



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 650 024 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 21/00
C 12 N 5/00
C 07 K 15/14

// (C 12 P 21/00, C 12 R 1:91)

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑲ Numéro de la demande: 5392/81	⑦③ Titulaire(s): Ken Hayashibara, Okayama-shi/Okayama (JP) Shin Ashida, Ashiya-shi/Hyogo (JP)
⑳ Date de dépôt: 21.08.1981	
③① Priorité(s): 25.08.1980 JP 55-115950	⑦② Inventeur(s): Sugimoto, Kaname, Okayama-shi/Okayama (JP) Hayashibara, Yasushi, Okayama-shi/Okayama (JP)
㉔ Brevet délivré le: 28.06.1985	
④⑤ Fascicule du brevet publié le: 28.06.1985	⑦④ Mandataire: Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

⑤④ Procédé pour la production d'érythropoïétine humaine.

⑤⑦ Pour produire l'érythropoïétine humaine, on multiplie in vivo des cellules lymphoblastoïdes, humaines, capables de produire l'érythropoïétine. Ces cellules lymphoblastoïdes, humaines, multipliées, produisent de l'érythropoïétine humaine. Les rendements en érythropoïétine humaine sont considérablement supérieurs à ceux que l'on obtient selon un procédé classique de culture tissulaire in vitro, et on peut donc disposer d'une quantité d'érythropoïétine humaine suffisante pour la prévention et le traitement d'affections humaines.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour produire de l'érythropoïétine humaine qui consiste à multiplier des cellules capables de produire de l'érythropoïétine humaine, caractérisé en ce que ces cellules sont des cellules lymphoblastoïdes humaines et que la multiplication a lieu par transplantation de ces cellules dans l'organisme d'un animal à sang chaud ou dans un dispositif permettant d'alimenter ces cellules en liquide nutritif de l'organisme d'un animal à sang chaud, les cellules lymphoblastoïdes humaines, multipliées, étant ensuite laissées libérer l'érythropoïétine humaine.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules lymphoblastoïdes humaines capables de produire l'érythropoïétine sont des cellules d'hybridome obtenues par fusion cellulaire d'une lignée lymphoblastoïde humaine, établie, avec des cellules humaines capables de produire l'érythropoïétine humaine.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire l'érythropoïétine humaine sont des cellules humaines de tumeur rénale.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cellules d'hybridome sont obtenues par fusion cellulaire avec emploi du virus Sendai.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la lignée lymphoblastoïde humaine établie est une lignée lymphoblastoïde leucémique humaine.

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

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on laisse les cellules lymphoblastoïdes humaines, multipliées, libérer l'érythropoïétine en présence d'un ou de plusieurs constituants d'un groupe comprenant une hormone mâle, notamment la testostérone et des ions métalliques, en particulier Co^{++} ou Ni^{++} .

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on laisse les cellules lymphoblastoïdes humaines, multipliées, libérer l'érythropoïétine humaine sous une pression réduite ou une atmosphère à teneur réduite en oxygène.

La présente invention concerne un procédé selon le préambule de la revendication 1.

L'érythropoïétine humaine est une hormone essentielle à la formation des érythrocytes, produite dans les cellules rénales humaines.

Bien qu'on connaisse des procédés classiques pour la production d'érythropoïétine humaine, tels qu'un procédé par récolte à partir de l'urine humaine (brevet US N° 3865801) et un procédé par culture tissulaire utilisant des cellules tumorales rénales humaines (demande de brevet japonais publiée non examinée N° 55790/79), ces deux procédés ne permettent pas la production en masse de l'érythropoïétine humaine par suite de la faible teneur en érythropoïétine humaine de l'urine humaine, dans le premier cas, et de la faible production d'érythropoïétine humaine par cellule et de la faible multiplication cellulaire, dans le second.

La titulaire a recherché des procédés pour la production en masse d'érythropoïétine humaine peu coûteuse. Ces efforts ont débouchés sur la découverte inattendue que des cellules lymphoblastoïdes humaines, capables de produire l'érythropoïétine humaine, se multiplient rapidement et ont une capacité de production par cellule de l'érythropoïétine humaine supérieure et que ces cellules conviennent donc à la production d'érythropoïétine humaine.

Le procédé du genre mentionné au début est donc caractérisé selon l'invention par la partie caractérisante de la revendication 1.

Le procédé de l'invention permet une production accrue d'érythropoïétine humaine, ne nécessite pas, ou bien moins, de milieu nutritif contenant un sérum coûteux pour la multiplication cellulaire et rend l'entretien du milieu de culture, pendant la multiplication cellulaire, bien plus facile que dans le cas d'une culture de tissu *in vitro*.

En particulier, on peut multiplier facilement toutes les cellules humaines capables de produire l'érythropoïétine humaine, en utilisant le liquide nutritif de l'organisme d'un animal à sang chaud, par transplantation de ces cellules dans l'organisme de l'animal ou mise en suspension de ces cellules dans une chambre de diffusion, conçue pour recevoir le liquide nutritif de l'organisme, l'animal étant alimenté de façon habituelle. Egalement, le procédé est caractérisé par une multiplication cellulaire plus stable et plus abondante et un accroissement de la production d'érythropoïétine humaine par cellule.

En ce qui concerne les cellules lymphoblastoïdes humaines pouvant être utilisées dans l'invention, on peut employer toute cellule produisant de l'érythropoïétine humaine et se multipliant facilement dans l'organisme d'un animal à sang chaud. Par exemple, on peut utiliser de façon avantageuse, selon l'invention, des cellules lymphoblastoïdes humaines dans lesquelles on a introduit les sites génétiques commandant la production d'érythropoïétine humaine de cellules rénales humaines normales, de cellules rénales ou hépatiques humaines transformées, provenant d'un patient atteint d'un carcinome du rein ou d'un carcinome du foie, ou de cellules humaines de carcinome du poumon produisant de l'érythropoïétine humaine ectopique, par fusion cellulaire avec emploi de polyéthylène glycol ou du virus Sendai, ou selon une technique de recombinaison génétique utilisant l'ADN-ligase, la nucléase et l'ADN-polymérase, et des cellules lymphoblastoïdes humaines produisant de l'érythropoïétine humaine ectopique. Comme l'emploi de ces cellules lymphoblastoïdes humaines provoque la formation d'une tumeur massive, facile à désagréger, lorsqu'on transplante ces cellules dans l'organisme d'un animal, et que cette tumeur est difficilement contaminée par les cellules de l'animal hôte, on peut recueillir facilement les cellules lymphoblastoïdes humaines vivantes multipliées.

En ce qui concerne les animaux à sang chaud convenant à l'invention, on peut utiliser tout animal, pourvu que les cellules lymphoblastoïdes humaines se multiplient dans son organisme. Par exemple on peut employer avantageusement des volailles telles que poussin ou pigeon, ou des mammifères comme chien, chat, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, cobaye, rat, hamster, souris et souris nue. Comme la transplantation des cellules lymphoblastoïdes humaines dans l'organisme de l'animal provoque une réaction immunitaire indésirable, l'emploi d'un animal nouveau-né ou très jeune ou à un stade le plus précoce possible, par exemple sous forme d'œuf, d'embryon ou de fœtus, est souhaitable. Pour réduire autant que possible la réaction immunitaire, on peut, avant la transplantation, traiter l'animal par irradiation avec des rayons X ou des rayons γ à raison d'environ 200 à 600 rems, ou par injection d'un antisérum ou d'un agent immunosuppresseur préparé selon un procédé classique. Comme les souris nues, utilisées en tant qu'animaux à sang chaud, présentent une réaction immunitaire plus faible, même lorsqu'elles sont adultes, on peut de façon pratique leur implanter des cellules lymphoblastoïdes humaines quelconques, pour qu'elles se multiplient rapidement dans leur organisme sans qu'un tel prétraitement soit nécessaire.

On peut effectuer une multiplication cellulaire stabilisée et accroître la production d'érythropoïétine humaine par transplantation répétée avec une ou plusieurs combinaisons d'animaux à sang chaud différents; par exemple on peut tout d'abord implanter les cellules au hamster, pour qu'elles s'y multiplient, et les réimplanter à la souris nue. De plus, on peut effectuer la transplantation répétée avec des animaux appartenant à la même classe ou à la même division, ainsi qu'à la même espèce ou au même genre.

On peut implanter les cellules lymphoblastoïdes humaines à un site quelconque de l'animal, pourvu qu'elles s'y multiplient; par exemple, on peut effectuer l'implantation dans la cavité allantoïde ou par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée.

En plus de la transplantation directe des cellules lymphoblastoïdes humaines dans l'organisme d'un animal, on peut, pour multiplier ces lignées de cellules lymphoblastoïdes humaines classiques quelconques capables de produire l'érythropoïétine humaine, utiliser le liquide nutritif de l'organisme d'un animal par introduction, par exemple par voie intrapéritonéale, dans l'organisme de cet animal, d'une chambre de diffusion classique de forme et de taille appropriées, munie d'une membrane filtrante poreuse, d'un ultrafiltre ou de fibres creuses ayant des pores d'environ 10^{-7} à 10^{-5} m de diamètre, empêchant la contamination de la chambre de diffusion par les cellules de l'animal hôte et permettant au liquide nutritif de l'organisme de l'animal d'alimenter les cellules. De plus, la chambre de diffusion peut être conçue, si nécessaire, de façon à pouvoir être placée, par exemple, sur l'animal hôte et permettre la circulation du liquide de l'organisme de l'animal dans la chambre, ainsi que l'observation de la suspension cellulaire dans la chambre par une ou plusieurs fenêtres latérales transparentes placées sur une ou plusieurs parois de la chambre, et pour pouvoir être remplacée et échangée par une chambre neuve; on accroît ainsi la production de cellules par hôte au cours de la période de vie de l'animal, sans avoir à sacrifier l'animal hôte.

De plus, lorsqu'on utilise une telle chambre de diffusion, comme les cellules lymphoblastoïdes humaines multipliées peuvent être facilement récoltées et qu'il ne se produit pas de réaction immunitaire, par suite de l'absence de contact direct entre les cellules lymphoblastoïdes humaines et les cellules de l'animal hôte, on peut utiliser comme animal hôte, selon l'invention, un animal à sang chaud quelconque, sans aucun traitement préalable pour réduire la réaction immunitaire.

On peut alimenter facilement de façon classique l'animal hôte, auquel on implante les cellules lymphoblastoïdes humaines, même après la transplantation des cellules, et aucun soin particulier n'est nécessaire.

On obtient la multiplication maximale des cellules environ 1 à 20 semaines et généralement 1 à 5 semaines après la transplantation cellulaire.

Selon l'invention, le nombre des cellules lymphoblastoïdes humaines obtenues par hôte est normalement compris entre environ 10^7 et 10^{12} ou plus. En d'autres termes, le nombre des cellules lymphoblastoïdes humaines transplantées à l'animal hôte s'accroît d'un facteur d'environ 10^2 à 10^7 ou plus, ce qui est supérieur d'environ 10^1 à 10^6 fois et plus à ce qu'on obtient par la méthode de culture tissulaire *in vitro* avec un milieu nutritif; les cellules peuvent donc être utilisées de façon appropriée pour la production d'érythropoïétine humaine.

En ce qui concerne le procédé selon lequel on permet aux cellules lymphoblastoïdes humaines de libérer l'érythropoïétine humaine, on peut utiliser tout procédé dans lequel les cellules lymphoblastoïdes humaines obtenues selon le mode opératoire décrit plus haut libèrent de l'érythropoïétine humaine. Par exemple, les cellules lymphoblastoïdes humaines multipliées obtenues par multiplication en suspension dans le liquide d'ascite et récoltées dans ce liquide, ou par extraction de la tumeur massive formée sous la peau, et récoltées après désagrégation de cette tumeur massive, sont mises en suspension à une concentration d'environ 10^4 à 10^8 cellules/ml dans un milieu nutritif, maintenues à une température d'environ 20 à 40° C, puis incubées à cette température pendant encore 1 à 50 h pour produire de l'érythropoïétine humaine. Dans ce cas, l'incubation de la suspension cellulaire sous une pression réduite d'environ 973 mbar ou moins, ou dans une atmosphère à teneur réduite en oxygène, dont 10% ou plus de l'air ont été substitués par un ou plusieurs autres gaz tels que l'azote ou le dioxyde de carbone, accroît encore la production d'érythropoïétine humaine. Egalement, on peut atteindre de façon efficace l'objectif visé, grâce à la présence d'une hormone mâle telle que la testostérone ou d'un cation métallique tel que Co^{++} ou Ni^{++} .

On peut facilement recueillir l'érythropoïétine humaine ainsi obtenue selon des techniques de purification et de séparation compre-

nant des opérations classiques telles que relargage, dialyse, filtration, centrifugation, concentration et/ou lyophilisation. Si on désire une préparation d'érythropoïétine humaine plus purifiée, on peut obtenir une préparation de pureté maximale par combinaison des techniques précitées avec d'autres opérations classiques telles qu'adsorption et désorption avec échange d'ions, filtration sur gel, chromatographie d'affinité, fractionnement au point isoélectrique et électrophorèse: on peut ainsi obtenir facilement une préparation d'érythropoïétine humaine de grande pureté, comme décrit par E. Goldwasser et coll., «The Journal of Biological Chemistry», vol. 252, pp. 5558-5564 (1977).

On peut de façon avantageuse utiliser la préparation d'érythropoïétine humaine seule ou en combinaison avec un ou plusieurs agents pour l'administration par injection, par voie externe ou interne, ou pour l'administration diagnostique, dans la prévention et le traitement de maladies humaines telles que l'anémie.

La production d'érythropoïétine humaine dans le milieu de culture est déterminée selon la méthode biologique utilisant l'incorporation de Fe^{59} comme décrit par P. Marry Cotes et coll., «Nature», N° 4793, pp. 1065-1067 (1961) et on l'exprime en unités d'érythropoïétine humaine, une unité correspondant au dixième de l'érythropoïétine humaine contenue dans un flacon du standard international distribué par l'Organisation mondiale de la Santé.

Plusieurs modes de réalisation non limitative de l'invention sont décrits ci-après.

Exemple 1

On met ensemble en suspension des cellules humaines de tumeur rénale désagrégée obtenues par extraction chez un patient atteint d'une tumeur du rein, et hachage, et des cellules lymphoblastoïdes leucémiques humaines de lignée Namalwa, dans un récipient avec une solution salée de concentration 140 mM en NaCl, 54 mM en KCl, 1 mM en NaH_2PO_4 et 2 mM en CaCl_2 , pour obtenir des concentrations de chaque type cellulaire d'environ 10^3 cellules/ml. On mélange la suspension cellulaire glacée avec une préparation fraîche du même milieu contenant du virus Sendai préalablement inactivé par irradiation par les ultraviolets; on transfère dans une étuve à 37° C environ 5 min après le mélange, et on agite dans l'étuve pendant 30 min, pour effectuer la fusion cellulaire et introduire la capacité de production d'érythropoïétine humaine des cellules humaines de tumeur rénale dans la lignée lymphoblastoïde leucémique humaine. Après clonage par le procédé classique de la souche de cellules d'hybridome capable de produire l'érythropoïétine humaine, on implante les cellules de cette souche d'hybridome, par voie intrapéritonéale, à des souris nues adultes, que l'on alimente de façon habituelle pendant 5 semaines. On extrait les tumeurs massives produites, pesant environ 15 g chacune, et on les désagrège par hachage et mise en suspension dans une solution salée physiologique contenant de la trypsine. Après lavage des cellules avec le milieu 199 de Earle (pH 7,2), additionné de 10% en volume de sérum de veau fœtal, on remet les cellules en suspension dans une préparation fraîche du même milieu, pour obtenir une concentration cellulaire d'environ 10^6 cellules/ml, et l'on incubé à 37° C pendant 20 h sous une pression réduite de 933 mbar pour produire l'érythropoïétine humaine. On traite ensuite les cellules par les ultrasons et on détermine l'érythropoïétine humaine dans le surnageant. La production d'érythropoïétine humaine est d'environ 170 unités/ml de suspension cellulaire.

On traite comme ci-dessus des cellules témoins obtenues par implantation des cellules humaines de tumeur rénale à des souris nues, alimentation des animaux de façon habituelle pendant 5 semaines, extraction des tumeurs massives formées sous la peau, pesant environ 5 g chacune, et désagrégation de ces tumeurs. La production d'érythropoïétine humaine n'est que d'environ 6 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 2

Après injection d'antisérum préparé avec un lapin selon un procédé classique à des hamsters nouveau-nés pour réduire leur réaction

immunitaire, on implante aux animaux par voie sous-cutanée la lignée lymphoblastoïde leucémique humaine JBL, à laquelle on a conféré la capacité de produire l'érythropoïétine humaine de cellules humaines de tumeur rénale comme dans l'exemple 1, puis on les alimente de façon habituelle pendant 5 semaines. On extrait les tumeurs massives sous-cutanées formées, pesant environ 10 g chacune, on les désagrége par hachage, et on les met en suspension dans une solution salée physiologique contenant de la collagénase. Après avoir lavé les cellules avec du milieu essentiel minimum de Eagle (pH 7,2) additionné de 5% en volume de sérum humain, on remet les cellules en suspension dans une préparation fraîche du même milieu, pour obtenir une concentration cellulaire d'environ 10^5 cellules/ml, et on incube à 35° C pendant 15 h sous une atmosphère dont on a remplacé 20% de l'air par du dioxyde de carbone pour laisser les cellules libérer l'érythropoïétine humaine. La production d'érythropoïétine humaine est d'environ 100 unités/ml de suspension cellulaire.

On traite comme ci-dessus des cellules témoins obtenues par implantation des cellules humaines de tumeur rénale à des hamsters nouveau-nés, alimentation des animaux de façon habituelle pendant 5 semaines, et extraction des tumeurs massives produites sous la peau, pesant environ 3 g chacune. La production d'érythropoïétine humaine n'est que d'environ 5 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 3

On implante par voie intraveineuse à des rats nouveau-nés la lignée lymphoblastoïde leucémique humaine BALL-1, à laquelle on a conféré, comme dans l'exemple 1, la capacité de produire l'érythropoïétine humaine des cellules humaines de tumeur rénale, puis on les alimente de façon habituelle pendant 4 semaines. On extrait les tumeurs massives formées, pesant environ 30 g chacune, et on les désagrége. Après avoir lavé les cellules avec le milieu RPMI 1640 (pH 7,4) additionné de 10% en volume de sérum fœtal de veau, on remet les cellules en suspension, pour obtenir une concentration cellulaire d'environ 10^7 cellules/ml dans une préparation fraîche du même milieu, puis on incube à 30° C pendant 40 h dans une atmosphère dont on a remplacé 30% de l'air par de l'azote pour laisser les cellules libérer l'érythropoïétine humaine. La production d'érythropoïétine humaine est d'environ 340 unités/ml de suspension cellulaire.

On traite comme ci-dessus des cellules témoins obtenues par implantation des cellules humaines de tumeur rénale à des rats nouveau-nés, alimentation des animaux de façon habituelle pendant 4 semaines, extraction des tumeurs massives produites, pesant chacune environ 5 g, et désagrégation des tumeurs. La production d'érythropoïétine humaine n'est que d'environ 9 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 4

On irradie des souris adultes avec environ 400 rems de rayons X, pour réduire leur réaction immunitaire et on leur implante, par voie sous-cutanée, la lignée lymphoblastoïde leucémique humaine NALL-1, à laquelle on a conféré, comme dans l'exemple 1, la capacité de production d'érythropoïétine humaine des cellules humaines

de tumeur rénale, puis on les alimente de façon habituelle pendant 3 semaines. On extrait les tumeurs massives formées sous la peau, pesant environ 15 g chacune, et on les traite comme dans l'exemple 1 pour obtenir une suspension cellulaire qu'on incube à 35° C pendant 20 h dans un incubateur à dioxyde de carbone, en vue de la production de l'érythropoïétine humaine. Cette production est d'environ 60 unités/ml de suspension cellulaire.

On traite comme ci-dessus des cellules témoins obtenues par implantation des cellules humaines de tumeur rénale à la souris, alimentation des animaux de façon habituelle pendant 3 semaines, extraction des tumeurs massives, pesant environ 5 g chacune, et désagrégation des tumeurs massives. La production d'érythropoïétine humaine n'est que d'environ 3 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 5

On met en suspension, dans une solution salée physiologique des cellules de la lignée lymphoblastoïde leucémique humaine TALL-1, auxquelles on a conféré, comme dans l'exemple 1, la capacité de production d'érythropoïétine humaine des cellules humaines de tumeur rénale, et on les transfère dans une chambre de diffusion cylindrique en matière plastique de volume intérieur d'environ 10 ml, munie d'une membrane filtrante ayant des pores d'environ 0,5 μ m de diamètre. Après insertion de la chambre dans le péritoine d'un rat adulte, on alimente l'animal de façon habituelle pendant 4 semaines, et on retire la chambre. On obtient une densité des cellules humaines dans la chambre d'environ 7×10^8 cellules/ml, ce qui est supérieur d'environ 10^2 fois ou plus à ce qu'on obtient par culture *in vitro* avec un incubateur à dioxyde de carbone. On traite les cellules humaines ainsi obtenues, comme dans l'exemple 3, pour produire de l'érythropoïétine humaine. La production d'érythropoïétine humaine est d'environ 420 unités/ml de suspension cellulaire.

On traite comme ci-dessus des cellules témoins obtenues par mise en suspension des cellules humaines de tumeur rénale dans du soluté salé physiologique, transfert de la suspension cellulaire dans la chambre de diffusion, introduction de la chambre dans le péritoine d'un rat adulte, alimentation de l'animal de façon habituelle pendant 4 semaines et récolte des cellules humaines multipliées (environ 10^7 cellules/ml). La production d'érythropoïétine humaine n'est que d'environ 12 unités/ml de suspension cellulaire.

Exemple 6

On implante dans la cavité allantoïde d'œufs embryonnés, que l'on a préincubés à 37° C pendant 5 d, des cellules de la lignée lymphoblastoïde leucémique humaine JBL, auxquelles on a conféré, comme dans l'exemple 3, la capacité de production de l'érythropoïétine humaine des cellules humaines de tumeur rénale. Après incubation des œufs à cette température pendant encore 1 semaine, on recueille les cellules lymphoblastoïdes humaines multipliées. On traite les cellules ainsi obtenues, comme dans l'exemple 2, pour produire de l'érythropoïétine humaine; cette production est d'environ 130 unités/ml de suspension cellulaire.

Dans l'expérience témoin, où on implante les cellules humaines de tumeur rénale, comme ci-dessus, dans la cavité allantoïde d'œufs embryonnés, on n'observe pas de multiplication cellulaire.