

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 22876

(54) Hybride cellulaire produisant un anticorps spécifique de l'interféron leucocytaire humain et procédé de formation d'hybrides cellulaires producteurs d'anticorps spécifiques de l'interféron humain.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 N 15/00.

(22) Date de dépôt..... 24 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 17 du 30-4-1982.

(71) Déposant : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et INSTITUT PASTEUR,
établissements publics, résidant en France.

(72) Invention de : Luc Montagnier, Anne-Gabrielle Laurent et Jacqueline Gruest.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

- 1 -

HYBRIDE CELLULAIRE PRODUISANT UN ANTICORPS SPECIFIQUE DE
L'INTERFERON LEUCOCYTAIRE HUMAIN ET PROCEDE DE FORMATION
D'HYBRIDES CELLULAIRES PRODUCTEURS D'ANTICORPS SPECIFIQUES
DE L'INTERFERON HUMAIN

La présente invention concerne un hybride cellu-
laire produisant un anticorps spécifique de l'interféron
leucocytaire humain, ainsi qu'un procédé de production
d'hybrides cellulaires permettant la production d'anti-
5 corps spécifiques de l'interféron, plus particulièrement
d'interféron leucocytaire humain, par culture de ces hy-
brides cellulaires *in vitro* et *in vivo*.

La production d'un tel anticorps est particu-
lièrement importante pour la purification de l'interféron
10 utilisé en thérapeutique et son dosage en pharmacologie
expérimentale et clinique.

Des anticorps monoclonaux ont déjà été obtenus
en utilisant la méthode des hybridomes de Köhler et
Milstein (Nature, vol. 256, 7 août 1975) contre de nom-
15 breux déterminants antigéniques, cellulaires et viraux.
Cependant cette technique est d'une mise en oeuvre diffi-
cile dès lors qu'il s'agit de produire des anticorps
contre l'interféron humain. En effet, il est particuliè-
rement difficile d'en obtenir car les quantités d'inter-
20 féron dont on dispose sont infimes et les préparations
d'interféron utilisées pour immuniser les animaux (souris
ou rats) sont très impures et contiennent peu d'interféron
(entre 0,1 et 1 %). Par conséquent, les chances d'obtenir
des hybrides cellulaires résultant de la fusion d'un lym-
25 phocyte sécréteur d'immunoglobulines anti-interféron
avec les cellules de myélome sont très faibles. On rappel-
lera néanmoins pour mémoire que David S. Secher et Derek
C. Burke ont décrit dans Nature, vol. 285, du 12 juin
1980, un hybride cellulaire capable de produire des anti-
30 corps actifs à l'égard d'interféron humain leucocytaire

- 2 -

et donnant lieu, lorsqu'ils sont implantés *in vivo*, à des tumeurs solides, dont les produits d'excrétion peuvent être isolés à partir du sérum sanguin de l'hôte. Le procédé de production de l'hybride cellulaire n'a pas été indiqué, si ce n'est que les cellules sécrétrices d'immunoglobulines anti-interféron, fusionnées avec les cellules d'un myélome, avaient été obtenues à partir de souris ou de rats préalablement immunisés avec de l'interféron lymphoblastoïde sous forme d'émulsion dans l'adjuvant complet de Freund.

L'invention a pour but de fournir des hybrides cellulaires particulièrement efficaces, et plus particulièrement du type de ceux qui, lorsqu'ils sont implantés *in vivo*, induisent la formation chez l'hôte de tumeurs liquides, notamment du type ascites, qui constituent alors une source particulièrement riche en anticorps anti-interféron.

Le procédé de formation d'hybrides cellulaires conformes à l'invention est caractérisé par la fusion des cellules d'un myélome ou analogue avec des cellules productrices d'anticorps anti-interféron originaires d'un hôte animal, notamment de souris, préalablement immunisé par des liposomes d'interféron humain.

De préférence, les cellules productrices d'anticorps anti-interféron intervenant dans ladite fusion sont des cellules provenant de souris immunisées contre l'interféron leucocytaire, notamment des splénocytes. Bien entendu, on peut également avoir recours à d'autres cellules immunitaires, par exemple des lymphocytes B, notamment originaires des ganglions lymphatiques.

Il est avantageux d'avoir recours, pour la formation de l'hybride cellulaire, à des cellules productrices d'anticorps anti-interféron leucocytaire originaires de souris préalablement immunisées et sélectionnées d'après le titre neutralisant du sérum prélevé sur les souris à l'égard d'interféron leucocytaire au moins 1/10 (dilution minimum) pour 300 U d'interféron.

En ce qui concerne les cellules de myélome mises en oeuvre dans le procédé selon l'invention, on a avantageusement recours à un variant non sécréteur (n'étant plus apte à sécréter sa propre immunoglobuline),
5 avantageusement le variant 6.5.3 non sécréteur décrit par J.F. Kearney, A. Radbruch, B. Liesegang et K. Rajewsky (J. Immunol., vol. 123, 1979, pp. 1548-1550) du myélome azaguanine résistant P3-X63-Ag8 (G. Köhler et C. Milstein, Nature, vol. 256, 1975, p. 495),provenant lui-même de la
10 lignée MOPC-21.

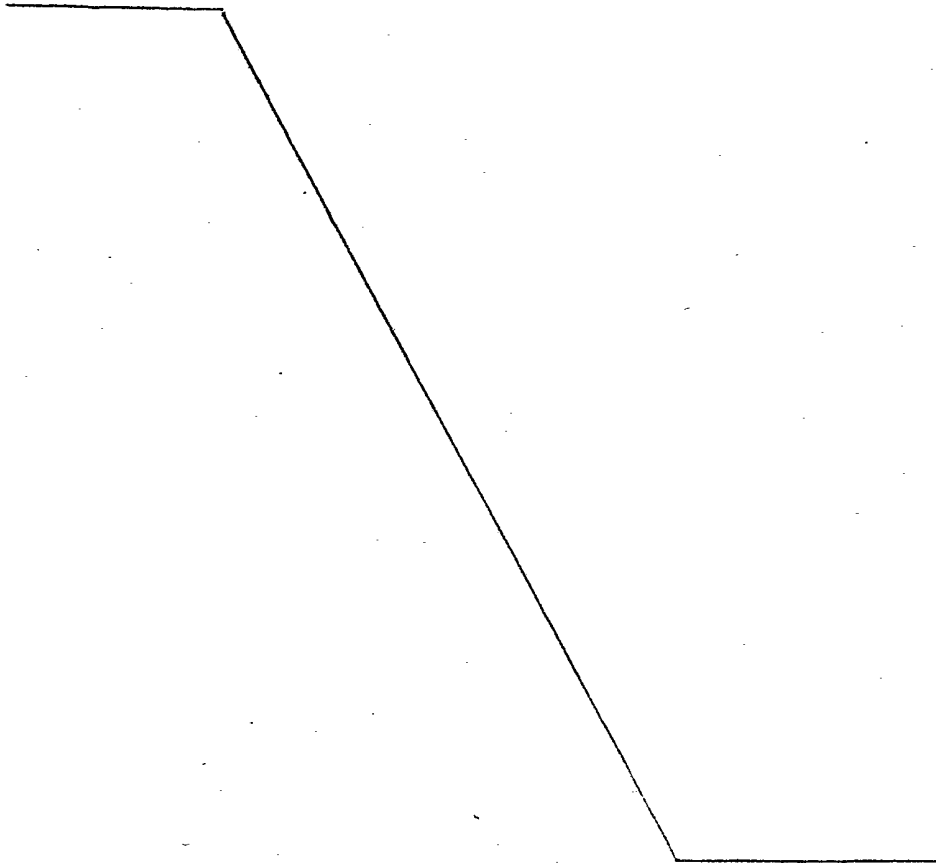
On notera que d'une façon générale on peut réaliser la fusion entre toutes cellules sécrétrices d'anticorps anti-interféron obtenues à partir d'animaux préalablement immunisés par des liposomes d'interféron avec
15 tout type de cellules de myélome ou analogue, qui possèdent une déficience enzymatique susceptible d'être suppléée par des cellules productrices d'anticorps anti-interféron dans des conditions de culture, celle -ci étant provoquée dans un milieu choisi de façon à ce que seules
20 les cellules hybrides ayant reçu en héritage le système enzymatique normal corrigé apporté par les cellules productrices d'anticorps anti-interféron puissent s'y multiplier.

En ce qui concerne plus particulièrement la préparation des liposomes d'interféron utilisés pour l'immunisation préalable des animaux producteurs d'anticorps anti-interféron, on peut avoir recours à toute technique permettant l'incorporation de l'interféron dans des liposomes, par exemple celle décrite par C. La Bonnardière
25 (FEBS Lett., vol. 77, 1977, pp. 191-195).
30

D'une façon générale, les préparations de liposomes susceptibles d'être utilisées pour l'immunisation peuvent être obtenues en mettant en oeuvre tous lipides normalement appropriés à former des liposomes lorsqu'ils
35 sont émulsionnés dans une solution aqueuse et soumis à une agitation ou, de préférence, une sonication permettant la

l'émulsification desdits liposomes. De préférence, les lipides utilisés sont constitués par des phospholipides. On peut inclure parmi les lipides des agents de stabilisation, tels que le cholestérol, et, le cas échéant, des agents amphiphiles, dans le cas où l'on souhaite conférer à ces liposomes des charges positives ou négatives. A titre d'agent amphiphile conférant des charges positives, on peut citer la stéarylamine et, à titre d'agent amphiphile conférant une charge négative, on peut citer la phosphatidylcholine ou le dicétyl-phosphate. On préfère avoir recours à ce dernier type d'agent amphiphile.

La mise en oeuvre du procédé selon l'invention permet l'obtention d'hybrides cellulaires dont la sélection, mettant notamment en jeu leur aptitude à sécréter l'immunoglobuline anti-interféron dans le milieu de culture, devient relativement aisée, comme il sera apprécié à la lecture de l'exemple de production indiqué



plus loin dans le seul but d'illustrer l'invention, sans pour autant la limiter.

L'invention concerne enfin plus particulièrement
5 l'hybride cellulaire ayant les caractéristiques des cellules déposées le 20 octobre 1980 dans la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.) sous le n° I-137 ou de cellules dérivées de celles-ci.

D'une façon générale, elle concerne toute lignée
10 de cellules ayant la capacité de sécréter des anticorps monoclonaux présentant des caractéristiques de structure et des propriétés analogues à celles des anticorps sécrétés par l'hybride cellulaire.

Ces lignées d'hybrides cellulaires sont d'un
15 usage particulièrement avantageux pour la production en masse d'anticorps anti-interféron, notamment comme suite à leur implantation *in vivo*, ces hybrides donnant alors lieu chez l'animal à la formation d'ascites, à partir desquelles peuvent être récupérés par des techniques
20 elles-mêmes connues les anticorps anti-interféron recherchés.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront au cours de la description qui suit d'un mode préféré de production d'un hybride cellulaire con-
25 forme à l'invention, ainsi que de son application à la production de quantités importantes d'anticorps anti-interféron.

On trouvera ci-après le protocole détaillé de l'immunisation et des autres phases de l'obtention de
30 l'hybridome sécréteur d'immunoglobulines anti-interféron, dénommé HBA.

1°) Préparation des liposomes et immunisation des souris.

Les liposomes sont préparés à partir de phosphatidylcholine, de dicétyl-phosphate et de cholestérol dans des rapports molaires 7-2-1, solubilisés dans du
35 chloroforme. Après évaporation du chloroforme sous vide, les liposomes sont resuspendus dans l'interféron en phase aqueuse (2 volumes d'interféron pour 1 volume de la solution chloroformique). L'interféron leucocytaire, préparé

- et purifié selon la méthode de Cantell (K. Cantell, S. Hirvonen, K.E. Mogensen et L. Pyhala, "The production and use of interferon for the treatment and prevention of human virus infection", *In vitro* Monograph, n° 3, 1974, pp. 35-38) avait une activité spécifique de 3.10^6 unités antivirales/mg/ml de protéines. La préparation liposomique, après sonication ménagée, est injectée à des souris BALB/c à raison de 0,4 ml par souris par voie intrapéritonéale.
- 10 Après quatre injections espacées de 15 jours, une cinquième injection de rappel est effectuée par voie intraveineuse 2 ou 3 jours avant le prélèvement de la rate. Les titres en anticorps neutralisant l'interféron dans le sérum des souris sont alors mesurés.
- 15 2°) Production des hybrides.
- Les splénocytes d'une souris immunisée sont fusionnés avec les cellules d'un myélome qui possèdent une déficience enzymatique telle que seules les cellules hybrides qui ont le système enzymatique normal apporté par
- 20 les splénocytes peuvent se multiplier dans un milieu adéquat.
- On utilise un variant non sécréteur (6.5.3.) dérivé par Rajewski et coll. (J. Immunol., vol. 123, 1979, pp. 1548-1550) de la souche azaguanine résistante
- 25 P3-X63-Ag8, dérivée elle-même du myélome MOPC-21.
- Ces cellules sont maintenues en culture dans du milieu RPMI 16-40 additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Rehatain, Armour) et d'antibiotiques.
- 2 à 4 jours après l'immunisation primaire par
- 30 voie intraveineuse, on recueille de façon aseptique la rate des souris qui est dispersée en une suspension de cellules uniques dans un tampon phosphate P.B.S. contenant 2 % en poids de sérum de veau foetal, par passage de la rate à travers un filtre fin ou par hachage en morceaux de 1 à 2 mm
- 35 et trituration de ces morceaux avec une pipette. Les morceaux résiduels les plus importants sont décantés par simple sédimentation pendant 5 minutes et la suspension

de cellules surnageantes est récupérée à la pipette en vue de la fusion. Le rendement est d'habitude de l'ordre de $1-2 \times 10^8$ cellules mononucléaires par rate de souris.

On mélange un volume d'une telle suspension contenant de l'ordre de 1×10^8 cellules mononucléaires avec environ 1×10^7 cellules du myélome dans un tube à centrifugation conique de 50 ml. Les cellules sont mélangées de façon intime, lavées, centrifugées et décantées au sein d'un milieu RPMI dépourvu de sérum (GIBCO), ces opérations étant répétées afin d'éliminer les éventuelles protéines de sérum de souris que contenait encore le mélange initial. Après le dernier lavage, on élimine le surnageant dans toute la mesure du possible ; on produit une rupture douce du culot de cellules, simplement en tapotant le fond du tube et on introduit le tube dans un bain-marie à 37°C, température à laquelle est ensuite favorisée la fusion. Celle-ci est favorisée par introduction lente d'une solution de 1 ml de polyéthylène-glycol 1500 (Roth) à 50 % (poids/volume) sous agitation douce de la suspension de cellules. Il va de soi que l'on peut utiliser, au lieu du polyéthylène-glycol, tout autre agent favorisant la fusion, par exemple le virus de Sendai. On maintient le mélange sous agitation douce à 37°C pendant 90 secondes, puis successivement on en ajoute 1 ml en 30 secondes, puis 3 ml pendant les 30 secondes suivantes, puis enfin 16 ml pendant les 60 secondes encore suivantes de milieu RPMI exempt de sérum. On laisse alors décanter le mélange à 37°C pendant 5 minutes. Le milieu est alors centrifugé à 1000 tours par minute pendant 7 minutes. Le surnageant est alors éliminé.

Les étapes suivantes du procédé ci-après décrites visent d'abord à permettre à la fois le conditionnement des hybrides formés et la destruction des cellules autres que les hybrides, plus particulièrement les cellules de myélome en excès, puis ensuite à promouvoir la croissance dans un milieu normal.

Après la fusion, les cellules sont réparties suspendues dans un milieu composé de moitié de milieu de culture RPMI 16-40 (GIBCO) conditionné pendant au moins 72

heures par des fibroblastes de la lignée humaine MRC5 qui favorisent la croissance des cellules des lignées lymphoïdes grâce à leurs apports en principes nutritifs et facteurs de croissance (effet "feeder") (L. Montagnier et J. Gruest, Int. J. Cancer, vol.23, 1979, pp. 71-75), et de moitié de culture RPMI 16-40 normal. Les cellules sont alors réparties en 4 plaques Costar de 24 puits, à raison de 2 ml de suspension cellulaire par puits. Le lendemain, les cellules sont placées en milieu RPMI "HAT" contenant 1,36 mg/ml de hypoxanthine, 17,6 γ /ml d'aminoptérine et 0,39 mg/ml de thymidine. Ce milieu est destiné à tuer les cellules de myélome en excès qui n'ont pas participé à la fusion et qui ne peuvent pas pousser dans ce milieu en raison de l'incapacité des cellules initiales du myélome de produire l'enzyme hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGPRT).

Puis on change leur milieu de moitié en le remplaçant par le même milieu, mais sans aminoptérine (milieu HT), afin d'adapter les hybrides à des conditions de croissance mettant en jeu des voies métaboliques normales.

3°) Isolement de l'hybridome producteur.

Les surnageants des puits de culture où poussent les hybridomes sont testés pour leur capacité à neutraliser l'activité antivirale de l'interféron leucocytaire. Cette activité est elle-même détectée par son effet protecteur sur l'effet cytopathogène du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) sur cellules humaines MRC5 distribuées en plaques microtest Nunc de 96 trous. Des dilutions croissantes de 2 en 2 d'interféron sont utilisées à partir d'une concentration de 600 U/ml. Elles sont préincubées avec les surnageants où l'on recherche des anticorps pendant 1 heure à 37°C, puis 2 heures à +4°C avant mise en contact du mélange avec les cellules humaines qui seront infectées par le VSV.

Au cours de 23 expériences de fusion, 842 hybridomes ont été isolés et leurs surnageants de culture testés pour leur capacité à neutraliser l'activité antivirale de l'interféron leucocytaire. 30 ont donné des résultats

- 9 -

positifs mais à la limite de la significativité et fluctuant d'un titrage à l'autre. Mais un des hybridomes formés, dénommé HBA, s'est révélé sécréteur, de façon reproductible, d'une substance capable de neutraliser l'interféron. Il est à remarquer que le titre neutralisant du sérum de la souris donneuse des splénocytes à l'origine de cet hybridome était relativement élevé (300 U d'interféron au 1/10).

4°) Caractérisation de l'hybridome et de sa sécrétion.

10 a) Clonage en agarose :

Les cellules HBA ont été ensemencées en agarose à raison de 10^4 par boîte de 60 mm, en présence de $2 \cdot 10^5$ cellules MRC5 agissant comme "feeder".

15 Une vingtaine de clones ont été isolés à partir des colonies formées en agarose par les cellules HBA. Ils se sont tous révélés producteurs d'anticorps neutralisant l'interféron à des titres égaux ou légèrement supérieurs à ceux donnés par la population HBA de départ, ce qui suggère que celle-ci était déjà clonale.

20 C'est en effet ce qui résulte de l'examen de la fig. 1, laquelle permet de comparer les pouvoirs neutralisants de l'anticorps sécrété dans chacun des milieux identifiés ci-dessous à l'égard de l'activité antivirale de l'interféron leucocytaire.

25 Les colonnes représentent les concentrations maximales d'interféron (variant de 30 à 300 U/ml neutralisées par les anticorps (1 heure à 37°C, 2 heures à 4°C, 100 µl d'interféron + 50 µl de solution à tester).

A - Témoin interféron seul.

30 B - Surnageant du myélome X63-Ag8 6.5.3. (négatif).

C - Sérum dilué au 1/10 de la souris immunisée dont les lymphocytes spléniques ont servi à l'hybridation, au jour du prélèvement de la rate.

35 D - Surnageant (récolte de 48 heures) d'un hybridome négatif.

E - Surnageant de l'hybridome HBA, 15 jours après la fusion.

- 10 -

- F - Surnageant de l'hybridome HBA, 30 jours après la fusion.
- G - Surnageant d'un sous-clone HBA, isolé en agarose. Les colonnes H, I, J de la fig. 1 se rapportent au pouvoir neutralisant des anticorps fabriqués *in vivo* dont on décrit plus loin la production en ascite.
- 5 H - Surnageant d'ascite obtenue à partir du clone HBA, précipité par sulfate d'ammonium à demi-saturation, dialysé contre du tampon phosphate 0,1 M pH 8,0, 10 0,015 M NaCl, aprotinine "Zymofren" 1 %.
- Dilution : 4 µg de protéine par ml.
- I - IgG purifiée sur DEAE-cellulose éluée en tampon phosphate 0,1 M, pH 8,0, 0,01 M NaCl + "Zymofren". Dilution à 4,6 µg/ml.
- 15 J - Même préparation que I mais à partir d'une ascite d'un autre hybridome (Bordenave, Pages, Stoltz et Bussard, Immunological Letters, 1979. vol. 1, p.165-171).

b) Caractérisation de l'immunoglobuline sécrétée:

Après incubation des cellules HBA en présence de ^{14}C -leucine, un aliquot du surnageant a été analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 12,5 % dans des conditions réductrices (B. Takacs, Immunological Methods, I. Lefkovits & B. Pernis ed., 1979, pp. 81-105).

Les fig. 2a et 2b sont des reproductions des auto-fluorographies des électrophorégrammes obtenus :

25 - en ce qui concerne la fig. 2a, à partir des produits de sécrétion de l'hybridome HBA, d'une part (colonne A), et, d'autre part, de cellules témoins provenant du myélome X63-Ag8 6.5.3. (colonne B) et d'un autre hybridome ne sécrétant qu'une chaîne légère d'IgG (colonne C);

30 - en ce qui concerne la fig. 2b, à partir des immunoglobulines produites en ascite (coloration au bleu de Coomassie), dans les conditions mentionnées plus loin. On notera que les bandes observées

35 dans la colonne M de la fig. 2b correspondent aux déplacements observés de marqueurs de poids moléculaires déterminés, dont les valeurs sont les produits par mille des nombres indiqués en regard des bandes correspondantes.

Les conditions de marquage utilisées ont été les suivantes : incubation pendant 6 heures en présence de 10 μ Ci/ml de leucine 14 C (CEA - Activité spécifique : 318 mCi/mM) en milieu MEM sans sérum contenant les acides aminés non essentiels, ainsi que guanosine, uridine, cytidine et adénosine à la concentration de 10^{-4} M).

La fig. 2a montre que la sécrétion majeure de l'hybridome consiste essentiellement en chaînes légères (poids moléculaire de l'ordre de 25.000-30.000) et chaînes lourdes (poids moléculaire de l'ordre de 50.000-57.000) constitutives d'une IgG, sensiblement à l'exclusion de tout autre constituant protéique. Ceci a également été confirmé par le fait que le produit de sécrétion est précipité par un sérum de lapin anti-IgG de souris.

15 5°) Production massive *in vivo* de l'anticorps.

Les cellules HBA, ou des sous-clones, ont été injectées à des souris BALB/c prétraitées au moins 15 jours auparavant par une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de "pristane" (tétraméthylpentadécane) à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/souris. Après apparition de l'ascite, le liquide d'ascite est recueilli par ponction de la cavité péritonéale et débarrassé des cellules par centrifugation. Le liquide reçoit 100 U d'aprotinine ("Zymofren" Specia), puis est précipité par du sulfate d'ammonium à demi-saturation. Le précipité est redissous en solution de NaCl isotonique, toujours en présence d'aprotinine, dialysé contre la même solution et testé pour son activité neutralisante. Une dilution au 1/10000 de cette préparation (soit 4 μ g de protéine/ml) peut encore neutraliser 150 U d'interféron (colonne H de la fig. 1).

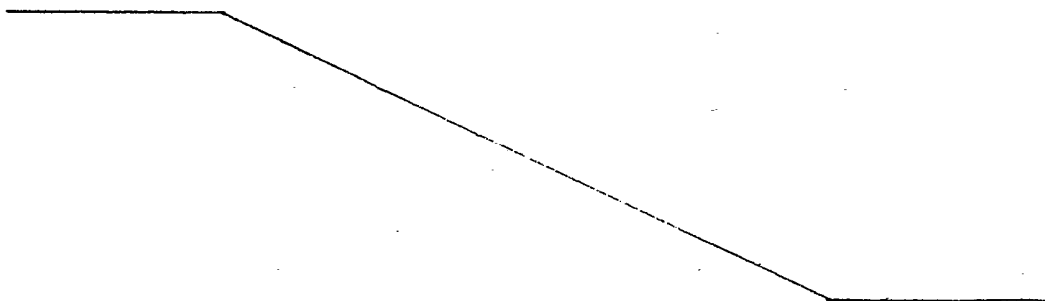
Afin de purifier davantage l'IgG, le dialysat a été chromatographié sur une colonne de DEAE-cellulose (DE52, Whatman) et l'IgG éluée par un tampon phosphate 0,1 M pH 8,0, en présence de 100 U d'aprotinine. L'activité neutralisante était bien associée à cette fraction, 1 mg/ml d'IgG neutralisant $4,8 \cdot 10^5$ U/ml d'interféron

(colonne I de la fig. 1).

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide a confirmé que le principal constituant du dialysat était bien l'IgG et montré son enrichissement
5 après chromatographie (fig. 2b), dans laquelle sont reproduits les électrophorégrammes des immunoglobulines obtenues à partir :

- 10 A - du liquide de l'ascite produite par inoculation à la souris de l'hybridome HBA, après précipitation par le sulfate d'ammonium et dialyse contre un tampon phosphate 0,01 M, pH 8,0 ;
- B - de la même fraction, après passage sur colonne DEAE-cellulose et élution en tampon phosphate 0,01 M, pH 8 ;
- C - de la même fraction mais élue à partir de la même
15 colonne en tampon P 0,04 M, pH 8 ;
- D - du liquide d'ascite produite par inoculation d'un autre hybridome non spécifique de l'interféron de Bordenave et Coll. déjà cité ayant subi le même traitement que décrit en A ;
- 20 E - du liquide de la même ascite que D mais traité comme décrit en B ;
- F - du liquide de la même ascite que B mais traité comme en C.

Le pouvoir neutralisant de l'anticorps vis-à-vis
25 vis de différents types d'interféron a été recherché à la fois sur leur action antivirale et leur effet anticellulaire mesuré par le procédé du Discotest (L. Montagnier et J. Gruest, Ann. Virol. (Institut Pasteur), vol. 131 E, 1980, pp. 247-253). Les résultats
30 obtenus par les deux tests ont été similaires. L'anticorps ne neutralise pas l'interféron fibroblastique



(β) produit par les cellules MRC5. Il neutralise une préparation d'interféron (α 1) produite selon M.G. Masucci, R. Szigetti, E. Klein, G. Klein, J. Gruet, L. Montagnier, H. Taira, A. Hall, S. Nagata et C. Weissmann (Science, 5 vol. 209, 1980, p. 1431-1435) par des recombinants bactériens tels que ceux décrits par S. Nagata, H. Taira, A. Hall, L. Johnrud, M. Streuli, J. Escödi, W. Boll, K. Cantell et C. Weissmann (Nature, vol. 284, 1980, p. 316) et seulement en partie l'interféron dit lympho-10 blastoïde, produit par les cellules NAMALVA. Ces résultats suggèrent que l'anticorps reconnaît un motif antigénique porté par un ou plusieurs types d'interféron leucocytaire.

En conclusion, on constate que l'hybride cellulaire préféré de l'invention produit des immunoglobuli-15 nes monoclonales qui constituent des anticorps monospécifiques contre le composant majeur de l'interféron leucocytaire humain.

Les applications d'un tel anticorps, qui peut être produit massivement par l'inoculation des cellules à 20 l'animal, sont multiples. Cet anticorps, couplé chimiquement à du sépharose, permet la purification jusqu'à l'homogénéité électrophorétique de l'interféron leucocytaire et d'une fraction de l'interféron lymphoblastoïde.

Les résultats obtenus avec l'interféron pro-25 duit par un recombinant bactérien rend également possible son utilisation dans la purification de cet interféron.

REVENDECATIONS

- 1 - Hybride cellulaire capable de produire des anticorps actifs à l'égard d'interféron humain résultant de la fusion des cellules d'un myélome ou analogue avec des cellules productrices d'anticorps anti-interféron humain
- 5 originaire d'un hôte animal, notamment de souris, préalablement immunisé contre l'interféron humain, caractérisé en ce que cet hybride est du type de ceux qui, lorsqu'ils sont implantés *in vivo*, induisent la formation chez l'hôte de tumeurs liquides, notamment du type ascites.
- 10 2 - Hybride cellulaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est apte à sécréter des anticorps anti-interféron monoclonaux.
- 3 - Hybride cellulaire selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est apte
- 15 à sécréter une immunoglobuline, caractérisée par les propriétés suivantes :
- elle neutralise l'activité antivirale de l'interféron leucocytaire,
 - elle consiste essentiellement en chaînes légères, de

20 poids moléculaire de l'ordre de 25.000-30.000, et en chaînes lourdes (poids moléculaire de l'ordre de 50.000-57.000),

 - elle ne neutralise pas l'interféron fibroblastique (β) produit par les cellules MRC5,

25 - elle neutralise une préparation d'interféron (α 1) produite par des recombinants bactériens,

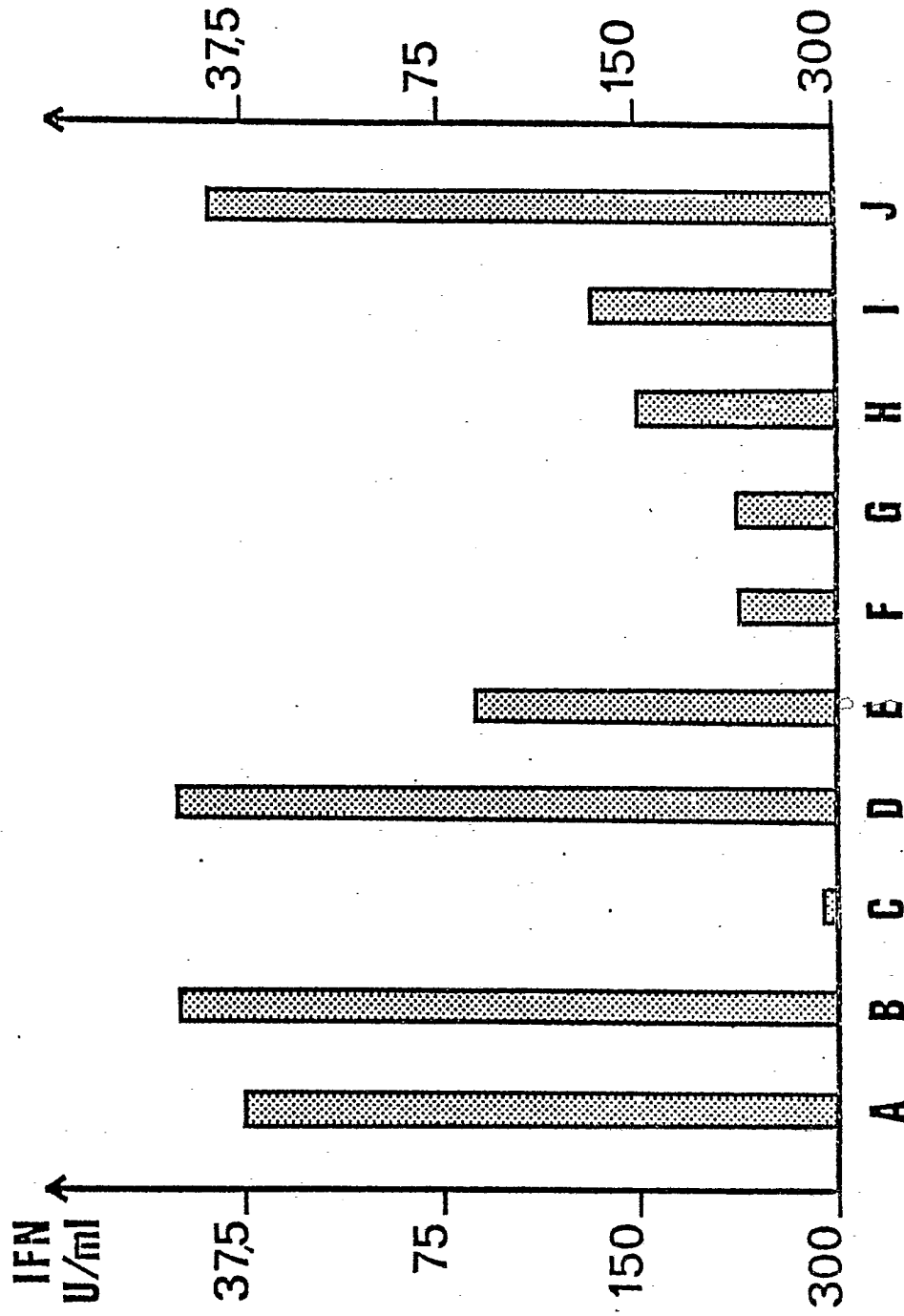
 - elle neutralise en partie l'interféron dit "lymphoblastoïde" produit par les cellules NAMALVA.
- 4 - Hybride cellulaire selon la revendication 2
- 30 ou la revendication 3 qui possède les caractéristiques essentielles des cellules déposées le 20 octobre 1980 dans la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.) sous le n° I-137 ou de cellules dérivées de celles-ci.

5 - Procédé de formation d'un hybride cellulaire produisant des anticorps spécifiques de l'interféron humain, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par la fusion des cellules d'un myélome du type de ceux qui, lorsqu'ils sont implantés *in vivo*, induisent la formation chez l'hôte de tumeurs liquides, avec des cellules productrices d'anticorps anti-interféron originaires d'un hôte animal, notamment de souris, préalablement immunisé par des liposomes d'interféron humain.

6 - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules de myélome sont un variant non sécréteur, notamment du type X63-Ag8 6.5.3.

7 - Procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisé en ce que les cellules productrices d'anticorps anti-interféron intervenant dans ladite fusion sont des cellules productrices d'interféron leucocytaire, notamment des splénocytes.

8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules productrices d'anticorps anti-interféron leucocytaire mises en oeuvre sont originaires de souris préalablement immunisées, sélectionnées d'après le titre neutralisant du sérum sur les souris à l'égard d'interféron leucocytaire étant au moins de 1/10 pour 300 U d'interféron.



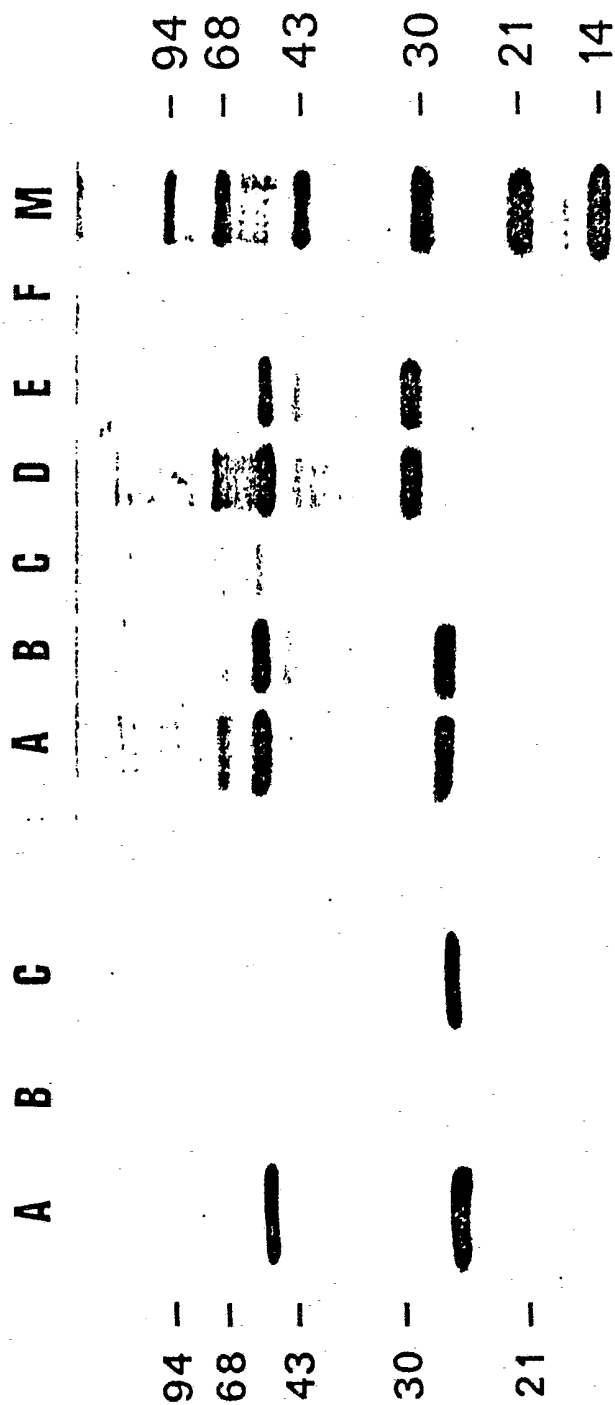


Fig. 2a

Fig. 2b