



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ **CH 650 023 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: 5391/81

⑦③ Titulaire(s):
Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku
Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)

⑳ Date de dépôt: 21.08.1981

③① Priorité(s): 27.08.1980 JP 55-116942

⑦② Inventeur(s):
Sugimoto, Kaname, 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 **Production d'hormone humaine stimulant les follicules.**

⑤⑦ Le procédé de production d'hormone de stimulation folliculaire humaine HSFh consiste à faire se multiplier in vivo, au moyen d'animaux à sang chaud, des cellules humaines capables de produire HSFh, puis à exposer les cellules ainsi multipliées à l'action d'un inducteur d'hormone de stimulation folliculaire.

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

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la production d'hormone humaine de stimulation folliculaire HSFh par multiplication de cellules humaines, capables de produire de la HSFh, et exposition des cellules multipliées à l'action d'un inducteur d'hormone de stimulation folliculaire, caractérisé en ce qu'on utilise un animal à sang chaud pour la multiplication cellulaire.

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

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la multiplication cellulaire est réalisée dans un dispositif à l'aide duquel le fluide corporel nutritif de l'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 une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules humaines, capables de produire de la HSFh, sont des cellules d'hybridome obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains, établis, avec des cellules humaines capables de produire de la HSFh.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on fait fusionner, avec la lignée de lymphoblastoïdes humains établis, des cellules d'adénome basophile humain.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains.

8. Procédé selon une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée de Namalwa ou JBL.

9. Procédé selon une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la fusion cellulaire est réalisée à l'aide de virus de Sendai.

10. Procédé selon une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire est un acide aminé, notamment lysine, arginine, tryptophane, leucine ou acide casamino; un sel minéral, en particulier chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, ou bien sulfate de magnésium; ou une hormone, comme une hormone lutéinisante.

11. Procédé selon une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'animal à sang chaud est une volaille, comme poulet ou pigeon, ou mammifère, notamment chien, chat, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, rat, cobaye, hamster, souris ou souris nue.

La présente invention concerne un procédé selon le préambule de la revendication 1, à savoir un procédé de production d'hormone humaine de stimulation folliculaire (ou follotropine), ci-après désignée en abrégé par HSFh.

La HSFh stimule la croissance de la spermatogenèse chez le mâle et la croissance des follicules ovariens et de la croissance des œstrogènes chez la femelle. A ce jour, il n'existe pas de procédé de production à l'échelle industrielle de HSFh à bas prix.

La présente invention est fondée sur la constatation inattendue que des cellules humaines, obtenues par multiplication de cellules humaines, capables de produire de la HSFh à l'aide d'un animal à sang chaud, présentent une aptitude à produire de la HSFh bien supérieure à celle des cultures de tissu *in vitro*, la production de HSFh par cellule étant jusqu'à 2 à 50 fois supérieure.

Le nouveau procédé selon l'invention est donc caractérisé par la partie caractérisante de la revendication 1. Le procédé peut consister à multiplier des cellules humaines, capables de produire de la HSFh, par transplantation de ces cellules dans le corps d'un animal à sang chaud ou en fournissant à ces cellules, à l'aide d'un dispositif, le

fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud, puis à exposer les cellules multipliées par l'un ou l'autre de ces procédés de multiplication à l'influence d'un inducteur d'hormone de stimulation folliculaire.

Le procédé selon l'invention, tout en aboutissant à une production supérieure de HSFh, n'exige que peu ou pas de milieu nutritif contenant du sérum coûteux pour la multiplication cellulaire et 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 de la HSFh, peuvent être facilement multipliées grâce à l'utilisation de fluide corporel nutritif provenant d'un animal à sang chaud, par transplantation des cellules 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 est également caractérisé par une multiplication des cellules plus stable et plus abondante et par une production supérieure de HSFh par cellule.

Convient toutes les cellules humaines, pourvu qu'elle produisent de la HSFh et se multiplient aisément dans le corps d'un animal à sang chaud; par exemple, les cellules humaines qui produisent par nature de la HSFh, comme les cellules basophiles humaines, provenant du lobe antérieur de l'hypophyse, ces cellules transformées par le virus EB ou par irradiation aux rayons X, ou les cellules d'adénome d'un patient souffrant d'adénome basophile de l'hypophyse; des cellules humaines de carcinome du poumon qui produisent de la HSFh ectopique, et les lignées de cellules établies des cellules humaines ci-dessus. L'utilisation de lignées de lymphoblastoïdes humains établis, facilement conservables, dotées de sites génétiques commandant la production de HSFh, au moyen de techniques de recombinaison génétique utilisant des enzymes comme l'ADN ligase, nucléase et l'ADN polymérase, ou au moyen de fusion cellulaire sous l'effet d'agents tels que polyéthylène glycol 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 HSFh par cellule étant alors de 2 à 10 fois (ou davantage) 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 vivantes de lymphoblastoïdes humains multipliés est facile.

Convient, comme animaux utilisables dans le procédé selon l'invention, tous les animaux 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, rat, hamster, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immunoréaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser des animaux nouveau-nés ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme oeuf, 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 rem ou par injection d'antisérum ou d'agent immunodépresseur préparés 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 HSFh 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 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 dans la mesure où des cellules peuvent 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 connues de cellules humaines établies, capables de produire de la HSFh, 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 filtrante, d'un ultrafiltre ou de fibre creuse ayant 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 dans l'hôte animal et permettre à son fluide corporel 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 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, implanté avec 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 HSFh.

En ce qui concerne le procédé pour induire la HSFh, on peut employer tout procédé, dans la mesure où les cellules humaines, obtenues par le mode opératoire mentionné plus haut, libèrent la HSFh. Par exemple, les cellules humaines, obtenues par multiplication en ascite en suspension et récoltées à partir de cette ascite ou par extraction de tumeur massive formée sous la peau, puis récoltées après désagrégation de la tumeur, sont mises en suspension pour atteindre une concentration de 10^4 à 10^8 cellules par millilitre dans un milieu nutritif, maintenues à une température de l'ordre de 20 à 40° C, puis soumises, à cette température, pendant 1 à 50 h à l'action d'un inducteur d'hormones de stimulation folliculaire.

Les inducteurs préférés d'hormone de stimulation folliculaire sont des aminoacides comme lysine, arginine, tryptophane, leucine et acide casamino; des sels minéraux comme chlorure de sodium, chlorure de potassium, chlorure de calcium et sulfate de magnésium, et des hormones comme l'hormone lutéinisante.

La production simultanée d'autres hormones humaines comme l'hormone lutéinisante humaine (en abrégé HLh) peut être réalisée.

La HSFh peut être recueillie facilement, grâce à des techniques de purification et de séparation utilisant des modes opératoires classiques, tels que relavage, dialyse, filtration, centrifugation, concentration et lyophilisation. Quand on souhaite un produit encore plus pur, on peut obtenir une préparation de pureté supérieure par com-

binaison des techniques mentionnées plus haut avec d'autres modes opératoires classiques, tels qu'adsorption et désorption avec échange d'ions, filtration sur gel, chromatographie par affinité, fractionnement au point isoélectrique et électrophorèse.

La préparation de HSFh, ainsi obtenue, 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.

Au cours de la présente description, la production de HSFh est dosée par le procédé de radio-immuno essai décrit par C. Faiman, R.J. Ryan, «J. Clin. Endocrinol. Metab.» vol. 27, pp. 444-447 (1967) et est exprimée en unités internationales (UI). La production simultanée de HLh est dosée par le procédé de radio-immuno essai décrit par A.R. Midgley, jr., «Endocrinology», vol. 79, pp. 10-18 (1966) et est exprimée en unités internationales.

L'invention est illustrée ci-après par plusieurs formes de réalisation non limitatives.

Exemple 1

Des cellules d'adénome basophile humain désagrégé, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant d'adénome basophile de l'hypophyse, suivie de hachage, sont implantées par voie sous-cutanée dans des souris nues adultes, qui sont ensuite nourries de manières habituelle pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes formées sous la peau, pesant chacune environ 10 g, sont extraites, désagrégées par hachage et mises en suspension dans du sérum physiologique, contenant de la trypsine. Après lavage des cellules avec du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum fœtal de veau, les cellules sont remises en suspension, à une concentration de 10^5 cellules/ml, dans une préparation fraîche du même milieu, qui contient, en tant qu'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire, 30 mM de L-arginine, et l'on met à incuber à 37° C pendant 15 h environ pour obtenir la HSFh. Les cellules sont ensuite soumises aux ultra-sons, et la quantité de HSFh présente dans la partie surnageante est dosée. La production de HSFh est d'environ 500 mUI/ml de suspension cellulaire. La production simultanée de HLh dans la partie surnageante est de l'ordre de 400 mUI/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues par culture *in vitro* de cellules d'adénome basophile, humain, dans du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum fœtal de veau, et mis à incuber à 37° C, sont traitées comme plus haut, pour induire la formation de HSFh. Cette production n'est que voisine de 80 mUI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 2

Des cellules d'adénome basophile humain désagrégé, obtenues comme dans l'exemple 1, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa sont mises ensemble en suspension dans un récipient avec une solution saline contenant 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 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'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 le fusionnement cellulaire, introduisant l'aptitude à produire la HSFh des cellules d'adénome basophile humain dans la lignée des lymphoblastoïdes leucémiques humains. Après clonage selon un procédé classique de la souche de cellules d'hybridome, capable de produire la HSFh, 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 15 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour induire la HSFh, mais on remplace les 30 mM de L-arginine par environ 10 ng d'hormone lutéinisante. La production de HSFh est d'environ 1600 mUI/ml de suspension cellulaire.

La production simultanée de HLh est de l'ordre de 1400 mUI/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 de Namalwa et par exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire. La production de HSFh n'est que de 80 mUI/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, on implante par voie sous-cutanée chez ces animaux une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de la HSFh des cellules d'adénome basophile humain 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 10 g chacune sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour induire la HSFh. La production de HSFh est de l'ordre de 1500 mUI/ml de suspension cellulaire.

La production simultanée de HLh est de l'ordre de 1300 mUI/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 par exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire. La production de HSFh n'est que d'environ 110 mUI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 4

A des rats nouveau-nés sont implantés, par voie intraveineuse, des cellules d'une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa, dans laquelle l'aptitude à produire de la HSFh des cellules d'adénome basophile humain a été introduite comme dans l'exemple 2, puis les rats sont nourris de manière habituelle, pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, pesant environ 40 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 2 pour induire la HSFh. La production de HSFh est voisine de 1200 mUI/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 de Namalwa et par exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire. La production de HSFh n'est que de 80 mUI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 5

Après avoir subi une irradiation de 400 rem environ de rayons X, afin de réduire leur immunoréaction, des souris adultes reçoivent des implants (par voie sous-cutanée) de cellules d'adénome basophile humain, obtenues comme dans l'exemple 1; 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 2 pour induire la HSFh. La production de HSFh est d'environ 500 mUI/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est réalisée, comme dans l'exemple 1, par culture *in vitro* des cellules d'adénome basophile humain et par exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire. La production de HSFh n'est que de l'ordre de 80 mUI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 6

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de la HSFh des cellules d'adénome basophile humain 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 dont les pores ont une dimension 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 10^3 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 2 pour induire la HSFh. La production de HSFh est de l'ordre de 1300 mUI/ml de suspension cellulaire.

La production simultanée de HLh est voisine de 1600 mUI/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est réalisée, comme dans l'exemple 1, par culture *in vitro* d'une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains fusionnés JBL et par exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire. La production de HSFh n'est que de l'ordre de 110 mUI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 7

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de la HSFh des cellules d'adénome basophile humain a été introduite comme dans l'exemple 3, 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 induire la HSFh. La production de HSFh est voisine de 1300 mUI/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 par exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de stimulation folliculaire. La production de HSFh n'est que d'environ 110 mUI/ml de suspension cellulaire.