



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪

⑪ CH 652 750 A5

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑤① Int. Cl. 4: C 12 P 21/02
C 07 K 7/26
C 12 N 15/00
C 12 N 5/02

// A 61 K 37/36 (C 12 P 21/02,
C 12 R 1:91)

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 8351/81

㉔ Date de dépôt: 30.12.1981

㉓ Priorité(s): 31.12.1980 JP 55-185731

㉒ Brevet délivré le: 29.11.1985

㉑ Fascicule du brevet
publié le: 29.11.1985

㉒ Titulaire(s):
Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku
Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)

㉒ Inventeur(s):
Sugimoto, Kaname, Okayama-shi/Okayama (JP)

㉒ Mandataire:
Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

㉑ Production de facteur de croissance humain.

㉑ Le procédé de production du facteur de croissance humain, FCh, consiste à faire se multiplier in vivo, au moyen d'animaux à sang chaud, des cellules humaines capables de produire FCh, puis à laisser les cellules, ainsi multipliées, avec renouvellement éventuel du milieu nutritif, libérer le FCh.

Les rendements en FCh sont bien supérieurs à ceux que l'on obtient par un procédé classique de culture de tissus in vitro.

REVENDECATIONS

1. Procédé pour la production du facteur de croissance humain FCh par multiplication de cellules humaines capables de produire cette substance, et maintien des cellules ainsi multipliées jusqu'à ce qu'elles libèrent FCh, caractérisé en ce qu'on utilise, pour la multiplication cellulaire, un animal à sang chaud.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la multiplication cellulaire est réalisée par implantation des cellules humaines dans le corps d'un animal à sang chaud.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la multiplication cellulaire est réalisée à l'aide d'un dispositif, dans lequel le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud est fourni aux cellules humaines.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le dispositif est une chambre de diffusion équipée de manière que les cellules de l'hôte animal ne la contaminent pas.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que, au cours du stade de libération de FCh, le milieu nutritif est renouvelé à intervalles réguliers, les milieux usés étant mis de côté pour en extraire le FCh.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'animal à sang chaud est une volaille, en particulier poulet ou pigeon, ou un mammifère, notamment chien, chat, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, rat, cobaye, hamster, souris ou souris nue.

7. Procédé de préparation des cellules humaines utilisées dans le procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire FCh sont des cellules que l'on obtient par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains avec des cellules humaines capables de produire FCh.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules humaines fusionnées avec la lignée de lymphoblastoïdes proviennent de carcinome du foie humain.

9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée leucémique, en particulier de Namalwa Ball-1 ou JBL.

La présente invention concerne un procédé selon le préambule de la revendication 1, à savoir un procédé de production de facteur de croissance humain, ci-après désigné en abrégé par FCh.

Ce facteur FCh est une substance de type hormonal, présente principalement dans le sérum humain; elle dépend de l'hormone de croissance et son action s'exerce sur différents tissus; cette substance est donc classée dans le groupe des substances dites de type somatomédine qui sont des facteurs stimulant la croissance. On sait également que FCh stimule la multiplication des cellules de différents tissus, favorise l'oxydation du glucose dans les tissus graisseux et, administré *in vivo*, provoque la réduction du taux de sucre dans le sang, ce qui est une activité de type insulinoïde. Bien que le mode d'action de FCh ne soit pas entièrement connu à ce jour, il est clair qu'il est en rapport étroit avec des phénomènes métaboliques comme régénération et multiplication cellulaires. La commercialisation de cette substance en tant que médicament est très attendue depuis de nombreuses années, mais les procédés classiques pour sa production, par exemple par récupération de FCh à partir de grandes quantités de sérum humain, à l'aide de modes opératoires très compliqués, ou par culture *in vitro* de tissus, ne permettent pas d'obtenir des quantités suffisantes pour l'utilisation clinique et thérapeutique.

La présente invention est fondée sur la constatation inattendue que des cellules humaines obtenues par multiplication de cellules humaines capables de produire FCh à l'aide d'un animal à sang chaud présentent une aptitude à produire ce facteur bien supérieure à celle

des cultures de tissu *in vitro*, la production de FCh par cellule étant jusqu'à 2 à 50 fois supérieure.

Le nouveau procédé est caractérisé selon l'invention par la partie caractérisante de la revendication 1. Le procédé selon l'invention, tout en aboutissant à une production supérieure en FCh, n'exige que peu ou pas de milieu nutritif contenant du sérum coûteux pour la multiplication cellulaire, et il permet de maintenir plus facilement que dans le cas de la culture de tissu *in vitro* le milieu de culture au cours de la multiplication cellulaire. En particulier, toutes les cellules humaines capables de produire FCh peuvent être facilement multipliées, grâce à l'utilisation de fluide corporel nutritif provenant d'un animal à sang chaud, par transplantation des cellules en question dans le corps de l'animal ou par leur mise en suspension dans une chambre de diffusion équipée pour recevoir le fluide corporel nutritif, l'animal étant alimenté de manière habituelle. Ce procédé donne en plus une multiplication des cellules plus stable et plus élevée et une production supérieure de FCh par cellule.

L'invention concerne en plus un procédé selon le préambule de la revendication 7, ce procédé étant caractérisé selon l'invention par la partie caractérisante de cette revendication.

Convienient toutes les cellules humaines dans la mesure où elles produisent FCh et se multiplient aisément dans le corps d'un animal à sang chaud: par exemple les cellules humaines qui produisent par nature FCh, comme les cellules hépatiques humaines, celles qui sont transformées par un virus, un agent carcinogène ou des radiations, et des cellules de carcinome du foie humain provenant d'un patient porteur d'un carcinome du foie; des cellules de carcinome du poumon humain, productrices de FCh ectopique; des lignées de cellules établies des cellules ci-dessus. L'utilisation de lignées de lymphoblastoïdes humains établis faciles à conserver, dotées de sites génétiques codant la production de FCh au moyen de techniques de recombinaison génétique utilisant des enzymes comme ADN ligase, nucléase et ADN polymérase, ou au moyen de fusion cellulaire, utilisant des agents tels que polyéthylèneglycol ou virus de Sendai, aboutit avantageusement à une multiplication cellulaire remarquablement supérieure, lorsqu'on transplante les cellules dans le corps d'un animal à sang chaud, la production de FCh par cellule étant alors de 2 à 10 fois plus élevée. En outre, comme la transplantation au corps de l'animal des lignées de lymphoblastoïdes humains établis mentionnés plus haut aboutit à la formation de tumeurs massives pouvant être facilement désagrégées, et que ces tumeurs ne sont guère contaminées par les cellules de l'hôte animal, la récolte des cellules de lymphoblastoïdes humains multipliés vivantes est facile.

Convienient comme animaux utilisables tous ceux dans lesquels les cellules peuvent se multiplier, par exemple des volailles comme poulet et pigeon, des mammifères comme chat, chien, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, cobaye, hamster, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immunoréaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser des animaux nouveaux ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme œuf, embryon ou fœtus. Afin de réduire l'immunoréaction, l'animal peut être traité, avant la transplantation des cellules, par irradiation aux rayons X ou aux rayons γ , d'environ 200 à 600 rems, ou par injection d'antisérum ou d'agent immunodépresseur préparé selon un procédé classique. Comme la souris nue, utilisée comme animal à sang chaud, présente l'immunoréaction la plus faible, même à l'âge adulte, on peut l'utiliser avantageusement sans prétraitement pour y transplanter et y multiplier rapidement des lignées de cellules humaines établies.

Une multiplication cellulaire stabilisée et une augmentation de la production de FCh peuvent être à la fois réalisées par transplantation répétée, utilisant des combinaisons de différents animaux à sang chaud; on peut atteindre ces objectifs en implantant d'abord les cellules chez le hamster, où elles se multiplient, puis en les réimplantant chez la souris nue. En outre, on peut effectuer la transplantation successive chez des animaux de la même classe ou de la même division, aussi bien que chez ceux de la même espèce ou du même genre.

En ce qui concerne la localisation de l'implantation des cellules humaines, conviennent tous les sites de l'animal, pourvu que les cellules puissent s'y multiplier, par exemple la cavité allantoïque ou les voies intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

A côté de cette transplantation directe des cellules au corps de l'animal existe la possibilité de faire se multiplier aisément les lignées classiques de cellules humaines établies capables de produire FCh, en utilisant le fluide corporel nutritif provenant de l'animal, grâce à l'inclusion, par exemple par voie intrapéritonéale, dans le corps de l'animal d'une chambre de diffusion classique, de taille et de forme appropriées, munie d'une membrane poreuse filtrante, d'un ultrafiltre ou de fibres creuses d'un diamètre de pore de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-5} m, qui empêche la contamination de la chambre de diffusion par les cellules de l'hôte tout en permettant l'apport du fluide corporel nutritif de l'animal aux cellules. De plus, comme la chambre de diffusion peut être conçue, si nécessaire, pour être placée sur l'hôte animal et permettre au fluide corporel de ce dernier de circuler dans la chambre, les parois de celle-ci peuvent être munies de fenêtres latérales transparentes, permettant l'observation de la suspension de cellules, ainsi que le remplacement et l'échange avec une chambre fraîche: la multiplication cellulaire est ainsi augmentée à un niveau encore supérieur, rapporté à la durée de vie de l'animal, et la production par animal est encore accrue sans sacrifice de l'hôte. En outre, lorsqu'on utilise cette chambre de diffusion, comme les cellules humaines multipliées peuvent être facilement récoltées, et qu'il n'y a pas manifestation d'immunoréaction, du fait de l'absence de contact direct entre les cellules humaines et celles de l'hôte animal, on peut utiliser comme hôte, conformément à l'invention, sans prétraitement destiné à réduire l'immunoréaction, tout animal à sang chaud.

L'alimentation de l'hôte animal auquel on a implanté des cellules humaines peut s'effectuer facilement par procédé classique, même après la transplantation cellulaire, et elle ne nécessite pas de soins particuliers.

La multiplication cellulaire maximale est atteinte environ 1 à 20 semaines après l'implantation des cellules. Lorsque la lignée établie implantée est une lignée de cellules de tumeur humaine ou de lymphoblastoïdes humains, la multiplication cellulaire maximale est atteinte en 1 à 5 semaines après la transplantation, en raison des vitesses de multiplication cellulaire très élevées de ce type de lignée.

On peut obtenir 10^7 à 10^{12} ou plus de cellules humaines par hôte. Autrement dit, le nombre de cellules humaines implantées chez l'hôte animal s'accroît 10^2 à 10^7 fois ou plus, ou bien est d'environ 10^1 à 10^6 fois ou plus celui que l'on obtient avec un procédé de culture de tissu *in vitro*, utilisant un milieu nutritif; aussi ces cellules sont-elles avantageusement utilisables pour la production de FCh.

En ce qui concerne le procédé pour libérer FCh des cellules humaines multipliées, on peut employer tout moyen permettant la libération de FCh par les cellules humaines obtenues par le mode opératoire mentionné plus haut. Par exemple, les cellules humaines obtenues par multiplication en ascite, en suspension et récolte à partir de cet ascite, ou par extraction d'une tumeur massive formée sous la peau, et récolte après désagrégation de la tumeur, sont mises en suspension pour atteindre une concentration de 10^4 à 10^8 cellules/ml dans un milieu nutritif, maintenues à une température de l'ordre de 20 à 40°C, puis mises à incuber à cette température pendant environ une à quelques semaines pour libérer le FCh. Pendant cette période d'incubation, le milieu nutritif peut être éventuellement remplacé, à intervalles réguliers, par une préparation fraîche du même milieu, afin de fournir une nourriture suffisante aux cellules, et le FCh libéré dans le milieu usé peut être également récolté.

Le FCh ainsi obtenu peut être recueilli facilement grâce à des techniques de purification et de séparation utilisant des modes opératoires classiques tels que relargage, dialyse, filtration, centrifugation, concentration et lyophilisation. Quand on souhaite un produit encore plus pur, on peut obtenir une préparation de pureté supérieure par combinaison des techniques mentionnées plus haut avec d'autres modes opératoires classiques, tels qu'adsorption et désorp-

tion avec échange d'ions, fractionnement par poids moléculaire, chromatographie par affinité, fractionnement au point isoélectrique et électrophorèse. Comme la préparation de FCh ainsi obtenue est identique, aux points de vue immunologique et physicochimique, à celles que l'on obtient par des procédés classiques, elle peut être avantageusement utilisée, seule ou en combinaison avec un ou plusieurs agents, pour injection, administration externe, interne ou de diagnostic, pour la prévention ou le traitement de maladies humaines.

La quantité de FCh présente dans le milieu de culture est dosée par le procédé d'essai décrit par Norman C. Dulak et Howard M. Tennis, «Journal of Cellular Physiology», vol. 81, pp. 161-170 (1973). Une unité de FCh y est définie comme la quantité d'activité provoquant une stimulation de l'incorporation de ^3H -thymidine, équivalente à celle qui est provoquée par 1 mg de protéine totale de sérum de veau.

Plusieurs formes de réalisation de la présente invention sont décrites en détail ci-après. Il est bien entendu que cette description n'est donnée qu'à titre d'exemple.

Exemple 1:

Des cellules de carcinome de foie humain haché et désagrégé, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant d'un carcinome du foie, sont implantées par voie sous-cutanée dans des souris nues adultes, qui sont ensuite nourries de manière habituelle pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, pesant environ 9 g chacune, sont hachées et mises en suspension dans une solution saline contenant de la trypsine pour les désagréger. Après lavage avec du milieu RPMI 1640 exempt de sérum (pH 7,2), ces cellules sont remises en suspension dans une préparation fraîche du même milieu à une concentration voisine de 10^5 cellules/ml, et l'on met à incuber à 37°C pendant 15 d pour libérer FCh, avec remplacement périodique du milieu par du milieu frais. Le milieu usé est réfrigéré à -20°C, immédiatement après son remplacement, et il est entreposé jusqu'à son utilisation ultérieure. Après la période d'incubation, la partie surnageante de la suspension cellulaire et le milieu provenant d'un stock réfrigéré, préparé par dégel, sont centrifugés ensemble à environ 8000 tr/min pendant 30 min; la partie surnageante ainsi obtenue est essayée quant à sa teneur en FCh. La production de cette substance est de 7500 unités/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues par culture *in vitro* des mêmes cellules de carcinome de foie humain dans du milieu de Eagle (pH 7,2), additionné de 1% en volume/volume de sérum fœtal de bovidé et 20% en volume/volume de bouillon, et mises à incuber à 37°C, sont traitées comme plus haut pour libérer FCh. La production de cette substance n'est que de 25 unités/ml de suspension.

Exemple 2:

Des cellules de carcinome du foie humain haché et désagrégé, obtenues comme dans l'exemple 1, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa sont mises en suspension ensemble dans un récipient avec une solution saline de 140 mmol de NaCl, 54 mmol de KCl, 1 mmol de NaH_2PO_4 et 2 mmol de CaCl_2 , de manière à obtenir des concentrations cellulaires respectives de l'ordre de 10^3 cellules/ml. La suspension de cellules est mélangée, sous refroidissement à la glace, avec une préparation fraîche de la même solution saline contenant du virus de Sendaï préalablement inactivé par irradiation à l'ultraviolet; le tout est transféré 5 min après le mélange dans un incubateur à 37°C, et y est agité pendant 30 min pour réaliser la fusion cellulaire, introduisant l'aptitude à produire FCh dans la lignée des lymphoblastoïdes humains de Namalwa. Après clonage selon un procédé classique de la lignée de cellules d'hybridome capable de produire FCh, on l'implante par voie intrapéritonéale chez des souris nues adultes, qui sont ensuite nourries de manière habituelle pendant 5 semaines. Les tumeurs massives résultantes, pesant environ 14 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour libérer FCh. La production de FCh est d'environ 32 000 unités/ml de suspension cellulaire. L'expé-

rimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1, par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes humains fusionnés de Namalwa, et maintien des cellules ainsi multipliées jusqu'à ce qu'elles aient libéré du FCh. La production de FCh n'est que de 1100 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 3:

Après injection à des hamsters nouveau-nés d'antisérum préparé à l'aide de lapin selon un procédé classique, afin de réduire une immunoréaction possible résultant de la transplantation cellulaire, on implante par voie sous-cutanée chez ces animaux une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire FCh a été introduite comme dans l'exemple 2, puis on les nourrit de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant environ 11 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour donner FCh, à ceci près que l'on remplace le milieu nutritif d'incubation RPMI 1640 par du milieu de Eagle (pH 7,2) contenant 20% en volume/volume de bouillon. La production de FCh est de l'ordre de 45 000 unités/ml de suspension cellulaire. L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1 par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains fusionnés JBL et abandon des cellules humaines multipliées pour qu'elles libèrent FCh. La production de FCh n'est que de l'ordre de 2100 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 4:

A des rats nouveau-nés on implante, par voie intraveineuse, une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Ball-1, dans laquelle l'aptitude à produire FCh a été introduite comme dans l'exemple 2, puis on nourrit les rats de manière habituelle, pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, environ 38 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour libérer FCh. La production de FCh est voisine de 42 000 unités/ml de suspension cellulaire. L'expérimentation témoin est réalisée par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains fusionnés Ball-1 et abandon des cellules humaines multipliées pour qu'elles libèrent FCh. La production de FCh n'est que de 1900 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 5:

Après avoir subi une irradiation de 400 rems environ de rayons X pour la réduction de l'immunoréaction, des souris adultes reçoivent par voie sous-cutanée des implants de cellules d'hépatoma humain obtenues comme dans l'exemple 1, puis on nourrit les souris de manière habituelle, pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant environ 15 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 3 pour libérer FCh. La production de FCh est d'environ 9600 unités/ml de suspension cellulaire. L'expérimentation témoin est réalisée par culture *in vitro* des cellules de carcinome du foie humain, et abandon des cellules humaines multipliées afin qu'elles libèrent FCh. La production de FCh n'est que de l'ordre de 280 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 6:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire FCh a été introduite comme dans l'exemple 3, est mise en suspension dans du sérum physiologique, puis le tout est transféré dans une chambre de diffusion cylindrique en matière plastique, dont le volume intérieur est de l'ordre de 10 ml, munie d'une membrane filtrante ayant une dimension de diamètre de pore voisine de 0,5 μ . Après inclusion par voie intrapéritonéale de cette chambre dans un rat adulte, on nourrit celui-ci de manière habituelle pendant 4 semaines, puis on enlève la chambre. La densité en cellules humaines dans la chambre atteinte au cours de l'opération ci-dessus est d'environ 2×10^9 cellules/ml, ce qui est environ 10³ fois supérieur ou même plus à ce qu'on atteint avec une culture *in vitro* à l'aide d'un incubateur à CO₂. Les cellules humaines ainsi obtenues sont traitées comme dans l'exemple 3 pour libérer FCh. La production de FCh est de l'ordre de 57 000 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 7:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Ball-1, dans laquelle l'aptitude à produire FCh a été introduite comme dans l'exemple 4, est implantée dans la cavité allantoïque d'œufs embryonnés, préalablement mis à incuber à 37°C pendant 5 d. Après incubation des œufs embryonnés à cette température pendant 1 semaine supplémentaire, les cellules humaines multipliées sont récoltées et traitées comme dans l'exemple 1 pour libérer FCh. La production de FCh est voisine de 35 000 unités/ml de suspension cellulaire.