

Inactivation thermique de l'interféron.

On dilue une solution d'interféron A (Goeddel et coll., Nature vol. 290, mars 1981) dans le milieu essentiel minimum d'Eagle contenant 10% de sérum de fœtus de veau au 1:480 dans du sel physiologique tamponné au phosphate (NaCl 0,14 M, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, KCl 3 mM, CaCl_2 0,9 mM, MgCl_2 0,5 mM) contenant 1 mg/ml de sérumbumine de boeuf. La

20

25 solution diluée contient l'interféron A à une concentration de 5 ng/ml. Après avoir chauffé à 65°C pendant les durées notées, on dispose des échantillons de 0,14 ml dans un bain glacé jusqu'à ce qu'on les dose. Les dosages antiviraux et immunologiques sont effectués le même jour. Sur chaque échantillon de 0,14 ml, on utilise 0,10 ml pour le radio-immunodosage et 10 μ l pour le dosage antiviral en double.

30

On procède au radio-immunodosage selon le procédé d'incubation en deux étapes mentionné en b). La détermination de l'activité

antivirale s'effectue selon le test d'inhibition CPE. Les résultats sont donnés dans la figure 6. D'après cet exemple on peut inférer que la paire d'anticorps LI-1/LI-9 peut distinguer entre l'interféron actif contre les virus et l'interféron inactif contre les virus. D'après la figure 6 il est en outre évident que l'activité antivirale et l'activité immunitaire décroissent simultanément.

d) Détermination très sensible de l'interféron dans le plasma ou le sérum humain (procédé radioimmunologique)

On procède à une seule incubation de 0,1 ml de plasma ou de sérum humain à 40% (pH neutre) contenant environ 250 000 cpm (1,5 ng) de ^{125}I LI-1 (activité spécifique 100 à 110 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de Li-1) à la température ambiante pendant 14 à 16 h dans des plaques de microtitrage en PVC, qui sont revêtues de LI-9 comme il est dit ci-dessus. Après avoir lavé 4 fois avec du STP, on numérote les réservoirs comme il est dit ci-dessus. On procède à une expérience avec l'interféron, que l'on ajoute à du plasma au citrate d'un volontaire en bonne santé. Chaque volume de 0,1 ml de mélange expérimental de STP contient 40 μl de plasma, 1,3 ng de ^{125}I LI-1 (256 000 cpm) et différentes quantités d'interféron de leucocyte humain brut (pur à environ 0,1%) à partir de cellules de leucémie myéloïde chronique. Les résultats sont reproduits dans la figure 5, où la quantité d'interféron est notée en abcisse. Le milieu d'incubation selon l'étape 1 du Tableau 3 de la DOS n° 29 47 134 est utilisé comme interféron de leucocyte brut.

Exemple 3Détermination très sensible de l'interféron dans le sérum des malades (procédé immuno-enzymatique)

Dans le nombre correspondant de tubes à essais (10 x 75 mm) on introduit dans chaque cas avec une pipette 0,05 ml de solution expérimentale (0,1 mole/litre de phosphate de sodium, pH 6,5 avec 10 g/litre de SAB et 0,5 µg/ml de conjugué LI-1 monoclonal anti-interféron-peroxydase dans du sérum humain dépourvu d'interféron), 0,2 ml de plasma du malade à analyser ou du standard d'interféron (0 U/ml, 12,5 U/ml, 25 U/ml et 50 U/ml d'interféron) et du sérum témoin d'interféron (p. ex. 30 U/ml d'interféron) y sont mélangés, dans chaque cas on ajoute une perle de polystyrène (Ø = 6,5 mm) revêtue d'anti-interféron LI-9 monoclonal et que l'on fait incuber à la température ambiante (18-20°C) pendant 16 heures. Ensuite, on lave la perle de polystyrène 3 fois avec à chaque fois 2 à 5 ml d'eau distillée, on la transfère dans à chaque fois 0,5 ml de tampon substrat pour la détermination de l'activité de la peroxydase (0,1 mole/litre de tampon au citrate de potassium à pH 5,0 avec 6 mmoles/litre de H₂O₂ et 20 mmoles/litre de o-phénylène-diamine) et on fait incuber à la température ambiante (18-26°C) pendant 30 minutes. Afin d'arrêter l'activité peroxydante ainsi que pour intensifier l'absorption de lumière, on mélange 0,5 ml de HCl 4 N et pendant 30 minutes on mesure l'extinction par photométrie à une longueur d'onde de 492 nm. Le Tableau présente les valeurs d'une détermination d'interféron comparées avec les valeurs qui ont été obtenues avec le standard d'interféron. On utilise comme standard d'interféron l'interféron de leucocyte brut (milieu d'incubation selon l'étape 1 du Tableau 3 de la DOS 29 47 134).

Table au

Matière échantillon	$\Delta E_{492 \text{ nm/RT/30 min.}}$
Standard d'interféron	
0 U/ml d'interféron	0,065 / 0,070
12,5 U/ml "	0,245 / 0,235
25 U/ml "	0,425 / 0,430
50 U/ml "	0,775 / 0,790
Sérum témoin (30 U/ml d'interféron)	0,505 / 0,490
Plasma du malade	
No 8327	0 U/ml d'interféron
No 8328	0 U/ml d'interféron
No 8336	9 U/ml ^{d'} interféron
No 8338	0 U/ml d'interféron
No 8339	5 U/ml d'interféron
No 8363	0 U/ml d'interféron
No 8341	2 U/ml d'interféron
No 8344	16 U/ml d'interféron

Exemple 4

Purification de l'interféron de leucocyte obtenu par la technologie de l'ADN recombinant (Interféron A, cf Goeddel et coll., Nature vol. 20, mars 1981).

5 a) Pré-purification de l'interféron de leucocyte humain obtenu par la technologie de l'ADN recombinant

Toutes les étapes s'effectuent à 4°C. On fait éclater des cellules bactériennes congelées (1 kg) en les désintégrant par pression. On traite l'extrait selon le procédé classique, c'est-à-dire par précipitation à la polyéthylèneimine (polymine P) et au sulfate d'ammonium, suivie par une dialyse du précipité de sulfate d'ammonium à 65% contre Tris HCl 25 mM, pH 7,8; thiodiglycol 0,01%; Triton X-100 0,1%; fluorure de phényle 10 µM. Une centrifugation suit pour retirer les constituants insolubles.

b) Préparation de l'immunoadsorbant

Par analogie avec l'exemple 2, on dialyse une solution d'anticorps purifiée contenant LI-8 à la température ambiante contre un tampon carbonate de sodium 0,2 M/chlorure de sodium 0,3 M. On centrifuge la solution dialysée à 20 000 g pendant 15 minutes afin de retirer la matière insoluble. On ajuste la concentration protéique à environ 25 mg/ml avec le tampon mentionné ci-dessus. On lave 3 fois l'Affi-gel 10 (Laboratoires BioRad, Richmond, Californie) avec de l'isopropanol glacé sur un filtre en verre fritté puis on lave 3 fois avec de l'eau distillée glacée. On transfère le gel dans des tubes à essais en plastique et on sédimente par une brève centrifugation. On aspire le surnageant. On mélange le gel avec un volume égal de solution d'anticorps purifiée et on renverse à 4°C pendant 5 h. Après la réaction, on centrifuge le gel puis on le lave 2 fois avec un tampon

(NaHCO_3 0,1 M/ NaCl 0,15 M) afin de retirer l'anticorps non lié. La détermination protéique de l'eau de lavage combinée montre qu'environ 24 mg d'anticorps sont liés par ml de gel.

5 c) Purification par chromatographie d'affinité de l'interféron de leucocyte prépurifié obtenu par la technologie de l'ADN recombinant

On introduit la solution obtenue dans l'étape a) (700 ml contenant 37 g de protéine) à raison de 50 ml/h sur la colonne immuno-absorbante (2,5 x 3,5 cm; 17 ml de volume de lit contenant environ 400 mg d'anticorps monoclonal purifié Li-8) 10 équilibrée avec STP. On lave la colonne avec 20 volumes de colonne de tampon (NaCl 0,5 M; Tris.HCl 0,02 M, pH 7, 5; Triton X-100 0,2%) , puis on lave la colonne avec 5 volumes de colonne de NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% puis on élue avec 15 de l'acide acétique 0,2 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% (pH 2,5). On élue l'activité d'interféron dans environ 30 ml à une concentration moyenne d'environ 1 mg de protéine par ml. On ajuste cette solution à pH 4,5 avec une base Tris 1 M et on dilue 4 fois avec de l'eau. On introduit l'échantillon 20 dans une colonne de carboxyméthylcellulose (CM 52 Whatman) (1,3 x 3 cm), que l'on équilibre avec de l'acétate d'ammonium 0,1 M (pH 5,0). On lave la colonne avec 20 ml d'acétate d'ammonium 0,1 M (pH 5,0) et on élue l'interféron avec 20 ml d'acétate d'ammonium 0,5 M (pH 5,0). Le résultat de la purification 25 est reproduit au Tableau 7.

On peut purifier l'interféron A de manière analogue et avec un rendement comparable avec les anticorps Li-3, LI-5, LI-6, LI-7 et LI-9.

Tableau 1

Epitope	Anticorps Monoclonal	Isotypes	Chain ^{es}	Neutralisation
I	LI-1	↑ IgG ↓	γ_1/k	oui
	LI-2		γ_1/k	oui
	LI-3		γ_1/k	oui
II	LI-5		γ_1/k	oui
	LI-6		γ_1/k	oui
	LI-7		γ_1/k	oui
	LI-8		γ_1/k	oui
	LI-9		γ_{2b}/k	oui
	LI-12		IgM	μ/k

Table 2

Culture	Cellules pour 96 "réservoirs"	Clones testés ou "réservoirs"	Nombre positifs	Nombre négatifs
LI-1	100	6	6	0
LI-2	100	11	6	5
LI-3	100	7	7	0
LI-5	100	13	13	0
LI-6	100	12	12	0
LI-7	100	10	8	2
LI-8	100	9	8	1
LI-9	100	10	8	2
LI-12	100	4	0	4
LI-12	300	48	6	42

Tableau 4

<u>Combinaison d'anticorps</u>		Liaison anticorps marquée à ¹²⁵ I		<u>(cpm)</u>
Anticorps en phase solide	Anticorps marqué à ¹²⁵ I	avec Interféron (10 ⁶ U)	sans Interféron	liaison spécifique
LI-1	LI-9	922	440	482
LI-9	LI-1	2465	251	2208

Tableau 5

Espèce d' Interféron	Unités d' Interféron par détermination	liaison CPM [125 I] LI-1
α_1	100	2 202
α_2	100	1 633
β_1	100	822
β_2	100	8 135
β_3	100	70
γ_1	100	7 036
γ_2	100	4 804
γ_3	100	101
γ_4	100	198
γ_5	100	121
δ	100	5 498

Tableau 6Anticorps

<u>Interféron</u>	LI-1	LI-3	LI-5	LI-6	LI-7	LI-8	LI-9
A	+	+	+	+	+	+	+
B	+	-	-	-	-	-	-
D	-	+	+	+	+	+	+
F	-	-	-	-	+	-	-

Légende:

Les interférons désignés par A-F sont ceux qui sont obtenus par la technologie de l'ADN recombinant et décrits dans la publication de David. V. Goeddel et coll. dans Nature vol. 290, mars 1981. Un + signifie qu'un interféron donné est complètement absorbé, un \pm partiellement absorbé et un - non absorbé par les colonnes chargées avec l'anticorps respectif.

Tableau 7

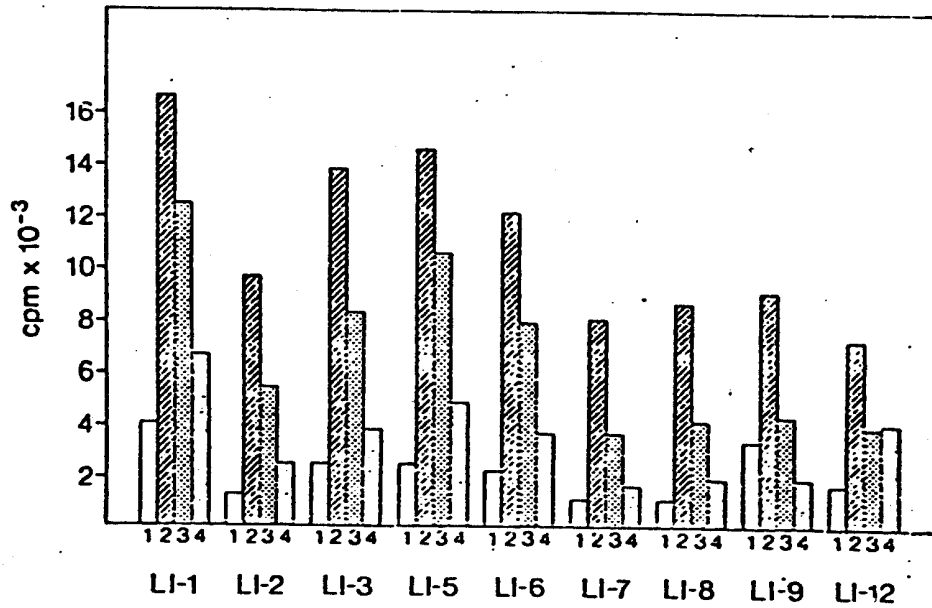
Etape	Volume (ml)	Protéine totale (mg)	Activité totale (unités)	Activité Spécifique (unités/mg)	Facteur de Purification	Rendement (%)
Précipitation de sulfate d'ammonium	700	37 100	$7,4 \times 10^9$	2×10^5	1,0	100
Lol de la colonne d'anticorps	30	30	7×10^9	$2,3 \times 10^8$	1150	95
CM-52	20	20	6×10^9	3×10^8	1500	81

On détermine l'activité spécifique selon le procédé d'inhibition CPE mentionné ci-dessus. Selon l'électrophorèse sur gel dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide l'interféron après l'étape d'immunoabsorption est pur à plus de 90%. Selon la colonne CM-52 il apparaît pratiquement homogène.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Collection d'anticorps monoclonaux, caractérisée en ce que ses éléments sont dirigés contre l'interféron de leucocyte humain (ILH) naturel ou obtenu par la technologie de l'ADN recombinant.
2. Collection selon la revendication 1, caractérisée en ce que les anticorps monoclonaux sont sécrétés par différents hybridomes.
- 10 3. Collection selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'elle consiste en groupes d'anticorps, qui diffèrent l'un de l'autre dans leurs isotypes.
4. Collection selon la revendication 2, caractérisée en ce que 8 anticorps sont d'isotype IgG et un anticorps est d'isotype IgM.
- 15 5. Collection selon la revendication 3, caractérisée en ce que sur les 8 anticorps de type IgG 7 ont une chaîne lourde γ_1 et une chaîne lourde γ_{2b} .
- 20 6. Collection selon la revendication 1, caractérisée en ce que les divers anticorps monoclonaux ne sont pas mutuellement inhibants, c'est-à-dire se lient ensemble à l'ILH, tandis que d'autres sont mutuellement inhibants, c'est-à-dire ne se lient pas ensemble à l'ILH.
- 25 7. Collection selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle consiste en groupes d'anticorps, dont les éléments reconnaissent différents épitopes (déterminants antigéniques d'ILH).

8. Collection selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'au moins un anticorps de la collection ne reconnaît pas ILH γ_3 .
- 5 9. Collection selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'un anticorps (IGM) ne neutralise pas l'activité antivirale d'ILH.
10. Application d'un élément de différents groupes d'anticorps selon la revendication 7 pour un test sandwich en phase solide pour ILH.
- 10 11. Application selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'anticorps non immobilisé est marqué par radioactivité ou avec une enzyme.
- 15 12. Application d'un anticorps selon la revendication 1 à la purification d'ILH naturel ou obtenu par la technologie de l'ADN recombinant.
- 20 13. Procédé de purification de l'ILH naturel ou de l'ILH obtenu par la technologie de l'ADN recombinant, caractérisé en ce qu'on purifie une matière première contenant ILH par chromatographie d'affinité en utilisant un anticorps monoclonal de la collection selon l'une quelconque des revendications 1-9.

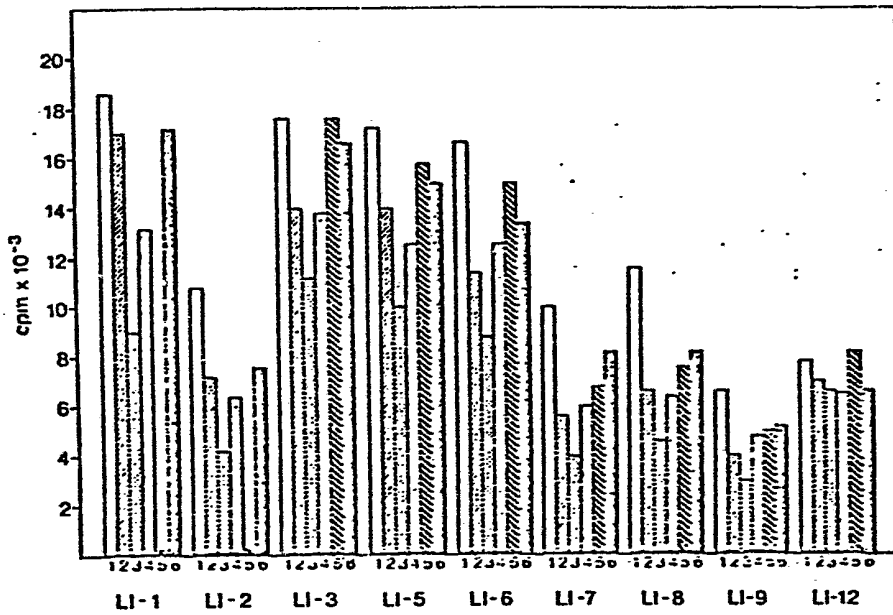


1 = IFL α
 2 = IFL β
 3 = IFL γ
 4 = IFL δ

cpm = liaison spécifique parttest

(après déduction de 300-400 cpm de liaison non-spécifique contre SAB ; LI-12 liaison non-spécifique environ 1200 cpm)

Figure 1



1 = IFL α_1

4 = IFL γ_2

2 = IFL α_2

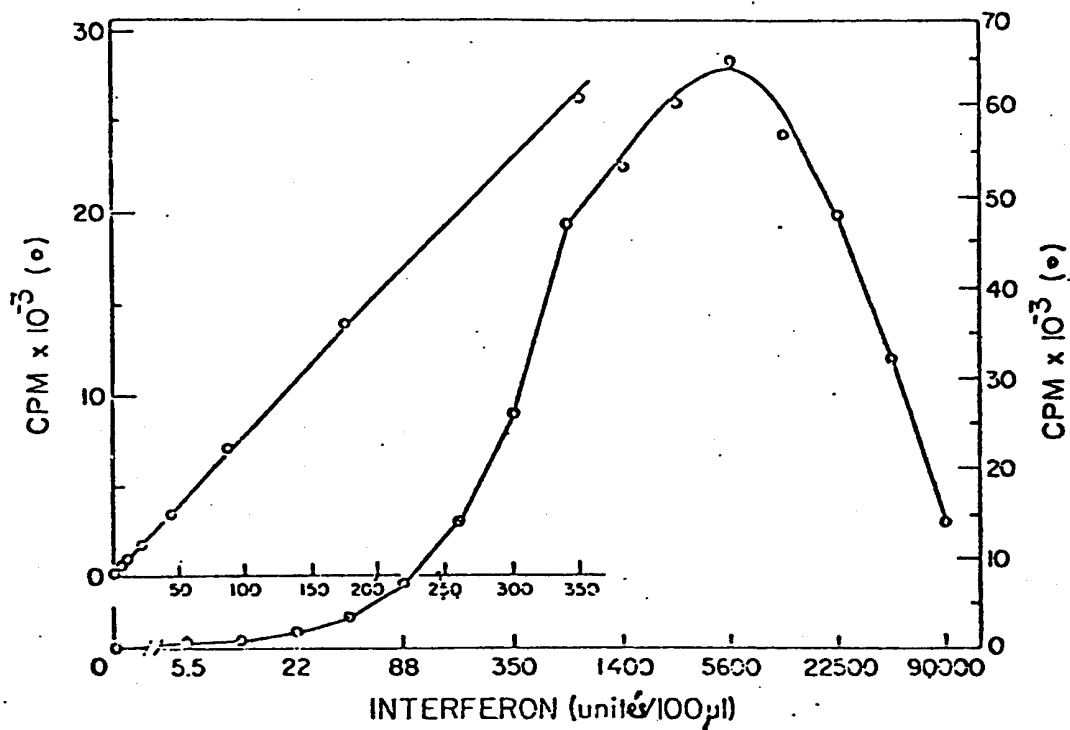
5 = IFL γ_3

3 = IFL β_2

6 = IFL K

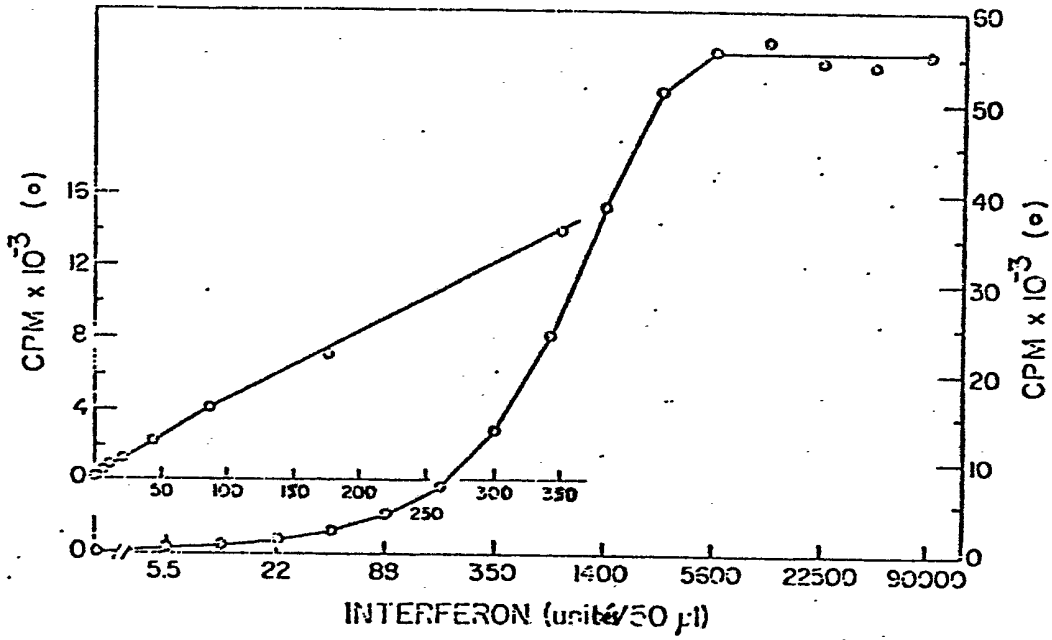
cpm (cf Figure 1)

Figure 2



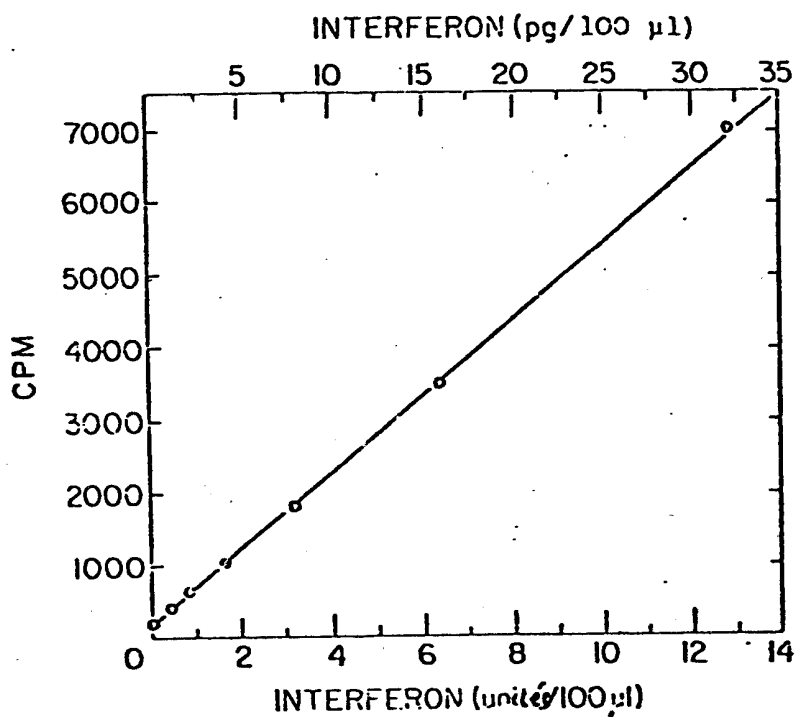
cpm: ¹²⁵I-LI-1 lié par test; la concentration d'interféron (abscisse) est en coordonnées logarithmiques pour la courbe principale (●—●) et en coordonnées linéaires pour la courbe (●—●) insérée à gauche

Figure 3



cpm: cf Figure 3

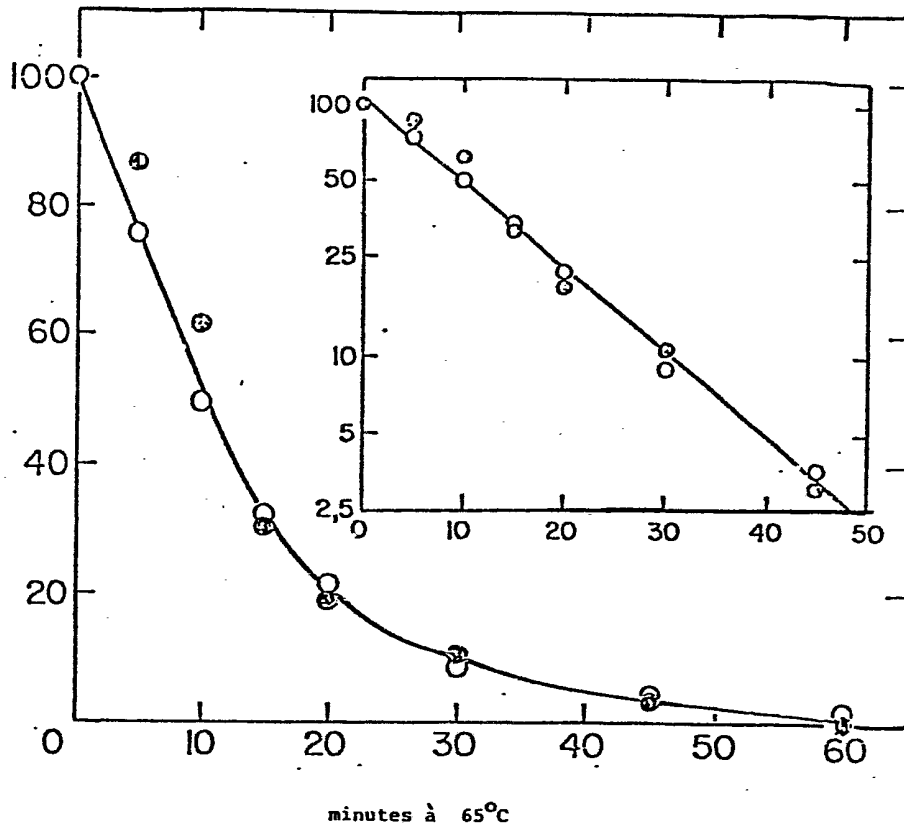
Figure 4



cpm: cf Figure 3, courbe insérée

Figure 5

Figure 6



légende ○ = radio-immuno-dosage

● = test d'inhibition CPE