

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 24363

(54) Production de facteur leucopoïétique humain.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 37/24; C 07 G 15/00; C 12 N 15/00.

(22) Date de dépôt..... 29 décembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Japon, 31 décembre 1980, n° 185732/1980.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 26 du 2-7-1982.

(71) Déposant : Société dite : KK HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO, résidant au
Japon.

(72) Invention de : Kaname Sugimoto.

(73) Titulaire : *Idem 71*

(74) Mandataire : Armand Kohn,
5, av. Foch, 92380 Garches.

La présente invention concerne un procédé pour la production de facteur leucopoïétique humain, ci-après désigné en abrégé par FLh.

Il est connu que FLh est une hormone stimulante, 5 qui active la différentiation des cellules de lignée humaine en leucocytes. Ces derniers temps, on a utilisé de plus en plus fréquemment l'irradiation et l'administration d'agents carcinostatiques pour le traitement des maladies malignes que l'on considère maintenant comme une des causes principales de décès ; mais ces thérapies aboutissent 10 inévitablement à une diminution indésirable du nombre des leucocytes et à un abaissement de la résistance physique du patient, ce qui rend, par voie de conséquence, la poursuite de ces thérapies très difficiles. L'utilisation de 15 FLh, en combinaison avec une ou plusieurs des thérapies indiquées plus haut, constituerait sans aucun doute un traitement plus efficace des maladies malignes, aussi bien que de la leucémie, maladie qui a été considérée comme incurable.

20 A ce jour, on connaît plusieurs voies possibles pour obtenir du FLh, comme par exemple sa récupération à partir de sécrétions humaines ou de certains tissus humains, par des procédés très compliqués ; ou la multiplication de cellules humaines productrices de FLh par culture in vitro de 25 tissus, dans un milieu de culture contenant les principes nutritifs nécessaires, ou bien la transplantation in vivo de ces cellules dans le corps d'un animal à sang chaud, préalablement immuno-supprimé avec de l'antisérum ou une substance supprimant l'immuno-réaction, suivie de la soumission 30 des cellules multipliées, résultantes, à l'induction ; mais toutefois, la préparation de FLh obtenue par l'un des procédés ci-dessus, est d'ordinaire immunologiquement inactive, et même lorsqu'elle est active, le taux de FLh y est extrêmement bas. En raison de ces inconvénients, 35 cette substance n'est pratiquement pas utilisée, en dépit du fait reconnu de sa grande potentialité.

La présente invention a pour objet la production eu quantités suffisantes de FLh homogène, en vue d' applications médicales comme utilisations cliniques et thérapeutiques. Elle est basée sur la constatation inattendue que la production de FLh, à partir de cellules d'hybridome formé par fusion de cellules humaines, capables de produire ce facteur, avec des lymphoblastoides humains, conduit habituellement à des rendements 2 à 10 fois supérieurs à ceux que l'on atteint avec des cellules productrices de FLh, seules ; lorsque ces cellules d'hybridome sont multipliées dans le corps d'un animal à sang chaud, leur production de FLh est égale à 2 à 50 fois, ou plus, celle que l'on obtient par multiplication des mêmes cellules par culture de tissus in vitro, ou à l'aide de cellules humaines, normales ou tumorales, capables de produire du FLh, cultivées in vivo ou in vitro.

Le nouveau procédé selon l'invention de production de FLh consiste à fusionner des lymphoblastoides humains avec toute cellule humaine capable de produire du FLh, à multiplier les cellules d'hybridome, par transplantation dans le corps d'un animal à sang chaud, ou en fournit à ces cellules, à l'aide d'un dispositif, le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud, puis à laisser les cellules d'hybridome, multipliées par l'un ou l'autre de ces procédés de multiplication, libérer le FLh. Le procédé, selon l'invention, de multiplication des cellules d'hybridome humain, aboutit à une production supérieure en FLh, n'exige que peu ou pas de milieu nutritif contenant du sérum coûteux, et il permet de maintenir plus facilement que dans le cas de la culture de tissu in vitro, la culture des cellules. En particulier, tous les lymphoblastoides humains, dotés de l'aptitude à produire du FLh, par fusion avec des cellules humaines productrices de FLh, peuvent être facilement multipliées par transplantation de ces cellules d'hybridome dans le corps d'un animal à sang

chaud, ou par leur mise en suspension dans une chambre de diffusion équipée pour recevoir le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud, l'animal étant alimenté de manière habituelle.

5 Ce procédé est également caractérisé par une multiplication des cellules plus stable et plus élevée, et par une production FLh par cellule, 2 à 10 fois, ou même plus, supérieure à celle que l'on obtient par des procédés classiques, comme celui qui consiste à transplanter des cellules humaines, normales ou tumorales, capables de produire du FLh, dans le corps d'un animal immuno-déficient, par exemple la souris nue, afin de réaliser *in vivo* la multiplication de ces cellules, puis à cultiver ces cellules pour produire le FLh.

15 Les cellules d'hybridome, utilisées conformément à l'invention, qui peuvent être obtenues par fusion de cellules humaines, capables de produire FLh avec des lymphoblastoides humains, par des modes opératoires bien connus, sont aptes à produire du FLh, et se multiplient facilement, lorsqu'on les transplante dans le corps d'un animal à sang chaud.

En ce qui concerne les cellules humaines, productrices de FLh, utilisables pour l'hybridation avec les lymphoblastoides humains, conformément à l'invention, conviennent toutes les cellules humaines dans la mesure où elles sont capables de produire ce facteur, sans que soit prise spécialement en considération leur origine. On peut, par exemple, utiliser avantageusement des cellules de poumon, rate ; cellules sanguines périphériques ; leucocytes, cellules de rein foetal, de glande sous-maxillaire, de moelle osseuse, lymphocytes-T ou -B, cellules placentaires ou utérines ; des cellules tumorales qui sont des cellules mentionnées plus haut, transformées par des virus, des agents carcinogènes ou des radiations ; des cellules de tumeurs malignes provenant de patients souffrant de carcinome du

poumon, leucémie, lymphome, carcinome de l'utérus, carcinome du rein ou carcinome gastrique ; ainsi que des lignées de cellules établies des cellules citées plus haut.

En ce qui concerne les lymphoblastoides auxquels 5 on transmet l'aptitude à produire FLh des cellules capables de produire ce facteur, comme décrit dans l'invention, on peut utiliser tout lymphoblastoïde humain s'il forme, avec les cellules productrices de FLh, des cellules d'hybridome capables de produire ce facteur. L'utilisation 10 d'une lignée de lymphoblastoides humains bien établie, qui peut être facilement repiquée, s'avère plus efficace pour la production à l'échelle industrielle de FLh, car cette lignée établie peut se multiplier plus rapidement, et présente en général une aptitude à produire FLh plus 15 sieurs fois ou plusieurs dizaines de fois supérieure. Comme la transplantation de la lignée bien établie de lymphoblastoides humains, mentionnée plus haut, dans le corps d'un animal à sang chaud aboutit à la formation d'une tumeur massive, et cette tumeur massive est difficilement 20 contaminée par les cellules de l'hôte animal, les lymphoblastoides humains, viables, multipliés, peuvent être facilement isolés de l'animal et désagrégés.

Conformément à l'invention, toutes les techniques de fusion conviennent pour la fusion des lymphoblastoides humains avec les cellules humaines, capables de produire du FLh, mentionnées plus haut ; on peut utiliser par exemple des procédés HVJ, tels que procédé de fusion parasite-erythrocyte, des procédés avec ribosome associé à des pointes de HVJ et des procédés avec addition de 30 HVJ, ainsi que le procédé utilisant du polyéthylène glycol.

Les sites génétiques, codant la production de FLh, peuvent être introduits dans les lymphoblastoides humains par des techniques de recombinaison de gène, au 35 moyen de ADN ligase, nucléase et ADN polymérase : on

obtient des résultats similaires à ceux que donne la technique de fusion cellulaire mentionnée plus haut.

Conviennent comme animaux utilisables dans le procédé selon l'invention tous ceux, dans lesquels les 5 cellules d'hybridome peuvent se multiplier, par exemple des volailles comme poulet et pigeon, des mammifères comme chat, chien, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, cobaye, rat, hamster, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immunoréaction 10 indésirable, il s'avère souhaitable d'utiliser des animaux nouveau-nés ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme œuf, embryon ou foetus. Afin de réduire l'immunoréaction, l'animal peut être traité, avant la transplantation des cellules, par irradiation aux 15 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 20 avantageusement sans prétraitement, pour y transplanter et y multiplier rapidement des lignées de cellules humaines établies.

Une multiplication cellulaire de l'hybridome, stabilisée, et une augmentation de la production de FLh, 25 peuvent être à la fois réalisées par transplantation répétée, utilisant des combinaisons de différents animaux à sang chaud : par exemple on peut implanter d'abord les cellules d'hybridome chez le hamster, où elles se multiplient, puis réimplanter les cellules d'hybridome multipliées chez un autre animal comme la souris nue. En outre, 30 on peut effectuer la transplantation successive chez des animaux de la même classe ou 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 d'hybridome conviennent tous les sites 35

de l'animal, pourvu que ces 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 d'hybridome au corps de l'animal, existe la possibilité de faire se multiplier aisément les lignées classiques de cellules d'hybridome, capables de produire FLh, 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 ultra-filtre ou de fibre creuse 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 d'hybridome. 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 d'hybridome 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 d'hybridome 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.

35 L'alimentation de l'hôte animal, auquel on a im-

planté des cellules d'hybridome, 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. Toutefois, lorsqu'on implante une lignée de cellules d'hybridome établi, la multiplication cellulaire maximale est atteinte en 1 à 5 semaines, après la transplantation, en raison des vitesses de multiplication cellulaires très élevées de ce type de lignée.

Conformément à l'invention on obtient 10^7 à 10^{12} , ou plus, de cellules d'hybridome par hôte. Autrement dit, le nombre de cellules d'hybridome 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 d'hybridome sont-elles avantageusement utilisables pour la production de FLh.

En ce qui concerne le procédé pour libérer FLh, on peut employer tout moyen permettant sa libération par les cellules d'hybridome, obtenues par le mode opératoire mentionné plus haut. Par exemple, les cellules d'hybridome, obtenues par multiplication en ascite, en suspension, et récolte à partir de cet ascite, ou par extraction de 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 par ml dans un milieu nutritif, maintenues à une température de l'ordre de 20°C à 40°C , puis/à ^{mises} incuber à cette température pendant 1 à quelques semaines. Afin d'augmenter la production de FLh par les cellules d'hybridome, on peut ajouter au milieu nutritif, mentionné plus haut, tout agent inducteur de ce facteur ; par exemple des agents bien connus comme ARN naturel à double brin ; ARN synthétique à double brin comme Poly I:C ; lipopolysaccharides

microbiens ; des mitogènes comme phytohemagglutinine, cancanavaline A, tuberculin (PPD), ou mitogène de phytolaque ; polymère chimiquement modifié comme sulfate de dextrane ; polymère synthétique comme copolymère de 5 pyranne ou acide polyacrylique ; différents composés cationiques à bas poids moléculaire ; différentes endotoxines ; et des composés du lithium comme Li_2CO_3 et LiCl .

Le FLh, 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 15 pureté supérieure par combinaison des techniques mentionnées plus haut avec d'autres modes opératoires classiques, tels qu'adsorption et désorption avec échange d'ions, fractionnement par poids moléculaire, chromatographie par affinité, fractionnement au point isoélectrique et électro- 20 phorèse.

Comme la préparation de FLh, ainsi obtenue, est identique aux points de vue immunologique et physiochimique, à celles que l'on obtient par des procédés classiques à partir de la culture de tissus humains, et elle est moins contaminée par les virus de l'hépatite ou les pyrogènes que les préparations obtenues à partir de sérum, 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 25 ou le traitement de maladies humaines.

Le dosage de la production de FLh, dans cette description, est réalisé conformément au procédé ^{/d'essai} utilisant des cellules de moelle osseuse de souris, décrit par S. Asano et coll. dans Br. J. Cancer, Vol. 41, pp. 689-694 35 (1980). Comme défini dans cet article, 1 unité de FLh forme

une colonie de 5×10^4 cellules de moelle osseuse de souris dans 0,1 ml d'échantillon de préparation d'essai.

Les exemples suivants illustrent quelques formes de réalisation du procédé selon l'invention ; en 5 aucune manière ils n'en limitent le cadre.

EXEMPLE 1

Des cellules de carcinome du poumon humain, haché et désagrégé, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant d'un carcinome du poumon et une lignée de lymphoblastoides leucémiques, humains, de Namalwa, sont 10 mises en suspension ensemble dans un récipient avec une solution saline de 140 mM de NaCl, 54 mM de KCl, 1 mM de NaH_2PO_4 et 2 mM de CaCl_2 , de manière à obtenir des concentrations cellulaires respectives de l'ordre de 10^3 15 cellules/ml. La suspension de cellules, refroidie à la glace, est mélangée avec une préparation fraîche de la même solution saline, contenant du virus de Sendai préalablement inactivé par irradiation à l'ultra-violet, le tout est transféré 5 minutes après le mélange dans un 20 incubateur à 37°C, et y est agité pendant 30 minutes pour réaliser la fusion cellulaire, introduisant l'aptitude à produire du FLh dans la lignée des lymphoblastoides leucémiques, humains. Après clonage selon un procédé classique de la lignée de cellules d'hybridome, capable de 25 produire le FLh, 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, formées dans les corps des hôtes animaux, sont extraites puis 30 mises en suspension dans une solution saline contenant de la trypsine, afin de les désagréger. Les cellules désagrégées sont lavées avec du milieu RPMI 1640, pH 7,2, additionné de 10% en volume/volume de sérum foetal bovin, et ensuite elles sont remises en suspension dans une préparation fraîche du même milieu, à une concentration de l'ordre de 1×10^5 35

cellules/ml, et mises à incuber à 37°C pendant 7 jours, afin de libérer le FLh, avec remplacement périodique du milieu par du milieu frais. A la fin de la période d'incubation, la suspension est traitée par les ultra-sons, 5 et la partie surnageante est essayée quant à sa teneur en FLh. Le taux de FLh est voisin de 2500 unités / ml de suspension.

L'expérimentation témoin est réalisée par traitement de cellules de carcinome du poumon humain, non fusionnées, 10 comme décrit plus haut pour la libération de FLh. La production de FLh n'est que de 120 unités/ml de suspension. En outre, la lignée de cellules d'hybridome mentionnée plus haut, et les cellules de carcinome du poumon, humain sont mises en suspension et à incuber séparément, in vitro, 15 dans du milieu RPMI 1640, pH 7,2 additionné de 10% en volume/volume de sérum foetal bovin, puis traitées séparément de manière identique à celle qui est décrite plus haut pour la libération de FLh. Les taux de FLh dans les milieux ne sont respectivement que de 95 et 85 unités/ 20 ml de suspension cellulaire, ce qui est même inférieur à ce qu'on atteint lors de l'expérimentation témoin mentionnée plus haut.

EXEMPLE 2

Après injection à des hamsters nouveau-nés d'antisérum, 25 préparé à l'aide de lapin selon un procédé classique, afin de réduire l'immunoréaction, on implante, par voie sous-cutanée, chez ces animaux, une lignée de lymphoblastoides leucémiques, humains, NALL-1 dans laquelle l'aptitude à produire FLh des lymphocytes-B humains a été introduite comme 30 dans l'exemple 1, puis on les nourrit de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives, résultantes, formées sous la peau, et pesant environ 9 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour libérer FLh. La production est de l'ordre de 3500 unités/ml de suspension cellulaire. 35

EXEMPLE 3

L'aptitude à produire FLh des cellules tumorales de la glande sous-maxillaire humaine, provenant d'un patient souffrant de cette tumeur, est introduite, conformément à la technique de fusion cellulaire décrite dans l'exemple 1, dans une lignée de lymphoblastoides leucémiques humains, JBL. Après clonage, selon un procédé classique, de la lignée de cellules d'hybridome capable de produire du FLh, on implante celle-ci, par voie intraveineuse, dans des rats nouveau-nés, que l'on nourrit de manière habituelle pendant 4 semaines. Les tumeurs massives, résultantes, pesant environ 37 g chacune, sont enlevées et traitées comme dans l'exemple 1 pour libérer FLh. La production est voisine de 2900 unités/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 4

On opère comme dans l'exemple 3, mais avec addition au milieu de culture de $10\mu\text{g}$ de phytohemagglutinine/ml. La production de FLh est voisine de 4500 unités/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 5

Une lignée de lymphoblastoides leucémiques, humains, TALL-1, est fusionnée avec des cellules de carcinome gastrique provenant d'un patient souffrant d'un carcinome de l'estomac, à l'aide d'une technique de fusion cellulaire classique, utilisant du polyéthylèneglycol. Après clonage, selon un procédé classique, de la lignée de cellules d'hybridome capable de produire du FLh, on transplante cette lignée, par voie sous-cutanée, dans des souris adultes dont l'immunoréaction a été supprimée par irradiation de 400 rems environ de rayons γ . Puis on nourrit les souris de manière habituelle, pendant 4 semaines. Les tumeurs massives, résultantes, formées sous la peau et pesant 15 g chacune, environ, sont extraites et traitées comme décrit dans l'exemple 1, pour libérer le

FLh. La production est d'environ 3500 unités/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 6

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, TALL-1 dans laquelle l'aptitude à produire du FLh, des cellules de carcinome humain, provenant d'un patient souffrant de cette maladie a été introduite par la technique de fusion cellulaire décrite dans l'exemple 5, 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 pore voisine de $0,5\mu$. 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 10^3 fois supérieur, ou même plus, à ce qu'on atteint avec une culture in vitro à l'aide d'un incubateur à CO_2 . Les cellules humaines, multipliées, ainsi obtenues, sont traitées comme dans l'exemple 1. La production de FLh est de l'ordre de 4200 unités/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 7

On reprend l'expérimentation de l'exemple 6, mais en ajoutant au milieu de cet essai, environ 5 μg d'ARN synthétique à double brin, Poly I:C. La production de FLh est de l'ordre de 7300 unités/ml de suspension.

EXEMPLE 8

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, de Namalwa, dans laquelle l'aptitude à produire du FLh a été introduite comme dans l'exemple 1, est implantée dans la cavité allantoïque d'oeufs embryonnés, préalablement mis à incuber à 37°C pendant 5 jours. Après incubation des

oeufs embryonnés à cette température, pendant 1 semaine supplémentaire, les cellules humaines, multipliées, sont récoltées et traitées comme dans l'exemple 1 pour induire le FLh, à ceci près qu'on ajoute au milieu environ 5 $10\mu\text{g}$ de tuberculine PPD. La production de FLh est voisine de 5700 unités/ml de suspension.

Revendications

1. Procédé pour la production du facteur leucopoïétique humain (FLh) par multiplication de cellules humaines, capables de le produire, suivie de libération de ce facteur à partir des dites cellules, caractérisé en ce qu'on utilise comme cellules productrices de FLh, des cellules d'un hybridome formé par fusion de lymphoblastoides humains avec des cellules humaines, capables de produire ce facteur.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les lymphoblastoides humains sont des lymphoblastoides leucémiques, de préférence de Namalwa, BALL-1, NALL-1, TALL-1 ou JBL.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire le FLh, fusionnées avec les lymphoblastoides humains, sont des cellules de carcinome du poumon, du rein ou de l'estomac.
4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les cellules humaines, capables de produire du FLh, fusionnées avec les lymphoblastoides humains, sont des lymphocytes-B ou des cellules tumorales de glande sous-maxillaire.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la multiplication cellulaire est réalisée par implantation des cellules d'hybridome dans le corps d'un animal à sang chaud.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, 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 d'hybridome humaines.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le dispositif est une chambre de diffusion équipée

15

de manière à ce que les cellules de l'hôte animal ne la contaminent pas.

8. Procédé selon une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la libération de FLh est réalisée en 5 présence de l'un ou de plusieurs des composés suivants : ARN naturel à double brin, ARN synthétique à double brin, lipopolysaccharide microbien, agent mitogène, polymère naturel chimiquement modifié, comme le sulfate de dextrane, polymère synthétique, composé cationique à bas 10 poids moléculaire, endotoxine et composé du lithium.

9. Procédé selon une des revendications 1 à 8, 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, la- 15 pin, rat, cobaye, hamster, souris ou souris nue.