



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 652 748 A5

⑯ Int. Cl.⁴: C 12 P 21/02
C 07 K 7/36
C 12 N 15/00
C 12 N 5/02

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

**// A 61 K 37/24 (C 12 P 21/02,
C 12 R 1:91)**

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑯ Numéro de la demande: 8192/81

⑬ Titulaire(s):
Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku
Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)

⑯ Date de dépôt: 22.12.1981

⑭ Inventeur(s):
Sugimoto, Kaname, Okayama-shi/Okayama (JP)

⑯ Brevet délivré le: 29.11.1985

⑯ Mandataire:
Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

⑮ Production d'hormone parathyroïdienne humaine.

⑯ Le procédé de production d'hormone parathyroïdienne, humaine, HPT, consiste à faire se multiplier *in vivo*, au moyen d'animaux à sang chaud, des cellules lymphoblastoïdes humaines, capables de produire HPT, puis à laisser ces cellules, ainsi multipliées, libérer cette hormone.

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

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la production d'hormone parathyroïdienne humaine HPT_h, par multiplication de lymphoblastoïdes humains, capables de produire cette hormone et libération de celle-ci par les cellules multipliées, caractérisé en ce qu'on utilise, pour la multiplication cellulaire, un animal à sang chaud.

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

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

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

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on laisse les lymphoblastoïdes humains multipliés libérer HPT_h, en présence d'un ou de plusieurs des produits suivants: glycine, leucine, lysine, arginine, cystéine, chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, sulfate de magnésium, dopamine, isoprotérénol, épinephrine et norépinéphrine.

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

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

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire HPT_h sont des cellules de tumeur parathyroïdienne, de tumeur rénale, de tumeur ovarienne ou de carcinome du poumon.

9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les lymphoblastoïdes leucémiques, humains sont de la lignée de Namalva, Ball-1, Nall-1, Tall-1 ou JBL.

La présente invention concerne un procédé selon le préambule de la revendication 1, à savoir un procédé pour la production d'hormone parathyroïdienne, humaine, ci-après désignée en abrégé par HPT_h.

HPT_h est une hormone sécrétée par les glandes parathyroïdes, qui règle la synthèse de la vitamine D₃ activée, stimule la libération du calcium à partir de l'os et conduit à un accroissement du taux de calcium dans le sang. A ce jour, il n'existe pas de procédé de production à l'échelle industrielle de HPT_h à bas prix.

La présente invention est fondée sur la constatation inattendue que certains lymphoblastoïdes humains capables de produire HPT_h conviennent pour la production industrielle de cette hormone, en raison de leur très fort pouvoir de multiplication et de leur production très élevée de HPT_h par cellule.

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

Le procédé selon l'invention, tout en aboutissant à une production supérieure en HPT_h, n'exige que peu ou pas de milieu nutritif contenant du sérum coûteux pour la multiplication cellulaire, et il permet de maintenir, plus facilement que dans le cas de la culture de

tissu *in vitro*, le milieu de culture au cours de la multiplication cellulaire. En particulier, tous les lymphoblastoïdes humains capables de produire HPT_h peuvent être facilement multipliés, grâce à l'utilisation de fluide corporel nutritif, provenant d'un animal à sang chaud, par transplantation des cellules en question dans le corps de l'animal, ou par leur mise en suspension dans une chambre de diffusion équipée pour recevoir le fluide corporel nutritif, l'animal étant alimenté de manière habituelle. Ce procédé donne en plus une multiplication des cellules plus stable et plus élevée et une production supérieure de HPT_h par cellule.

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

Conviennent tous les lymphoblastoïdes humains dans la mesure où ils produisent HPT_h et se multiplient rapidement dans le corps d'un animal à sang chaud. Les lymphoblastoïdes humains préférés sont ceux qui sont dotés de sites génétiques commandant la production d'HPT_h des cellules humaines, produisant par nature cette hormone, comme les cellules parathyroïdiennes normales ou transformées, ou des cellules humaines qui produisent de l'HPT_h ectopiques comme les cellules du carcinome du poumon, des tumeurs ovariennes, du carcinome du rein ou du foie, lesdits sites étant introduits au moyen de la fusion cellulaire, obtenue à l'aide de poly-éthylèneglycol, ou par une technique de recombinaison génétique utilisant ADNligase, nucléase et ADNpolymérase; conviennent aussi d'autres lymphoblastoïdes humains produisant de l'HPT_h ectopique. Comme la transplantation au corps de l'animal de ces lymphoblastoïdes humains 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 tous ceux dans lesquels les cellules peuvent se multiplier, par exemple des volailles comme poulet et pigeon, des mammifères comme chat, chien, singe, chèvre, porc, vache, cheval, rat, cobaye, hamster, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immunoréaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser des animaux nouveaux ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme œuf, embryon ou fœtus. Afin de réduire autant que possible l'immunoréaction, l'animal peut être traité, avant la transplantation des cellules, par irradiation aux rayons X ou au 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 lymphoblastoïdes humains capables de produire HPT_h.

Une multiplication cellulaire stabilisée et une augmentation de la production d'HPT_h 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 les 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 lymphoblastoïdes humains, conviennent tous les sites de l'animal, pourvu que ces cellules puissent s'y multiplier, par exemple la cavité allantique, ou les voies intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

A côté de cette transplantation directe des cellules au corps de l'animal existe la possibilité de faire se multiplier aisément les lignées classiques de lymphoblastoïdes humains, capables de produire HPT_h, en utilisant le fluide corporel nutritif provenant de l'animal, grâce à l'inclusion, par exemple par voie intrapéritonéale, dans le corps de l'animal d'une chambre de diffusion classique, de taille et de forme appropriées, munie d'une membrane poreuse filtrante, d'un ultrafiltre ou de fibres creuses d'un diamètre de pore de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-5} m, qui empêche la contamination de la chambre de

diffusion par les cellules de l'hôte tout en permettant l'apport du fluide corporel nutritif de l'animal aux cellules. De plus, comme la chambre de diffusion peut être conçue, si nécessaire, pour être placée sur l'hôte animal et permettre au fluide corporel de ce dernier de circuler dans la chambre, les parois de celle-ci peuvent être munies de fenêtres latérales, transparentes, permettant l'observation de la suspension de cellules, ainsi que le remplacement et l'échange avec une chambre fraîche; la multiplication cellulaire est ainsi augmentée à un niveau encore supérieur, rapporté à la durée de vie de l'animal, et la production par animal est encore accrue sans sacrifice de l'hôte. Lorsqu'on utilise cette chambre de diffusion, comme les lymphoblastoïdes humains multipliés peuvent être facilement récoltés, 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, généralement 1 à 5 semaines, après l'implantation des cellules.

On peut obtenir 10^7 à 10^{12} ou plus de lymphoblastoïdes humains 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 lymphoblastoïdes humains sont-ils avantageusement utilisables pour la production d'HPTTh.

En ce qui concerne le procédé grâce auquel les lymphoblastoïdes humains, multipliés par l'un des modes opératoires décrits plus haut, peuvent libérer HPTTh, on peut employer tout moyen permettant la libération d'HPTTh à partir de ces cellules. Par exemple, les lymphoblastoïdes humains, obtenus par multiplication en ascite, en suspension et récolte à partie de cet ascite, ou par extraction de tumeur massive formée sous la peau, et récolte après désagrégation de la tumeur, sont mis 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 mis à incuber à cette température pendant 1 à 100 h environ pour donner HPTTh.

L'augmentation de la production d'HPTTh peut être réalisée par la présence d'un ou de plusieurs des composés suivants: aminoacides comme lysine, arginine, glycine, leucine et cystéine, sels minéraux comme chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, et sulfate de magnésium, et hormones comme dopamine, isoprotérolé, épinephrine et norépinéphrine.

L'HPTTh 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. Quant 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'HPTTh 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 d'HPTTh est dosée par le procédé de bio-essai décrit par J.A. Parsons et coll., «Endocrinology», vol. 92, pp. 454-462 (1973); elle est exprimée en poids par rapport à la préparation étalon de HPTTh, 1300 unités USP/mg étant attribués à cet étalon disponible au National Institute of Health (USA).

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

Exemple 1:

Des cellules de tumeur parathyroïdienne humaine désagrégée, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant de tumeur parathyroïdienne, suivie de hachage, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa sont mises en suspension ensemble dans un récipient avec une solution saline de 140 mM de NaCl, 54 mM de KCl, 1 mM de NaH₂PO₄ et 2 mM de CaCl₂, de manière à obtenir des concentrations cellulaires respectives de l'ordre de 10^4 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 la fusion cellulaire, introduisant l'aptitude à produire l'HPTTh des cellules de tumeur parathyroïdienne humaine dans la lignée des lymphoblastoïdes leucémiques humains. Après clonage selon un procédé classique de la souche de cellules d'hybridome capable de produire l'HPTTh, 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, désagrégeées par hachage, et soumises à l'action de la trypsin. Après lavage 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 30 mM de L-arginine et 20 mM de CaCl₂, et l'on met à incuber à 37°C pendant 40 h environ pour obtenir HPTTh. Les cellules sont ensuite soumises aux ultrasons, et la quantité d'HPTTh présente dans la partie surnageante est dosée. La production d'HPTTh est d'environ 830 ng/ml de suspension cellulaire. Les cellules témoins, obtenues par culture *in vitro* de cellules de tumeur parathyroïdienne humaine dans du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum fœtal de veau, sont traitées comme plus haut pour produire HPTTh. Cette production n'est que voisine de 4 ng/ml de suspension cellulaire.

Exemple 2:

Des cellules de carcinome du rein humain désagrégé, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant de carcinome du rein, suivie de hachage, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL sont fusionnées comme dans l'exemple 1; on a introduit ainsi l'aptitude à produire de l'HPTTh des cellules du carcinome du rein humain dans la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains. Après clonage, selon un procédé classique, de la source de cellules d'hybridome capable de produire HPTTh, on l'implante par voie sous-cutanée chez des hamsters nouveau-nés, ayant préalablement reçu par injection de l'antisérum préparé à partir d'un lapin par le procédé classique, pour réduire leur immunoréaction, puis les animaux sont nourris de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant environ 10 g chacune, sont extraites et désagrégeées par hachage et mises en suspension dans du sérum physiologique contenant de la collagénase. Après lavage avec du milieu de Earle (pH 7,4) additionné de 5% volume/volume de sérum humain, les cellules sont remises en suspension à la concentration de l'ordre de 10^6 cellules/ml dans une préparation fraîche du même milieu, contenant 20 mM de CaCl₂ et 20 mM de dopamine; on met alors à incuber à 37°C pendant 20 h pour produire l'HPTTh. La production de cette hormone est de l'ordre de 1,3 µg/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues comme dans l'exemple 1 par culture *in vitro* de lignée fusionnée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, sont traitées comme plus haut. La production d'HPTTh n'est que de 16 ng/ml de suspension cellulaire.

Exemple 3:

A des rats nouveau-nés on implante, par voie intraveineuse, une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Ball-1, dans laquelle l'aptitude à produire de l'HPTTh de cellules de tumeur ovarienne humaine a été introduite comme dans l'exemple 1, puis on nourrit les rats de manière habituelle pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, environ 30 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour produire HPTTh. La production est voisine de 900 ng/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 Ball-1 et traitement des cellules comme plus haut. La production d'HPTTh n'est que de 10 ng/ml de suspension cellulaire.

Exemple 4:

Après qu'elles ont 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 d'une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Nall-1, dans laquelle l'aptitude à produire HPTTh des cellules de carcinome du poumon humain a été introduite comme dans l'exemple 1, puis on nourrit les animaux de manière habituelle pendant 3 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 produire de l'HPTTh. La production est de l'ordre de 1,2 µg/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues comme dans l'exemple 1 par culture *in vitro* de lignée fusionnée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Nall-1, sont traitées comme plus haut. La production d'HPTTh n'est que de 20 ng/ml de suspension cellulaire environ.

Exemple 5:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Tall-1, dans laquelle l'aptitude à produire de l'HPTTh des cellules de tumeur parathyroïdienne humaine a été introduite comme dans l'exemple 1, 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 de diamètre voisin de 0,5 µ. Après inclusion par voie intrapéritonéale de cette chambre

5 dans un rat adulte, on nourrit celui-ci de manière habituelle pendant 4 semaines, puis on enlève la chambre. La densité en lymphoblastoïdes humains dans la chambre, atteinte au cours de l'opération ci-dessus, est d'environ 6×10^8 cellules/ml, ce qui est environ 10^2 fois supérieur ou même plus à ce qu'on atteint avec une culture *in vitro* à 10 l'aide d'un incubateur à CO₂. Les lymphoblastoïdes humains ainsi obtenus sont traités comme dans l'exemple 2 pour produire l'HPTTh. La production est de l'ordre de 1,1 µg/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues par mise en suspension dans du sérum physiologique de cellules de tumeur parathyroïdienne

15 humaine, transfert de la suspension cellulaire résultante dans la chambre, inclusion par voie intrapéritonéale de cette chambre dans un rat adulte, alimentation de ce dernier de manière habituelle pendant 4 semaines et récolte des lymphoblastoïdes humains multipliés (densité cellulaire environ 8×10^6 cellules/ml), sont traitées 20 comme plus haut. La production d'HPTTh n'est que d'environ 3 ng/ml de suspension cellulaire.

Exemple 6:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans 25 laquelle l'aptitude à produire de l'HPTTh des cellules de carcinome du poumon humain a été introduite comme dans l'exemple 1, 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 30 lymphoblastoïdes humains multipliés ainsi obtenus sont traités comme dans l'exemple 1 pour produire HPTTh.

La production est d'environ 700 ng/ml de suspension cellulaire. Au cours de l'expérimentation témoin, dans laquelle des cellules de carcinome du poumon humain sont implantées dans la cavité allantoïque d'œufs embryonnés, on n'observe pas de multiplication cellulaire.