



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 651 062 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 12 N 9/72

// (C 12 N 9/72, C 12 R 1:91)

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

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

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 7640/81	㉚ Titulaire(s): Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)
㉒ Date de dépôt: 30.11.1981	
㉔ Priorité(s): 05.12.1980 JP 55-171588	㉞ Inventeur(s): Sugimoto, Kaname, Okayama-shi/Okayama (JP)
㉖ Brevet délivré le: 30.08.1985	
㉘ Fascicule du brevet publié le: 30.08.1985	㉜ Mandataire: Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

⑤④ Procédé pour la production d'urokinase humaine.

⑤⑦ Procédé de production d'urokinase humaine, à partir de cellules capables d'en produire.

Il consiste à faire se multiplier in vivo, au moyen d'animaux à sang chaud, des cellules humaines capables de produire cette enzyme, puis à exposer les cellules, ainsi multipliées, à l'action d'un inducteur d'urokinase humaine.

Les rendements en cette enzyme 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'urokinase humaine, par multiplication de cellules humaines, capables de produire cette enzyme, exposition des cellules multipliées à l'action d'un inducteur d'urokinase humaine, et séparation de l'urokinase produite, caractérisé en ce qu'on utilise des cellules humaines qui se multiplient aisément dans le corps d'un animal à sang chaud, et que l'on transplante des cellules, en vue de multiplication, dans le corps d'un animal à sang chaud, ou bien dans une chambre de diffusion placée dans le corps d'un tel animal.

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

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la souche de cellules humaines, capables de produire l'urokinase, est une lignée du rhabdomyosarcome humain.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la souche de cellules humaines, capable de produire l'urokinase, est une lignée du carcinome du poumon humain.

5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains.

6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée de Namalwa ou JBL.

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'inducteur d'urokinase humaine est un saccharide, notamment glucose, inositol, ribose ou désoxyribose ou une hormone comme adrénaline.

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

L'urokinase (EC 3.4.99.26) est une enzyme que l'on trouve dans l'urine des mammifères, et qui catalyse le clivage du plasminogène (ou profibrinolyse) en plasmine (ou fibrinolyse). Comme différentes thromboses dominent dans les statistiques annuelles de mortalité, l'utilité d'agents renfermant de l'urokinase croît d'année en année. Bien que l'on connaisse des procédés classiques pour la production d'urokinase humaine, comme celui qui consiste à la recueillir à partir de l'urine humaine à l'aide de flocculants ou d'absorbants, ou bien par culture continue de cellules de rein humain en présence d'un inducteur d'urokinase, on ne connaît pas de procédé de production massive d'urokinase humaine à faible coût.

Il est connu de la technique antérieure, d'une part, un procédé de multiplication de cellules humaines dans un corps d'animal à sang chaud (FR-A N° 2414920) et, d'autre part, l'utilisation d'acides aminés pour l'induction de l'urokinase (FR-A N° 2306263, EP-A N° 0005644). Il faut cependant remarquer que l'obtention de l'interféron par le procédé de multiplication susmentionné ne signifiait nullement que ce procédé pourrait également s'appliquer à la production d'enzymes, en particulier de l'urokinase.

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

Le procédé selon l'invention est donc caractérisé par la partie caractérisante de la revendication 1.

Le procédé selon l'invention, tout en aboutissant à une production supérieure en urokinase, n'exige que peu ou pas de milieu nutri-

tif 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 l'urokinase, 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 est également caractérisé par une multiplication des cellules plus stable et plus poussée, et par une production supérieure d'enzymes par cellule.

Conviennent, conformément à l'invention, toutes les cellules humaines, à condition qu'elles produisent l'urokinase et se multiplient aisément dans le corps d'un animal à sang chaud: par exemple des cellules de rein normal ou des cellules fibroblastes du poumon, ces cellules transformées par irradiation ou par virus; des cellules de carcinome du foie, de carcinome de la vésicule, de carcinome épidermoïde, de carcinome du poumon; des cellules de fibrome; des cellules de rhabdomyosarcome et de sarcome du mésenchyme; ainsi que des lignées de cellules établies des cellules ci-dessus. L'utilisation de lignées de lymphoblastoïdes humains, faciles à conserver, dotées de sites génétiques commandant la production d'urokinase au moyen de techniques de recombinaison génétique utilisant des enzymes comme ADN ligase, nucléase et ADN polymérase, et au moyen de fusion cellulaire, utilisant des 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 l'enzyme 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, mentionnées 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.

Conviennent comme animaux utilisables dans le procédé selon l'invention tous ceux dans lesquels les cellules peuvent se multiplier, par exemple des volailles comme poulet et pigeon, des mammifères tels que 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 nouveau-nés 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 d'urokinase humaine 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, pourvu que les cellules puissent s'y multiplier, par exemple la cavité allantoïque, ou les voies intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

À 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, capables de produire l'urokinase, 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 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.

Conformément à l'invention 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 d'urokinase humaine.

En ce qui concerne le procédé pour induire cette enzyme, on peut employer tout moyen permettant sa libération par les cellules humaines. Par exemple, les cellules humaines, obtenues par multiplication en ascite, en suspension, et récoltées à partir de cet ascite, ou obtenues par extraction de tumeur massive, formée sous la peau, et récoltées 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, préchauffé à une température de l'ordre de 20 à 40 °C, puis soumises à cette température pendant plusieurs heures ou jours, à l'action d'un inducteur d'urokinase humaine.

Les inducteurs préférés d'urokinase sont des aminoacides comme glycine et phénylalanine; des saccharides comme glucose, inositol, ribose et désoxyribose, et des hormones comme l'adrénaline. Au cours de l'induction de l'urokinase humaine, la stabilisation de l'enzyme libérée et l'augmentation de sa production peuvent être réalisées à la fois par addition d'un stabilisant et/ou d'un agent tel que pronase (EC 3.4.24.4) ou d'alcaloïdes.

L'urokinase humaine ainsi obtenue peut être recueillie 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 désorption avec échange d'ions, filtration sur gel, chromatographie par affinité, fractionnement au point isoélectrique et électrophorèse.

La préparation d'urokinase humaine, conforme à l'invention, est immunologiquement identique à celle qui provient de l'urine humaine, et elle n'est pas contaminée avec des pyrogènes ou des virus d'hépatite. Par conséquent, elle peut être avantageusement utilisée, seule ou en combinaison avec un ou plusieurs agents, par exemple hormone stéroïde, anticoagulant ou agent antitumoral, pour injection, administration, pour la prévention et le traitement de maladies humaines.

Au cours de la présente description, l'activité fibrinolytique de l'urokinase humaine est dosée par le procédé d'essai de plaquette de fibrine, décrit par Ploug et coll. dans «Biochem. Biophys. Acta», vol. 24, p. 278 (1957) et exprimée en UI (unités internationales).

L'invention est illustrée ci-après par plusieurs réalisations non limitatives.

Exemple 1:

A des souris adultes nues, on implante par voie sous-cutanée une lignée de rhabdomyosarcome humain TE-32RD, puis on nourrit ces animaux de manière habituelle pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant environ 10 g chacune, sont extraites et désagrégées par hachage et mise en suspension dans du sérum physiologique contenant de la trypsine. Après lavage des cellules avec du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionnée de 10% en volume/volume de sérum fœtal de veau, les cellules sont remises en suspension, à une concentration de 10^5 cellules/ml environ, dans une préparation fraîche du même milieu qui contient en tant qu'inducteur d'urokinase 50 mM de L-glycine, et l'on met à incuber à 37 °C pendant 10 d pour obtenir l'urokinase humaine. Les cellules sont ensuite soumises aux ultrasons et l'activité fibrinolytique dans la partie surnageante est dosée. La production d'urokinase est de l'ordre de 4000 UI/ml de suspension cellulaire.

On traite de manière similaire, pour obtenir de l'urokinase humaine, des cellules témoins obtenues par culture *in vitro* d'une lignée de rhabdomyosarcome humain à 37 °C, avec un milieu de Parker 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum fœtal de veau. La production d'urokinase n'est que de 750 UI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 2:

La lignée de rhabdomyosarcome humain TE-32RD et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa sont mises ensemble en suspension 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 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 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 de l'urokinase humaine de la lignée du rhabdomyosarcome humain, dans la lignée des lymphoblastoïdes leucémiques humains. Après clonage selon un procédé classique de la souche de cellules d'hybride, capable de produire l'urokinase, on l'implante par voie intrapéritonéale chez des souris adultes nues, 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 l'urokinase humaine, à ceci près que l'on remplace les 50 mM de L-glycine par 0,1% en poids/volume de phénylalanine et 0,1% en poids/volume de glucose. La production d'urokinase est d'environ 12 000 UI/ml de suspension cellulaire. L'expérimentation témoin est effectuée comme dans l'exemple 1, par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, fusionnées, de Namalwa, et exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'urokinase. La production d'urokinase humaine n'est que d'environ 1000 UI/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 l'urokinase de la lignée de carcinome du poumon humain A-549 a été introduite comme dans l'exemple 2; 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 l'urokinase humaine. La production d'urokinase est voisine de 14 000 UI/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 exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'urokinase humaine. La production d'urokinase n'est que de 900 UI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 4:

A des rats nouveau-nés on implante, par voie intraveineuse, une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa, dans laquelle l'aptitude à produire de l'urokinase humaine de la lignée du rhabdomyosarcome humain TE-32RD a été introduite, comme dans l'exemple 2; puis on nourrit les rats de manière habituelle, pendant 4 semaines. Les tumeurs massives, résultantes, environ 40 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 2 pour induire l'enzyme. La production d'urokinase humaine est voisine de 12 000 UI/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 exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'urokinase. La production d'enzyme n'est que de 600 UI/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 lignée de rhabdomyosarcome humain TE-32RD; puis on les nourrit 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 1, pour induire l'urokinase. La production d'enzyme humaine est d'environ 5000 UI/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1 par culture *in vitro* de la lignée du rhabdomyosarcome humain, et exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'urokinase. La production d'enzyme n'est que de l'ordre de 800 UI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 6:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains, JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de l'urokinase humaine de la lignée de carcinome du poumon humain A-549 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 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 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 l'urokinase. La production en urokinase humaine est de l'ordre de 21 000 UI/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 exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'urokinase humaine. La production d'enzyme n'est que de l'ordre de 900 UI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 7:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains, JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de l'urokinase humaine de la lignée de carcinome du poumon humain A-549 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 2 pour induire l'enzyme. La production d'urokinase est voisine de 8500 UI/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 exposition des cellules humaines multipliées à l'action de l'inducteur d'urokinase. La production d'enzyme n'est que d'environ 900 UI/ml de suspension cellulaire.