



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 664 574 A5

⑤① Int. Cl. 4: C 07 K 15/06
A 61 K 37/02**Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein**

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

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑲ Numéro de la demande: 4800/85	⑦③ Titulaire(s): Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)
⑳ Date de dépôt: 08.11.1985	
㉑ Priorité(s): 09.11.1984 JP 59-236356 09.11.1984 JP 59-236357 18.02.1985 JP 60-28396 30.07.1985 JP 60-166754	⑦② Inventeur(s): Mitsuhashi, Masakazu, Okayama-shi/Okayama (JP) Kurimoto, Masashi, Okayama-shi/Okayama (JP)
㉒ Brevet délivré le: 15.03.1988	
㉓ Fascicule du brevet publié le: 15.03.1988	⑦④ Mandataire: Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

⑤④ **Lymphokine et anticorps monoclonal spécifique de ce lymphokine, leurs production et utilisations.**

⑤⑦ Le nouveau lymphokine, désigné par LK 2, est caractérisé par des propriétés physico-chimiques différentes de celles des lymphokines connus. Il est obtenu à partir de cellules humaines capables de la produire, comme leucocytes ou lymphocytes, que l'on peut faire proliférer avant de les soumettre à l'action d'un inducteur de LK 2 tel que inducteur d'interféron- α ou - γ . LK 2 est utilisable contre les tumeurs malignes et pour la production de son anticorps spécifique monoclonal.

LK 2 présente l'avantage d'être cytotoxique sur les cellules des tumeurs malignes, sans exercer d'action nocive sur les tissus normaux.

REVENDECATIONS

1. Lymphokine humaine, en abrégé LK 2, ayant une activité cytotoxique sur les cellules de tumeurs malignes, caractérisée par les propriétés physico-chimiques suivantes:

- (a) Poids moléculaire: $20\,000 \pm 2000$ u ($20\,000 \pm 2000$ daltons)
- (b) Point isoélectrique: $pI = 6,2 \pm 0,3$
- (c) Mobilité électrophorétique: sur pastille de PAGE, $R_f = 0,29 \pm 0,02$
- (d) Spectre d'absorption dans l'UV: absorption maximale pour une longueur d'onde proche de 280 nm.
- (e) Solubilité dans les solvants: soluble dans l'eau, le sérum physiologique et le tampon phosphate; difficilement soluble ou insoluble dans l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle ou le chloroforme.
- (f) Réactions colorées: protéine positive selon le procédé de Lowry, ou le procédé à la microburette; saccharide positif selon le procédé phénol-acide sulfurique ou le procédé anthrone-acide sulfurique.
- (g) Activités biologiques: cytotoxique sur cellule L 929, et sur cellule KB. Pratiquement exempte d'activité interféron.
- (h) Stabilité en solution aqueuse: stable jusqu'à 60°C lorsqu'on met à incuber à pH 7,2 pendant 30 minutes. Stable dans l'intervalle de pH de 4 à 11 lorsqu'on met à incuber à 4°C pendant 16 heures.
- (i) Stabilité à la cryoconservation: stable à -10°C sur une durée de 1 mois ou plus.

2. Procédé pour la production de lymphokine humaine, en abrégé LK 2, selon la revendication 1, caractérisé par les stades de: exposition d'une cellule humaine capable de produire LK 2 à l'action d'un inducteur de LK 2, dans des conditions permettant l'accumulation de quantités marquées de ce produit, et récupération du LK 2 ainsi obtenu.

3. Procédé pour la production de lymphokine humaine, en abrégé LK 2, selon la revendication 1, caractérisé par des stades de: prolifération *in vitro* ou *in vivo* d'une cellule humaine capable de produire LK 2, exposition de la cellule humaine proliférée à l'action d'un inducteur de LK 2, dans des conditions permettant l'accumulation de quantités marquées de ce produit, et récupération du LK 2 ainsi obtenu.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les cellules humaines, capables de produire LK 2, sont obtenues *in vivo*, par leur transplantation dans un animal à sang chaud, que l'on alimente, afin de permettre à ces cellules d'utiliser le fluide corporel nutritif de l'animal pour leur prolifération, suivie d'une extraction et de la désagrégation de la tumeur qui s'est formée dans l'animal.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire LK 2 sont obtenues *in vivo*, par mise en suspension de cellules humaines dans une chambre de diffusion, dans laquelle leur est apporté le fluide corporel nutritif dans un animal à sang chaud, la chambre de diffusion étant incrustée dans ou placée sur l'animal de façon à permettre l'apport de son fluide corporel nutritif dans la chambre, et l'animal étant alimenté pour permettre aux cellules humaines d'utiliser ce fluide pour leur prolifération, suivie de la récolte des cellules, ayant proliféré, à partir de cette chambre.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'animal est immunodéficient ou que ses réactions immunologiques sont supprimées.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la chambre de diffusion est munie d'une ou de plusieurs membranes filtrantes, fibres creuses ou ultrafiltres, ayant une dimension de pore nominale de 10^{-7} à 10^{-5} m.

8. Procédé selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisé en ce que les cellules humaines, capables de produire LK 2, sont des lymphocytes ou des leucocytes humains, en particulier des lymphoblastoïdes, notamment ceux des lignées suivantes: Namalwa ATCC CRL 1432, BALL-1, TALL-1, NALL-1, M-7002, B-7101, JBL, EBV-Sa, EBV-Wa, EBV-HO, MOLT-3 ATCC CRL 1552, CCRF-

SB ATCC CCL 120, CCRF-CEM ATCC CCL 119, BALM-2, DND-41 et Mono-1.

9. Procédé selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que l'inducteur de LK 2 est choisi dans les groupes suivants: inducteur d'interféron- α , inducteur d'interféron- γ et leurs mélanges.

10. Procédé suivant l'une des revendications 2 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact une solution renfermant LK 2 et une quantité marquée d'impuretés, avec une colonne d'un anticorps anti-LK 2 immobilisé, afin de réaliser une chromatographie par affinité, puis à recueillir la fraction active de LK 2 résultante.

11. Composition pharmaceutique à action anti-oncotique, caractérisée en ce qu'elle renferme, outre un support pharmaceutiquement acceptable, du LK 2 selon la revendication 1.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle renferme au moins 5 unités de LK 2 par gramme.

13. Composition selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce qu'elle renferme en outre un produit chimiothérapeutique comme agent d'alkylation, antagoniste métabolique, antibiotique anti-oncotique, alcaloïde, et leurs mélanges.

14. Utilisation de LK 2, selon la revendication 1, pour produire un anticorps monoclonal spécifique de LK 2, caractérisée en ce qu'elle consiste à immuniser un animal à sang chaud avec LK 2 comme antigène, à recueillir les cellules productrices d'anticorps à partir de cet animal, à fusionner ces cellules avec des cellules de myélome, à choisir un clone capable de produire à partir des cellules d'hybridome résultant des anticorps anti-LK 2, à faire proliférer ce clone et à laisser les cellules ayant proliféré produire un anticorps monoclonal spécifique de LK 2.

15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que la cellule productrice est une cellule splénique, en particulier de souris.

16. Utilisation selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le stade de fusion comprend la mise en suspension des cellules productrices d'anticorps avec des cellules de myélome, dans une solution saline renfermant une quantité efficace d'un agent inducteur de la fusion, en particulier du virus de Sendai ou du polyéthylène glycol, suivie d'un repos de durée suffisante pour que la fusion se réalise.

17. Anticorps monoclonal spécifique de LK 2 obtenu selon une des revendications 14 à 16.

DESCRIPTION

La présente invention se rapporte à une nouvelle lymphokine, à sa production et à ses utilisations. Elle concerne également un anticorps monoclonal spécifique de cette lymphokine et sa production.

La lymphotoxine (LT) et le facteur de nécrose tumoral (TNF) sont connus comme étant les lymphokines qui endommagent les cellules tumorales. Par exemple, LT est décrit par: Aoki, Ryuichi et coll. dans SHIN-MENEKIGAKU, vol. 6, «Lymphokine», pp. 87-105 (1979), publié par Igaku-Shoin, In Vitro Method in Cell-Mediated Immunity, édité par B.R. Bloom et P.R. Glade, publié par Academic Press, Inc. (1971), et Cellular Immunology, vol. 38, pp. 388-402 (1978), et TNF est décrit par E.A. Carswell et coll. dans Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 72, N° 9, pp. 3666-3670 (1975), et 6 Lymphokines, vol. 2, pp. 235-272, «Tumor Necrosis Factor», édité par E. Pick, publié par Academic Press, Inc. (1981).

Récemment, H. Ohnishi et coll. ont décrit une lymphokine anti-oncotique, glycoprotéinique dans le brevet japonais Kokai N° 146 293/83.

C. Milstein a passé en revue les anticorps monoclonaux dans Scientific American, vol. 243, N° 4, pp. 56-64 (1980).

En chimiothérapie, on utilise généralement un ou plusieurs des produits suivants: agents d'alkylation, antagonistes métaboliques, antibiotiques anti-oncotiques et alcaloïdes de plantes.

Toutefois, ces produits chimiothérapeutiques présentent les inconvénients suivants: ils peuvent provoquer chez les patients des effets secondaires excessifs, leur spectre tumoral est relativement étroit et insuffisant, et ils sont susceptibles d'induire des tumeurs résistant aux médicaments.

La présente invention permet d'éviter ces inconvénients de l'art antérieur grâce à la découverte d'une nouvelle lymphokine dotée d'une activité cytotoxique sur les cellules des tumeurs malignes, et ayant des propriétés physico-chimiques entièrement différentes de celles des lymphokines connues.

La nouvelle lymphokine humaine, en abrégé LK 2, ayant une activité cytotoxique sur les cellules de tumeurs malignes selon l'invention est caractérisée par les propriétés physico-chimiques suivantes:

- (a) Poids moléculaire: $20\,000 \pm 2000$ daltons.
- (b) Point isoélectrique: $pI = 6,2 \pm 0,3$.
- (c) Mobilité électrophorétique: sur pastille de PAGE, $R_f = 0,29 \pm 0,02$.
- (d) Spectre d'absorption dans l'UV: absorption maximale pour une longueur d'onde proche de 280 nm.
- (e) Solubilité dans les solvants: soluble dans l'eau, le sérum physiologique et le tampon phosphate; difficilement soluble ou insoluble dans l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle ou le chloroforme.
- (f) Réactions colorées: protéine positif selon le procédé de Lowry, ou le procédé à la microburette; saccharide positif selon le procédé phénol-acide sulfurique ou le procédé anthrone-acide sulfurique.

(g) Activités biologiques: cytotoxique sur cellule L 929, et sur cellule KB. Pratiquement exempte d'activité interféron.

(h) Stabilité en solution aqueuse: stable jusqu'à 60°C lorsqu'on met à incuber à pH 7,2 pendant 30 minutes.

Stable dans l'intervalle de pH de 4 à 11 lorsqu'on met à incuber à 4°C pendant 16 heures.

(i) Stabilité à la cryoconservation: stable à -10°C sur une durée de 1 mois ou plus.

Cette invention concerne également des procédés tels que définis dans les revendications 2 et 3 pour la production de cette nouvelle lymphokine, une composition pharmaceutique à action anti-oncologique telle que définie dans la revendication 11, l'utilisation de cette nouvelle lymphokine telle que définie dans la revendication 14 pour obtenir un anticorps monoclonal spécifique de la nouvelle lymphokine ainsi que l'anticorps monoclonal spécifique de cette lymphokine tel que défini dans la revendication 17.

Ci-après, cette lymphokine sera simplement désignée par l'abréviation «LK 2».

LK 2 est produit par l'exposition d'une cellule humaine productrice de LK 2, par exemple leucocyte ou lymphocyte humains, ainsi que leurs lignées de cellules établies, à l'action d'un inducteur de LK 2. Les lymphocytes et leucocytes humains peuvent être isolés à partir de sang humain frais. On peut faire proliférer les lignées de cellules humaines établies par des procédés classiques *in vitro*.

Afin de rendre la présente invention plus efficace dans la pratique, il est souhaitable d'utiliser une prolifération de cellules *in vivo*, en transplantant directement cette lignée de cellules humaines dans le corps d'un animal à sang chaud, ou bien en l'ensemencant dans une chambre de diffusion de type classique, où on lui fournit le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud.

Contrairement à la prolifération cellulaire *in vitro*, le mode opératoire *in vivo* nécessite peu ou pas de milieu nutritif renfermant du sérum coûteux, demande moins de soins au cours de la prolifération cellulaire, et les cellules humaines ayant proliféré présentent une activité LK 2 bien supérieure.

En outre, dans le mode opératoire *in vivo*, la lignée de cellules humaines peut aisément proliférer par utilisation du fluide corporel nutritif fourni par un animal à sang chaud, en transplantant cette lignée dans l'animal, ou en la plaçant dans une chambre de diffusion de type classique, conçue pour recevoir le fluide corporel et située dans ou sur l'animal. Dans tous les cas, l'animal est nourri de manière habituelle.

De plus, le mode opératoire *in vivo* est caractérisé en ce qu'on a une prolifération cellulaire plus rapide et plus stable, une production cellulaire supérieure, et une production bien plus forte de LK 2 par cellule, que dans le cas d'un mode opératoire *in vitro*.

- 5 Les lignées cellulaires utilisables selon l'invention sont celles qui sont productrices de LK 2, peuvent être transplantées dans un animal à sang chaud, et peuvent y proliférer aisément. Conviennent par exemple des lignées cellulaires humaines énumérées dans Protein, Nucleic Acid and Enzyme, vol. 20, N° 6, pp. 616-643 (1975). Conviennent spécifiquement des lignées de lymphoblastoïdes humains, comme Namalwa (ATCC CRL 1432) décrit dans Journal of Clinical Microbiology, vol. 1, pp. 116-117 (1975); BALL-1, TALL-1 et NALL-1, décrits par I. Miyoshi dans Nature, vol. 267, p. 844 (1977); M-7002 et B-7101, décrits dans The Journal of Immunology, vol. 113, pp. 1334-1345 (1974); JBL, EBV-Sa, EBV-Wa, MOLT-3 (ATCC CRL 1552) et EBV-HO, décrits dans The Tissue Culture, vol. 6, N° 13, pp. 527-546 (1980); CCRF-SB (ATCC CCL 120); CCRF-CEM (ATCC CCL 119); BALM 2; DND-41, et d'autres lignées de cellules établies, obtenues par transformation de granulocytes ou monocytes humains normaux au moyen de virus d'agent ou de radiation carcinogène.

Le taux de prolifération et/ou la productivité en LK 2 par cellule, de ces lignées cellulaires, peuvent être améliorés par la technique de fusion cellulaire utilisant du polyéthylène glycol ou du virus de Sendai, ou par la technique de recombinaison de gène, utilisant l'enzyme nucléase, l'enzyme ligase, l'enzyme ADN polymérase, etc. L'énumération des lignées cellulaires humaines utilisables, ci-dessus, ne limite en aucune façon le cadre de l'invention. On peut utiliser en combinaison un ou plusieurs membres de ces lignées, dans les étapes allant jusqu'à l'induction de LK 2 qui est décrite ci-après. Si nécessaire, des leucocytes ou lymphocytes humains, qui peuvent être préparés à partir de sang humain frais, peuvent être utilisés en combinaison avec l'une de ces lignées cellulaires humaines.

L'animal à sang chaud utilisable selon l'invention peut être tout animal dans lequel la cellule humaine peut proliférer. Conviennent par exemple les volailles comme poulet et pigeon; des mammifères comme chien, chat, singe, lapin, chèvre, porc, cheval, vache, cobaye, rat, rat nu, hamster, souris, souris nue, et similaires.

Comme la transplantation de cellules humaines à l'animal provoque une immunoréaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser un animal à sang chaud au stade le plus jeune possible, par exemple œuf, embryon ou fœtus, ou animal nouveau-né ou en bas âge, afin de réduire autant que possible cette immunoréaction.

Avant la transplantation, l'animal peut être irradié avec un rayonnement $-X$ ou $-\gamma$, environ 200 à 600 rem, ou peut recevoir une injection d'un antisérum ou d'un immunosuppresseur, afin de réduire l'immunoréaction au niveau le plus bas possible.

Lorsqu'on utilise comme hôte un animal immunodéficient comme rat nu ou souris nue, on peut transplanter dans ces animaux, sans traitement préalable, toutes les lignées cellulaires humaines mentionnées précédemment, et les faire proliférer facilement avec moins de danger de provoquer une immunoréaction indésirable, car ces animaux présentent moins d'immunoréaction, même à l'état adulte.

On peut stabiliser la prolifération cellulaire et/ou augmenter la production de LK 2 par une succession de transplantations utilisant des animaux à sang chaud semblables ou différents. Ces objectifs peuvent être atteints, par exemple en transplantant d'abord une lignée cellulaire humaine à un hamster, à l'y faire proliférer, puis à transplanter ces cellules humaines proliférées à une souris nue. Dans ce cas, les transplantations successives peuvent s'effectuer avec un animal à sang chaud de même classe ou ordre, aussi bien qu'avec ceux de même espèce ou genre.

Les cellules humaines peuvent être transplantées en tout site de l'animal, dans la mesure où elles prolifèrent dans ce site: par exemple dans la cavité allantoïque, ou par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée.

Ou bien on fait proliférer les cellules humaines en les plaçant dans une chambre de diffusion classique de forme et de dimension variables, munie de moyens convenables pour empêcher la contamination par les cellules de l'animal, mais pour fournir aux cellules humaines le fluide corporel nutritif de l'animal, par exemple membrane filtrante, ultrafiltre ou fibre creuse ayant une dimension de pore de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-5} m; on incorpore par exemple par voie intrapéritonéale cette chambre dans l'animal, et on laisse les cellules humaines proliférer dans la chambre grâce à l'apport du fluide corporel nutritif de l'animal. De plus, la chambre de diffusion peut être prévue pour être placée, par exemple, sur l'animal, de manière que le fluide nutritif puisse circuler librement au travers de la chambre. On peut observer la culture dans la chambre au cours de la prolifération cellulaire, par une fenêtre latérale transparente située sur les parois de la chambre, et/ou la chambre en soi peut être remplacée par intervalles par une chambre fraîche, à la fois pour poursuivre la prolifération cellulaire sur la période de vie de l'animal sans le sacrifier, et pour augmenter beaucoup plus la production cellulaire par animal. Comme du fait de l'absence de contact direct entre les cellules humaines et les cellules animales, cette chambre de diffusion entraîne beaucoup moins d'immunoréaction indésirable, on peut utiliser tout animal à sang chaud facilement, sans traitement préalable pour réduire l'immunoréaction, et l'on peut recueillir aisément à partir de la chambre de diffusion les cellules humaines vivantes ayant proliféré.

L'alimentation de l'animal peut s'effectuer de manière habituelle et aucune précaution particulière n'est requise, même après la transplantation. La période nécessaire pour obtenir une prolifération cellulaire maximale est généralement de 1 à 10 semaines. Le nombre de cellules humaines ainsi obtenues est proche de 10^7 à 10^{12} cellules, ou plus, par animal. Plus particulièrement, selon l'invention, les cellules humaines transplantées voient leur nombre multiplié par 10^2 à 10^7 , ou plus, ce qui est 10 à 10^6 fois supérieur, ou même plus, à ce que l'on obtient par ensemencement et prolifération des cellules humaines sur un milieu de culture nutritif, *in vitro*. Cela est très avantageux pour la production de LK 2.

Conformément à l'invention, on peut utiliser tout procédé dans la mesure où il permet d'induire la production de LK 2 dans les cellules humaines proliférées. Ces cellules sont exposées, dans l'animal utilisé comme hôte pour la prolifération cellulaire, à un inducteur de LK 2. Par exemple, une cellule humaine ayant proliféré en ascite en suspension, ou une cellule tumorale formée par exemple sous la peau, est directement exposée *in vivo* à un inducteur de LK 2 pour en déclencher la production, et le LK 2 accumulé est recueilli à partir de l'ascite, du sérum et/ou de la tumeur, puis on purifie ce produit. Ou bien, on recueille les cellules humaines ayant proliféré, à partir de l'animal, et puis on les expose *in vitro* à l'action d'un inducteur de LK 2. Par exemple, les cellules humaines ayant proliféré, obtenues par récolte de la suspension d'ascite, ou par extraction et désagrégation des masses tumorales formées par exemple sous la peau, sont mises en suspension dans un milieu de culture nutritif, préalablement chauffé à une température de l'ordre de 20° à 40° C, de manière à avoir une densité cellulaire voisine de 10^5 à 10^8 cellules/ml, et l'on expose *in vitro* à l'action d'un inducteur de LK 2, puis on recueille à partir de la culture le LK 2 accumulé.

Lorsqu'on utilise une chambre de diffusion de type classique, l'exposition des cellules humaines ayant proliféré à l'action d'un inducteur de LK 2 s'effectue dans la chambre ou après récolte.

Les cellules humaines ainsi obtenues peuvent être cultivées *in vitro* pendant 1 à 4 jours supplémentaires, afin de contrôler le temps de génération, avant l'induction de LK 2.

La production de LK 2 par animal peut être encore augmentée par utilisation de l'un ou de plusieurs des procédés suivants:

(1) Procédé au cours duquel les cellules humaines ayant proliféré sont exposées à un inducteur de LK 2 dans l'animal, qui a été utilisé comme hôte pour la prolifération cellulaire, puis sont récoltées à partir de certains sites de l'animal ou de la totalité de son corps, et sont soumises à l'exposition *in vitro* à l'inducteur de LK 2.

(2) Procédé dans lequel les cellules humaines sont exposées à maintes reprises à l'action d'un inducteur de LK 2.

(3) Procédé au cours duquel la chambre de diffusion, incorporée dans l'animal ou reliée à lui, est remplacée par intervalles par une chambre fraîche.

Les inducteurs de LK 2 utilisables conformément à l'invention sont des inducteurs d'interféron- α classique (inducteur IFN- α), tels que virus, acide nucléique et nucléotide; et des inducteurs d'interféron- γ classique (inducteur IFN- γ) comme phytohématagglutinine, concanavaleine A, phytolaque mitogène, lipopolysaccharide, endotoxine, polysaccharide et bactéries. Les antigènes agissent sur les cellules sensibilisées comme des inducteurs de LK 2.

La production de LK 2 peut être augmentée par l'utilisation combinée des inducteurs de IFN- α et IFN- γ , comme inducteur de LK 2. Il se confirme que cette combinaison induit simultanément la production d'interféron spécifique à l'homme (HuIFN). Cela s'avère très avantageux lors de la production en grande quantité, à faible coût et simultanément, de deux ou plusieurs substances biologiquement actives, c'est-à-dire de HuIFN et de LK 2 d'une valeur inestimable, aussi bien que pour une utilisation beaucoup plus efficace des cellules humaines.

Le LK 2 ainsi obtenu peut être recueilli par un ou plusieurs modes opératoires de purification et/ou de séparation, par exemple relargage, dialyse, filtration, centrifugation, concentration et/ou lyophilisation. Lorsqu'on désire une préparation encore plus pure de LK 2, on peut obtenir une préparation très pure par les modes opératoires décrits plus haut, en combinaison avec d'autres modes opératoires classiques, par exemple adsorption et désorption avec échange d'ions, filtration sur gel, fractionnement au point isoélectrique, électrophorèse, chromatographie par échange d'ions, chromatographie liquide à grande performance, chromatographie sur colonne, et/ou chromatographie par affinité.

Les anticorps monoclonaux immobilisés, obtenus par liaison d'un anticorps monoclonal anti-LK 2, qui sera décrit ci-après, sur un support convenable insoluble dans l'eau, par exemple Sepharose activé au BrCN, un produit de Pharmacia Fine Chemical AB, peuvent être avantageusement utilisés pour accélérer et faciliter la purification de LK 2.

Il se confirme que LK 2 ainsi obtenu a bien les propriétés physico-chimiques mentionnées plus haut.

Il se confirme également que LK 2 n'exerce pratiquement pas de cytolysse sur les cellules humaines normales, mais a des effets cytolytiques remarquables sur un certain nombre de cellules tumorales humaines, ainsi que sur la lignée de fibroblastoides de souris, L 929, pour tuer ces cellules. Ainsi, LK 2, sous forme de composition, convient pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique des maladies sensibles à LK 2, par exemple les tumeurs malignes, plus particulièrement de différentes tumeurs malignes dont le traitement est jugé très difficile.

Conformément à une forme de réalisation de la présente invention, les effets anti-oncotiques des produits chimiothérapeutiques peuvent être augmentés à l'aide d'un renforceur renfermant LK 2 comme constituant actif.

La dose des produits chimiothérapeutiques peut être réduite d'environ $\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{1000}$, du fait que leur effet anti-oncotique peut être très augmenté par le renforceur. De plus, l'utilisation de ce renforceur élargit le spectre tumoral de ces produits, et permet le traitement de tumeurs résistant aux drogues. Les produits chimiothérapeutiques utilisables selon l'invention sont constitués par exemple par un ou plusieurs des produits suivants: agents d'alkylation comme melphalan, cyclophosphamide, ifosfamide, phosphate sodique d'estrarnustine, busulfan, tosylate d'imorposulfan, biphényl-disulfonate-4,4' de N-méthyl diméthyl-3,3' oxydipropyl-amine, carboquone, thio-TEPA, carmustine, chlorhydrate de nimustine, streptozocine, dacarbazine et pipobroman; antagonistes métaboliques comme méthotrexate, fluoro-uracile, tegafur, carmofof, cytarabine, chlorhydrate d'ancitabine, enocitabine, mercapto-6 purine, et thioinosine; antibiotiques anti-oncotiques comme doxorubicine, dauno-

rubicine, aclarubicine, bléomycine, péplomycine, mitomycine C, actinomycines D et C, chromomycine A₃, mithramycine, et néocarzinostatine; et alcaloïdes végétaux comme sulfate de vincristine, sulfate de vinblastine, sulfate de vindésine et podophyllostoxine. Dans le cas de traitement du cancer de la prostate ou de cancer du sein, il peut être souhaitable d'utiliser en combinaison une ou plusieurs hormones anti-oncotiques comme prednisolone, méthyltestostérone et œstrogène conjugué. Les conditions pour combiner ces produits chimiothérapeutiques et LK 2 doivent être choisies de manière souhaitable, et ne sont pas limitées.

Le procédé de production d'un anticorps monoclonal, selon la présente invention, comprend les stades de: immunisation d'un animal à sang chaud avec le LK 2, comme antigène; isolation à partir du corps de l'animal des cellules productrices d'anticorps; fusion de ces cellules avec des cellules de myélome; sélection d'un clone capable de produire un anticorps spécifique de LK 2 à partir des cellules d'hybridome résultant; prolifération du clone; et production par les cellules ayant proliféré de l'anticorps monoclonal spécifique de LK 2.

L'immunisation peut être obtenue par injection, par exemple par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée, d'une solution, émulsion ou suspension aqueuse de LK 2, en tant qu'antigène, à un animal à sang chaud convenable, par exemple poulet, pigeon, chien, chat, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, cobaye, rat, hamster ou souris, suivie de l'alimentation, pendant 3 jours ou plus, de l'animal, afin d'induire la production d'anticorps. On peut également utiliser comme antigène un produit conjugué de LK 2 et d'un saccharide, comme décrit dans la publication de brevet japonais N° 23 847/83. L'antigène peut être injecté en une dose unique, ou éventuellement en 2 ou plusieurs dosages à des intervalles de l'ordre de 3 à 30 jours.

Les cellules spléniques de l'animal immunisé, dans lequel la production d'anticorps a été induite, sont fusionnées avec des cellules de myélome d'espèce semblable ou différente, au moyen d'un mode opératoire convenable, par exemple ceux qui sont reportés par G. Kohler et coll. dans *Nature*, vol. 256, pp. 495-497 (1975) et *Eur. J. Immunol.* vol. 6, pp. 511-519 (1976). Les cellules hybrides ainsi obtenues sont alors choisies et clonées, après quoi les clones sont cultivés *in vitro* ou *in vivo*, puis on recueille à partir de la culture résultante les anticorps monoclonaux hautement spécifiques, accumulés. Plus particulièrement, le mode opératoire *in vivo* est de beaucoup préférable au mode *in vitro*, car le premier permet d'atteindre une prolifération bien plus élevée du clone, et une production plus forte de l'anticorps monoclonal, sans utilisation de sérum coûteux. Au cours du mode opératoire *in vivo*, le clone prolifère en utilisant le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud, l'espèce semblable ou différente de celle qui a été utilisée lors de l'immunisation, soit en le transplantant directement dans l'animal, soit en l'ensemencant dans une chambre de diffusion de type classique conçue pour recevoir le fluide corporel nutritif de cet animal, et l'anticorps monoclonal accumulé est recueilli à partir de fluides corporels comme ascite et sérum. Autre possibilité, le clone, après prolifération *in vivo*, peut être cultivé sur un milieu de culture dénué de sérum pendant 1 à 5 jours supplémentaires, avant que l'on recueille l'anticorps monoclonal accumulé à partir de la culture résultante.

Les anticorps monoclonaux ainsi obtenus peuvent être facilement récupérés, avec un ou plusieurs modes de séparation et/ou de purification, comme relargage, dialyse, filtration, centrifugation et/ou lyophilisation. Lorsqu'on souhaite une purification plus poussée, on peut obtenir une préparation très pure en combinant les modes opératoires ci-dessus avec d'autres modes opératoires classiques comme adsorption et désorption avec échange d'ions, filtration sur gel, fractionnement au point isoélectrique, électrophorèse, chromatographie avec échange d'ions, chromatographie liquide à haute performance, chromatographie sur colonne, et/ou chromatographie par affinité. Le rendement de récupération de l'anticorps monoclonal peut être avantageusement amélioré grâce à l'utilisation d'un gel de LK 2 immobilisé, obtenu par liaison de LK 2 très pur sur un

support insoluble dans l'eau, convenable, par exemple Sepharose activé par BrCN.

L'anticorps monoclonal obtenu conformément à l'invention est avantageusement utilisable comme coordonné pour la chromatographie par affinité orientée vers la production de LK 2, aussi bien que pour le diagnostic de différentes maladies humaines, en raison de sa spécificité envers LK 2, qui endommage les tumeurs malignes.

Les titres de LK 2 sont déterminés grâce à l'utilisation de cellules KB, ou de cellules L 929, prises comme cellules cibles: lorsqu'on utilise les cellules KB, l'activité cytotatique sur ces cellules est déterminée selon le procédé décrit dans *Cancer Chemotherapy Reports*, partie 3, vol. 3, N° 2, septembre (1972); lorsqu'on utilise les cellules L 929, l'activité cytotoxique sur ces cellules en présence d'Actinomycine D est déterminée par le procédé décrit dans *Lymphokines*, vol. 2, pp. 245-249, «Tumor Necrosis Factor», édité par E. Pick, publié par Academic Press, Inc. (1981), avec une légère modification. Dans la présente description, sauf indication contraire, on utilise le dernier procédé avec cellules L 929.

Les titres de HuIFN sont déterminés par le procédé classique de réduction sur plaque, utilisant des cellules FL d'origine amniotique humaine, décrit dans *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, vol. 20, N° 6, pp. 616-643 (1975).

Les titres d'hémagglutination sont déterminés selon le procédé reporté par S.E. Salk, *The Journal of Immunology*, vol. 49, pp. 87-98 (1944) avec une légère modification.

Les expérimentations suivantes illustrent plus en détail la présente invention.

Expérimentation A-1

Préparation de LK 2 partiellement purifié

On injecte à des hamsters nouveau-nés un antisérum classique préparé à partir de lapin afin d'affaiblir leur immunoréaction, on y transplante par voie sous-cutanée une lignée de lymphoblastoïdes humains, BALL-1, et on les alimente de manière habituelle pendant 3 semaines. Les masses tumorales, formées sous la peau, sont extraites, hachées et désagrégées dans un sérum physiologique. La suspension de cellules ainsi obtenue est alors rincée avec du milieu RPMI 1640 (pH 7,2) additionné de sérum, et on remet en suspension dans une préparation fraîche du même milieu de culture, afin d'avoir une densité cellulaire de l'ordre de 2×10^6 cellules/ml. On ajoute à cette suspension du virus de Sendai (environ 400 titres d'hémagglutination/ml), et l'on met à incuber à 37° C pendant 24 heures pour induire la production de LK 2. La culture est alors centrifugée vers 4° C et 1000 g et le précipité résultant est enlevé. La partie surnageante ainsi obtenue est dialysée contre du sérum physiologique renfermant 0,01M de tampon phosphate (pH 7,2) pendant 20 heures, et est traitée avec une membrane filtrante. On fait alors passer le filtrat au travers d'une colonne d'un anticorps anti-HuIFN immobilisé, et l'on collecte la fraction non adsorbée. A partir de cette fraction, on récupère une fraction active, au moyen de chromatocentrage, on la concentre et la lyophilise pour obtenir un produit pulvérulent doté d'activité LK 2.

L'activité spécifique de cette poudre est de l'ordre de 10^6 unités/mg de protéine. Le rendement en LK 2 est de l'ordre de 2×10^7 unités par hamster.

Expérimentation A-2

Préparation d'anticorps anti-LK 2

Une préparation de LK 2, obtenue par le procédé décrit dans l'expérimentation A-1, est dissoute dans du sérum physiologique afin d'avoir une concentration de l'ordre de 0,05% de protéine en poids/volume, et on ajoute à cette solution le même volume d'adjuvant complet de Freund. Des souris sont immunisées par injection sous-cutanée de portions de 0,2 ml du mélange ainsi obtenu, avec rappel 7 jours après la première injection. Après induction de la production d'anticorps anti-LK 2 dans les cellules productrices d'anticorps des animaux, on extrait les rates de ces derniers, les hache, les désagrége, et les met en suspension conjointement avec une lignée

cellulaire de myélome de souris, P₃-X63-Ag8, en provenance de Flow Laboratories Inc. USA, dans du milieu essentiel minimal de Eagle dépourvu de sérum (pH 7,2) renfermant 50% poids/volume de polyéthylène glycol 1000, préchauffé à 37° C, afin d'obtenir des densités cellulaires respectives de 10⁴ cellules/ml, puis on laisse reposer 5 minutes le mélange résultant. Ce mélange est ensuite dilué 20 fois dans une préparation fraîche du même milieu de culture, et les cellules d'hybridome capables de se développer sur le milieu renfermant hypoxanthine, aminoptérine et thymidine, sont recueillies selon le procédé reporté par R.L. Davidson et P.S. Gerald dans *Somatic Cell Genetics*, vol. 2, N° 2, pp. 175-176 (1976) pour cloner les cellules d'hybridome capables de produire l'anticorps anti-LK 2. On transplante dans des souris, par voie intrapéritonéale, les cellules d'hybridome clonées à la dose d'environ 10⁶ cellules par souris, on les alimente pendant 2 semaines avant de les sacrifier. Les fluides corporels des animaux, comme fluide ascitique et sang, sont recueillis, centrifugés et relargués avec du sulfate d'ammonium, puis on collecte les fractions déposées pour des saturations de 30-50%. Ces fractions sont dialysées et soumises à une chromatographie par affinité utilisant un gel d'anticorps anti-LK 2 immobilisé, obtenu par réaction d'un spécimen de LK 2, préparé par le procédé décrit dans l'expérimentation A-1, avec du Sepharose activé par BrCN, à température ambiante, pour obtenir une fraction d'anticorps anti-LK 2, qui est ensuite dialysée, concentrée et lyophilisée. Le produit pulvérulent résultant présente une neutralisation immunologiquement spécifique de l'activité cytotoxique de LK 2.

La stabilité de l'anticorps monoclonal en solution aqueuse est étudiée par détermination des activités neutralisantes résiduelles, après mise en incubation dans les conditions prescrites: lorsqu'on opère à pH 7,2 et à différentes températures pendant 30 minutes, à 60° C il reste au moins 80% de l'activité, mais à 70° C il y a perte de plus de 90%. Après mise en incubation à 4° C et différents pH pendant 16 heures, l'activité reste stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11, mais à pH 2 la perte d'activité est d'au moins 90%.

Lorsqu'on étudie les propriétés de l'anticorps monoclonal, on constate qu'il ne résiste pas au mercapto-2 éthanol, et provoque une réaction spécifique antigène-anticorps avec l'anticorps immunoglobuline M anti-souris. Ainsi, le présent anticorps monoclonal se classe-t-il dans le groupe des anticorps immunoglobuline M.

Expérimentation A-3

Préparation et propriétés physico-chimiques de LK 2 très pur

Un spécimen de LK 2 partiellement purifié, obtenu par le procédé décrit dans l'expérimentation A-1, est soumis à une chromatographie par affinité au moyen d'un gel d'anticorps monoclonal immobilisé, préparé par le procédé décrit dans l'expérimentation A-2, et l'on recueille des fractions de LK 2 qui sont ensuite dialysées, concentrées et lyophilisées.

Le résultat est une préparation très pure de LK 2 ayant une activité spécifique de l'ordre de 10⁹ unités/mg de protéine.

Les propriétés physico-chimiques de LK 2 sont étudiées à partir de cette préparation.

1) Poids moléculaire:

Le poids moléculaire de LK 2 est déterminé par les procédés électrophorétiques utilisant du gel de SDS-polyacrylamide, décrits par K. Weber et M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 4406 (1969). Les colonnes de gel à 10% d'acrylamide sont chargées avec des portions d'environ 10 µg de la préparation, en présence de 0,1% de SDS, et l'on met sous charge de 8 mA par colonne pendant 4 heures, afin de réaliser l'électrophorèse. Après extraction et dosage ultérieur de LK 2 des fractions actives, le poids moléculaire de LK 2 est de 20 000 ± 2000 u (20 000 ± 2000 daltons).

2) Point isoélectrique:

Une électroconcentration à 25 W de la préparation, de 2 heures, utilisant «AMPHOLINE PAGPLATE» (pH = 3,5 à 9,5), un gel fabriqué pour l'électroconcentration par LKB-Produkter AB, Suède, donne un point isoélectrique pI de 6,2 ± 0,3.

3) Mobilité électrophorétique:

Selon le procédé décrit par B.J. Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 121, p. 404 (1964), on charge sur des colonnes de gel d'acrylamide à 7,5% des fractions d'environ 10 µg de la préparation, on soumet à une électrophorèse à pH 8,3 et 3 mA par colonne pendant 2 heures, on extrait et on dose l'activité de LK 2 pour obtenir une mobilité électrophorétique R_f de 0,29 ± 0,02.

4) Spectre d'adsorption UV:

Après analyse du spectre UV de la préparation à l'aide d'un spectromètre UV-250, fabriqué par Shimadzu Seisakusho KK, Japon, on observe une absorption maximale au voisinage de 280 nm.

5) Solubilité dans les solvants:

Le produit est soluble dans l'eau, le sérum physiologique et la solution tampon phosphate; faiblement ou pas soluble dans l'oxyde de diéthyle, l'acétate d'éthyle et le chloroforme.

6) Réaction colorée:

Elle est protéine-positive par le procédé de Lowry et celui à la microburette; sucre-positive par le procédé au phénol-acide sulfurique et celui à l'anthrone-acide sulfurique.

7) Activité biologique:

On observe une activité cytotoxique sur les cellules L 929 et une activité cytostatique sur les cellules KB. On ne remarque pas d'activité HuFIN marquée.

8) Stabilité en solution aqueuse:

a) Stabilité à la chaleur:

On met à incuber à pH 7,2, pendant 30 minutes, et à différentes températures, des fractions d'environ 1 × 10⁵ unités/ml de la préparation, et l'on détermine les activités cytotoxiques résiduelles. On constate que LK 2 est stable jusqu'à 60° C.

b) Stabilité au pH:

Des fractions de 0,1 ml de la préparation (1 × 10⁶ unités/ml) sont additionnées avec 1 ml de solution tampon de différentes valeurs de pH, c'est-à-dire de tampon de McIlvaine à pH 2 à 7; tampon phosphate, pH 7 à 8; tampon glycine-NaOH, pH 8 à 11, et l'on met à incuber à 4° C pendant 16 heures. Puis on ajuste à pH 7,2 avec du tampon phosphate 0,05M, 0,1 ml du mélange incubé, et l'on détermine l'activité résiduelle. On constate que LK 2 est stable dans l'intervalle de pH compris entre 4 et 11.

c) Stabilité à la DISPASE:

A environ 1 × 10⁵ unités/ml de la préparation, on ajoute de la «DISPASE», une protéase de micro-organisme *Bacillus*, commercialisée par Godo Shusei Co., Ltd. Japon, de manière à donner une activité enzymatique de 100 unités/ml, et l'on fait incuber ce mélange à pH 7,2 et 37° C pendant 2 heures. Au cours de l'incubation, on prélève périodiquement de petites portions du mélange et on les additionne d'albumine et de sérum de veau de manière à avoir une concentration de 1% en poids/volume, afin d'arrêter la réaction enzymatique. Lors du dosage des activités LK 2 dans les échantillons, on constate que LK 2 est sensible au traitement par la dispase et perd son activité à mesure que se déroule la réaction enzymatique.

9) Stabilité à la cryoconservation:

La préparation de LK 2 est entreposée en solution aqueuse à -10° C et pH 7,2 pendant 1 mois, est dégelée et dosée. On ne constate pas de diminution d'activité.

Il ressort de ce qui précède que LK 2 a des propriétés physico-chimiques différentes de celles des lymphokines connues comme LT, TNF ou IFN. De même, l'anticorps monoclonal selon l'invention est nouveau, car il présente une neutralisation immunologiquement spécifique de l'activité cytotoxique de la nouvelle lymphokine LK 2.

Expérimentation B-1

Action cytostatique sur les cellules des tumeurs malignes

L'effet cytostatique, exercé par LK 2 sur plusieurs cellules humaines, a été étudié en utilisant les préparations de ce produit obtenues par le procédé décrit dans les expérimentations A-1 et A-3.

10⁶ cellules de l'une des lignées humaines, énumérées dans le tableau 1, sont mises en suspension dans 1 ml de milieu nutritif classique additionné de sérum fœtal de veau; on cultive pendant 1 jour, y ajoute 0,1 ml de sérum physiologique renfermant 50 ou 500 unités de préparation de LK 2, préparée par le procédé décrit dans l'expérimentation A-1 ou A-3, et met à incuber à 37° C pendant 2 jours. Lorsque la culture est achevée, les cellules viables sont colorées avec du rouge neutre, un type d'agent colorant, selon le procédé décrit

dans *Applied Microbiology*, vol. 22, N° 4, pp. 671-677 (1971), et l'agent colorant est élué au moyen d'une solution d'éthanol acidifié. Ensuite, le nombre de cellules viables est déterminé par mesure de la capacité d'absorption de l'éluat, pour une longueur d'onde de 540 nm.

On utilise comme témoin 0,1 ml de sérum physiologique exempt de LK 2.

Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé grâce à l'équation suivante:

Inhibition de croissance (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Capacité d'absorption avec LK 2}}{\text{Capacité d'absorption du témoin}}\right) \times 100$$

Les résultats sont indiqués dans le tableau I.

Tableau I

Nom de la lignée cellulaire	Source de la lignée cellulaire	LK 2 de l'expérimentation A-1		LK 2 de l'expérimentation A-3	
		50 unités	500 unités	50 unités	500 unités
HEp #2*	Carcinome épidermoïde du larynx	33	40	46	68
PC-8*	Carcinome du poumon	26	37	56	80
MKN 7*	Cancer de l'estomac	35	41	60	77
HLE*	Carcinome du foie	32	38	55	71
HeLa*	Carcinome épithélioïde du col de l'utérus	24	35	46	68
L-132**	Poumon embryonnaire	3	-2	1	-3
Foie de Chang**	Foie	2	-3	-4	-1
Cœur de Giradi**	Cœur	-2	2	-1	-2

Note: *) indique les lignées cellulaires humaines provenant de tumeurs malignes;

***) cellules d'origines normales.

Ces résultats confirment que LK 2 n'affecte guère les cellules normales, mais qu'il inhibe fortement la croissance de différentes cellules de tumeurs malignes. Il se confirme également que l'action d'un LK 2 partiellement purifié (A-1) est bien comparable à celle du produit très purifié (A-3).

Expérimentation B-2

Un groupe de souris BALB/c reçoivent un transplant de cellules Meth A, provenant de sarcome de souris. A partir du dixième jour après la transplantation, on injecte par voie sous-cutanée aux souris du sérum physiologique renfermant une préparation de LK 2, obtenue par le procédé décrit dans l'expérimentation A-3, à raison de 100 ou 1000 unités/kg et par jour, pendant 15 jours. Ces souris sont ensuite sacrifiées, et les masses tumorales formées chez les animaux sont mesurées.

Les résultats figurent dans le tableau II.

Tableau II

Traitement	Dosage/jour (unités/kg)	Masse tumorale (g)
Témoin	0	5,7 ± 0,7
LK 2	100	3,3 ± 0,4*
	1000	2,8 ± 0,4*

Note: *) indique les résultats statistiquement significatifs par rapport au témoin de valeur 5%.

Expérimentation B-3

Des groupes de souris nues BALB/c reçoivent des transplants

sous-cutanés, dans la région dorsale, de petits fragments de tissu de cancer du sein humain.

Lorsque la croissance des masses tumorales atteint environ 200 mm³ dans le corps des animaux, on injecte par voie intraveineuse du sérum physiologique renfermant une préparation de LK 2, obtenue par le procédé décrit dans l'expérimentation A-1 ou A-3, une fois par jour à raison de 100 ou de 1000 unités/kg, pendant 20 jours. Puis on sacrifie les animaux et les tumeurs résultantes sont pesées.

Les résultats figurent dans le tableau III.

Tableau III

Traitement	Dosage quotidien (unités/kg)	Masse tumorale (g)
Témoin	0	10,8 ± 1,0
LK 2 de l'expérimentation A-1	100	7,3 ± 0,7*
	1000	6,8 ± 0,5*
LK 2 de l'expérimentation A-3	100	6,4 ± 0,5*
	1000	5,6 ± 0,7*

Note: *) indique les résultats statistiquement significatifs par rapport au témoin de valeur 5%.

Expérimentation B-4

Un groupe de souris nues BALB/c reçoivent des transplants sous-cutanés, dans la région dorsale, de petits fragments de tissu de cancer du sein humain, comme dans l'expérimentation B-3. Lorsque

la croissance des masses tumorales atteint environ 200 mm³ dans le corps des animaux, on injecte par voie intraveineuse du sérum physiologique renfermant une préparation de LK 2, obtenue par le procédé décrit dans l'expérimentation A-3, et/ou une préparation de HuIFN- α , une fois par jour pendant 20 jours. Puis on sacrifie les animaux et les tumeurs résultantes sont pesées. On utilise comme témoin un sérum physiologique exempt de LK 2 et d'HuIFN- α .

Les résultats sont reportés dans le tableau IV.

Il en ressort clairement que l'utilisation combinée de LK 2 et de HuIFN- α augmente considérablement l'effet anti-oncotique de HuIFN- α .

Tableau IV

Traitement	Dosage quotidien (unités/kg)	Masse tumorale (g)
Témoin	0	10,8 $\pm$ 1,0
LK 2	100	6,4 $\pm$ 0,5*
HuIFN- α	1000	6,7 $\pm$ 0,5*
LK 2 plus HuIFN- α	100	5,3 $\pm$ 0,4*
	1000	

Note: *) indique les résultats statistiquement significatifs par rapport au témoin de valeur 5%.

Expérimentation B-5

Un essai de toxicité aiguë, au cours duquel on administre à un groupe de souris âgées de 20 jours une préparation de LK 2, obtenue par le procédé décrit dans l'expérimentation A-3, confirme que la toxicité de la préparation est extrêmement faible, c'est-à-dire que DL₅₀ est égale ou supérieure à 10⁹ unités, par injection intrapéritonéale.

Ainsi qu'il ressort des expérimentations ci-dessus, le LK 2 exerce un fort effet cytostatique sur les tumeurs malignes *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*. En outre, l'administration de LK 2 est sans risque eu égard au fait qu'un dosage élevé n'affecte pratiquement pas les cellules normales, alors qu'un faible dosage agit remarquablement sur les cellules tumorales.

Le dosage efficace du présent LK 2 se situe généralement dans l'intervalle de 5 à 500 000 000 unités/jour pour un adulte; plus particulièrement, pour l'administration locale, par exemple sous forme de collyre ou d'injection locale, le dosage se situe entre 5 et 10 000 000 unités/jour; pour l'administration percutanée ou permucosale, par exemple sous forme d'onguent ou de suppositoire, entre 10 et 50 000 000 unités/jour; pour l'administration systémique, par exemple par injection intraveineuse ou intramusculaire, entre 50 et 100 000 000 unités/jour; et pour l'administration orale, entre 500 et 500 000 000 unités/jour, mais ces dosages sont très variables selon les symptômes du patient et les indications.

Bien que LK 2 puisse être préparé sous forme de médicament de manière habituelle après mélange avec support, base et/ou véhicule convenable, la teneur en LK 2 est de préférence d'au moins 5 unités/g, eu égard à la toxicité, au dosage actif et à l'innocuité.

La forme et le conditionnement des agents prophylactiques et/ou thérapeutiques, pour les maladies sensibles à LK 2, peuvent être librement choisis: par exemple pour l'administration orale, ils peuvent être façonnés en préparations pour usage entérique, par exemple capsule, comprimé ou poudre; pour l'administration rectale, suppositoire; pour injection, ils peuvent être par exemple préparés sous forme de produit lyophilisé qui est dissous, avant l'usage, avec de l'eau distillée pour donner une solution injectable; ils peuvent également se présenter sous forme d'onguent, de collyre ou de «collunarium».

Lors du traitement d'un patient à tumeur maligne, par exemple, on peut traiter *in vitro* un fragment de tissu tumoral provenant de ce patient, avec LK 2 afin d'augmenter l'immunogénicité de ce frag-

ment, que l'on administre au patient afin d'obtenir un traitement beaucoup plus efficace de la tumeur maligne.

Les utilisations combinées de LK 2 avec des anti-oncotiques, par exemple, des lymphokines comme HuIFN, TNF, LT et TGCF

(facteur de croissance de cellule-T); des saccharides anti-oncotiques comme β -glucane-1,3, arabinomannane, lipopolysaccharide, OK-432 (picibanil), PSK (krestin) et lentinane; des antagonistes métaboliques comme méthotrexate et fluoro-uracile; et des antibiotiques anti-oncotiques comme doxorubicine et mitomycine C, sont très avantageux, car ils augmentent considérablement l'effet anti-oncotique de LK 2.

Plus particulièrement est éclaircie ci-après la propriété de LK 2 d'augmenter l'effet anti-oncotique des produits chimiothérapeutiques.

Expérimentation C-1

Augmentation de l'effet anti-oncotique des produits chimiothérapeutiques par LK 2

Cet effet est étudié sur des cellules de tumeurs malignes. On commence 10⁶ cellules de tumeur maligne humaine sur 1 ml d'un milieu de culture nutritif, de type classique, additionné de sérum fœtal de veau, et l'on cultive pendant 1 jour. Puis on ajoute à cette culture 0,1 ml de sérum physiologique renfermant 100 unités d'un échantillon de LK 2, préparé par le procédé de l'expérimentation A-3, et/ou un produit chimiothérapeutique, et l'on cultive pendant 2 jours supplémentaires à 37° C.

Comme témoin, on utilise un sérum physiologique exempt de LK 2 et de produit chimiothérapeutique.

Lorsque la culture est terminée, on compte le nombre de cellules viables selon le procédé de l'expérimentation B-1, et l'on détermine le pourcentage d'inhibition de croissance.

Les concentrations des produits chimiothérapeutiques essayés sont comme suit: chlorhydrate de nimustine (ACNU), 1 $\times$ 10⁶ g/ml de culture; fluoro-uracile (5-FU), 1,5 $\times$ 10⁻⁸ g/ml de culture; doxorubicine (ADM), 1 $\times$ 10⁻¹⁰ g/ml de culture; mitomycine C (MMC), 2,5 $\times$ 10⁻⁹ g/ml de culture; et sulfate de vincristine (VCR), 1,5 $\times$ 10⁻¹⁰ g/ml de culture.

Les résultats sont reportés dans le tableau V. Ils montrent clairement que LK 2 augmente considérablement l'effet anti-oncotique des produits chimiothérapeutiques.

(Tableau en tête de la page suivante)

Expérimentation C-2

Un groupe de souris nues BALB/c reçoivent des transplants sous-cutanés, dans la région dorsale, de petits fragments de tissu de cancer du sein humain.

Lorsque la croissance des masses tumorales atteint environ 200 mm³ dans le corps des animaux, on injecte par voie intraveineuse du sérum physiologique renfermant une préparation de LK 2, obtenue par le procédé décrit dans l'expérimentation A-3 et/ou un produit chimiothérapeutique, une fois par jour pendant 20 jours. Puis on sacrifie les animaux et les masses tumorales résultantes sont pesées. On utilise comme témoin du sérum physiologique exempt de LK 2 et de produits chimiothérapeutiques.

Les résultats figurent dans le tableau VI. Il en ressort clairement que LK 2 augmente considérablement l'effet anti-oncotique des produits chimiothérapeutiques, même *in vivo*.

(Tableau en page suivante)

Les preuves mentionnées ci-dessus confirment qu'une combinaison d'un produit chimiothérapeutique avec LK 2 aboutit à un effet anti-oncotique supérieur.

L'utilisation de LK 2 comme renforçateur des produits chimiothérapeutiques réduit considérablement dans la pratique la concentration de ces derniers, empêche la manifestation d'effets secondaires, et élargit leurs spectres tumoraux.

Tableau V

Lignée cellulaire	Néant	ACNU		5-FU		ADM		MMC		VCR	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Hep ± 2 (carcinome épidermoïde du larynx)	52	4	67	8	80	13	70	10	72	5	66
PC-8 (carcinome du poumon)	62	2	71	10	85	6	71	5	68	8	72
MKN 7 (cancer de l'estomac)	62	4	73	6	77	5	69	3	73	6	70
HLE (carcinome du foie)	57	5	75	8	81	7	73	12	74	10	69
Hela (carcinome épithélioïde du col de l'utérus)	51	5	71	12	69	7	62	7	61	10	63

Note: +) avec produit chimiothérapeutique,
 -) sans produit chimiothérapeutique;
 et les valeurs indiquent le pourcentage d'inhibition de croissance des cellules tumorales.

Tableau VI

Traitement	Dosage quotidien	Masse tumorale (g)
Témoin	0	10,8 ± 1,0
LK 2	100 unités/kg	6,4 ± 0,5*
MMC	1 mg/kg	5,1 ± 0,4*
LK 2 plus MMC	100 unités/kg 0,1 mg/kg	4,8 ± 0,4*

Note: *) indique les résultats statistiquement significatifs par rapport au témoin de valeur 5%.

Le renforceur renfermant LK 2 selon l'invention, qui présente une activité de renforcement de l'effet anti-oncotique quand il est utilisé conjointement avec des produits chimiothérapeutiques, est mélangé avec un de ces produits avant d'être administré avec lui, par une seule voie. Ou bien, on peut administrer d'abord le renforceur ou le produit chimiothérapeutique, puis l'autre produit, par une voie identique ou différente.

Les exemples suivants A, B et C illustrent respectivement la production de LK 2, des compositions pharmaceutiques renfermant LK 2 et l'anticorps monoclonal spécifique de LK 2.

Exemple A-1

Une lignée humaine de lymphoblastoïdes, BALL-1, est ensemencée sur un milieu essentiel minimal de Eagle (pH 7,4) additionné de 20% de sérum fœtal de veau, et est cultivée *in vitro*, en suspension à 37°C, de manière habituelle. Les cellules humaines ayant proliféré sont alors rincées avec du milieu essentiel minimal de Eagle (pH 7,4) exempt de sérum, et sont remises en suspension dans une préparation fraîche du même milieu de culture, de façon à avoir une densité cellulaire de 1×10^7 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est additionnée de virus de Sendai à la dose d'environ 1000 titres d'hémagglutination/ml, et l'on met à incuber à 38°C pendant 1 jour afin d'induire la production de LK 2. Après centrifugation de la culture résultante à 4°C et 1000 xg, environ, la partie surnageante est dialysée contre du sérum physiologique renfermant 0,01M de tampon phosphate (pH 7,2) pendant 15 heures, et l'on traite avec une membrane filtrante. On fait ensuite passer le filtrat au travers d'une colonne d'anticorps anti-LK 2, comme dans l'expérimentation A-1, et la fraction non adsorbée est purifiée comme dans l'expérimentation A-3, au moyen d'une chromatographie par affinité utilisant une colonne de gel d'anticorps anti-LK 2, puis l'on concentre afin d'obtenir un concentré ayant une activité spécifique LK 2 d'environ 10^9 unités/mg de protéine.

Le rendement est de l'ordre de $1,5 \times 10^6$ unités/litre de suspension de cellules induites.

Exemple A-2

On injecte à des hamsters nouveau-nés un antisérum classique, préparé à partir de lapin, afin d'affaiblir leur immunoréaction, on y transplante par voie sous-cutanée une lignée de lymphoblastoïdes humains, BALL-1, et on les nourrit pendant 3 semaines de manière habituelle. Les masses tumorales, environ 15 g chacune, formées sous la peau des animaux, sont extraites, hachées et désagrégées dans du sérum physiologique. Après rinçage avec du milieu RPMI 1640 exempt de sérum (pH 7,2), les cellules ayant proliféré sont remises en suspension dans une préparation fraîche du même milieu de culture, afin d'obtenir une densité cellulaire de l'ordre de 5×10^6 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est additionnée de virus de Sendai et d'endotoxine de *E. coli*, à raison respectivement de 1000 titres d'hémagglutination/ml et de 10 µg/ml, environ, et l'on met à incuber à 37°C pendant 1 jour, pour induire la production de LK 2. Après centrifugation de la culture à 4°C et 1000 xg, environ, pour éliminer le sédiment, la partie surnageante est dialysée contre du sérum physiologique renfermant 0,01M de tampon phosphate (pH 7,2) pendant 21 heures, et est traitée avec une membrane filtrante. Le filtrat est purifié avec une colonne d'anticorps, comme dans l'exemple A-1, et la solution d'éluat est concentrée et lyophilisée pour donner un produit pulvérulent ayant une activité spécifique LK 2 de l'ordre de 10^9 unités/mg de protéine.

Le rendement est voisin de $3,2 \times 10^7$ unités.

Exemple A-3

On transplante dans des souris nues adultes, par voie intrapéritonéale, une lignée de lymphoblastoïdes humains, TALL-1, on les alimente de manière habituelle pendant 5 semaines, leur injecte par voie intrapéritonéale du virus de la maladie de Newcastle (environ 3000 titres d'hémagglutination par souris nue) qui a été au préalable pratiquement inactivé par irradiation aux UV, et les sacrifie 24 heures après cette injection, puis on recueille leurs fluides ascitiques. Ces fluides sont purifiés, concentrés et lyophilisés comme dans l'exemple A-2, pour donner un produit pulvérulent possédant l'activité LK 2.

Le rendement est de l'ordre de $3,5 \times 10^6$ unités/souris nue.

Exemple A-4

Des souris adultes sont irradiées avec environ 400 rem de rayons X afin d'affaiblir leur immunoréaction, on y transplante par voie sous-cutanée une lignée de lymphoblastoïdes humains, Mono-1, et on les alimente de manière habituelle pendant 3 semaines. Les masses tumorales, environ 10 g chacune, formées sous la peau des animaux, sont extraites, et désagrégées comme dans l'exemple A-2. Les

cellules humaines ainsi obtenues sont mises en suspension comme dans l'exemple A-2, après quoi la suspension cellulaire résultante est additionnée de virus de Sendai et de concanavaline A, aux doses respectives de 500 litres d'hémagglutination/ml et de 0,8 µg/ml, et l'on met à incuber à 37° C pendant 1 jour pour induire la production de LK 2. Cette culture est ensuite purifiée, concentrée et lyophilisée comme dans l'exemple A-2, pour donner une poudre possédant une activité LK 2.

Le rendement est de l'ordre de 2×10^7 unités/souris.

Exemple A-5

On transplante, dans des hamsters nouveau-nés, une lignée de lymphoblastoïdes humains, Namalwa (ATCC CRL 1432), comme dans l'exemple A-2, et on les alimente de manière habituelle pendant 4 semaines. Les masses tumorales, environ 20 g chacune, formées sous la peau des animaux, sont extraites et désagrégées pour donner une suspension cellulaire ayant une densité de l'ordre de 3×10^6 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est additionnée de virus de Sendai à raison de 1000 titres d'hémagglutination/ml, et l'on met à incuber à 36° C pendant 2 jours pour induire la production de LK 2. Cette culture est purifiée et concentrée comme dans l'exemple A-1, pour donner un concentré possédant l'activité LK 2.

Le rendement est de l'ordre de $2,2 \times 10^7$ unités/hamster.

Exemple A-6

Une lignée de lymphoblastoïdes humains, NALL-1, est mise en suspension dans du sérum physiologique, et est placée dans une chambre de diffusion cylindrique de 10 ml environ, en matière plastique, munie d'une membrane filtrante ayant une dimension de pore nominale d'environ 0,5 µ. Cette chambre est incluse par voie intrapéritonéale dans un rat adulte, et l'animal est nourri de manière habituelle pendant 4 semaines. Après enlèvement de la chambre, on constate que la densité cellulaire dans celle-ci est de l'ordre de 5×10^8 cellules/ml, ce qui est environ 10^2 fois, ou plus, supérieur à ce que l'on obtient dans le cas d'une prolifération *in vitro* dans un incubateur à CO₂, utilisant un milieu de culture nutritif. Ces cellules humaines sont mises en suspension dans un milieu de culture semblable à celui de l'exemple A-2, on y ajoute du virus de la maladie de Newcastle (environ 500 titres d'hémagglutination/ml) préalablement inactivé par irradiation aux UV, et de la phytohémagglutinine (environ 50 µg/ml), et l'on met à incuber à 37° C pendant un jour pour induire la production de LK 2. Cette culture est ensuite purifiée, concentrée et lyophilisée comme dans l'exemple A-2 pour donner une poudre possédant l'activité LK 2.

Le rendement est de l'ordre de 8×10^6 unités/rat.

Exemple A-7

Une lignée de lymphoblastoïdes humains, CCRF-CEM (ATCC CCL 119), est ensemencée dans les cavités allantoïques d'œufs embryonnés qui ont été mis à incuber à 37° C pendant 5 jours, et ces œufs sont remis à incuber à la même température pendant une semaine supplémentaire. Les cellules humaines ayant proliféré sont recueillies à partir des œufs, et mises en suspension comme dans l'exemple A-1 de manière à donner une densité cellulaire de 5×10^6 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est alors additionnée de virus de Sendai (environ 500 titres d'hémagglutination/ml) et mise à incuber à 37° C pendant un jour, pour induire la production de LK 2. La culture résultante est purifiée et concentrée comme dans l'exemple A-2, pour donner une poudre possédant l'activité LK 2.

Le rendement est de l'ordre de 7×10^5 unités pour 10 œufs embryonnés.

Exemple B-1

Injection

500 000 unités de spécimen de LK 2, préparées dans l'exemple 1-2, sont dissoutes dans 200 ml de sérum physiologique, et on filtre dans des conditions stériles à l'aide d'une membrane filtrante. Des portions de 2 ml de ce filtrat sont réparties dans des fioles de verre

stérilisées, sont lyophilisées et on scelle ces fioles pour obtenir un produit injectable en poudre.

Ce produit injectable est avantageusement utilisable seul, ou comme renforçateur en combinaison avec un produit chimiothérapeutique comme melphalan, méthotrexate ou doxorubicine, pour le traitement du cancer du sein, du carcinome du poumon, du carcinome du foie et de la leucémie.

Exemple B-2

10 Injection

Un produit injectable en poudre est préparé comme dans l'exemple B-1, mais avec dissolution dans 200 ml de sérum physiologique, de 3×10^8 unités de HuIFN-α provenant de cellules de lymphoblastoïde humain, conjointement avec 5×10^5 unités de LK 2.

15 Ce produit injectable est avantageusement utilisable seul, ou comme renforçateur en combinaison avec un produit chimiothérapeutique comme tegafur, mitomycine C ou sulfate de vincristine, pour le traitement du cancer du sein, du carcinome du poumon, du carcinome du foie et de la leucémie, et son efficacité thérapeutique est supérieure à celle du produit injectable de l'exemple B-1.

Exemple B-3

Onguent

Le spécimen de LK 2, préparé dans l'exemple A-3, est pétri avec 25 une quantité minimale de paraffine liquide, jusqu'à homogénéité. Ce mélange est alors additionné de vaseline blanche de manière habituelle, pour obtenir un onguent ayant une teneur en LK 2 de 20 000 unités/g.

Cet onguent est avantageusement utilisable seul, ou comme renforçateur en combinaison avec un produit chimiothérapeutique comme cyclophamide, fluoro-uracile ou sulfate de vincristine, pour le traitement du carcinome de la peau, du cancer du sein et de la maladie de Hodgkin.

35 Exemple B-4

Collyre

Un mélange de 800 ml d'eau distillée, 5 ml de β-phényléthanol et 20 000 000 unités de spécimen de LK 2, préparé dans l'exemple A-4, est mélangé avec du chlorure de sodium dans une quantité supplémentaire d'eau distillée, afin d'obtenir 1000 ml de solution isotonique.

40 Cette solution peut être avantageusement utilisée seule, ou comme renforçateur en combinaison avec un produit chimiothérapeutique comme cytarabine ou sulfate de vincristine, pour traiter le rétinoblastoma.

Exemple B-5

Comprimés entériques enrobés

50 On prépare des comprimés entériques enrobés selon un procédé classique, à partir d'un mélange d'amidon, de maltose et de spécimen de LK 2, préparé dans l'exemple A-7, de manière à avoir une teneur en LK 2 de 200 000 unités par comprimé (100 mg), puis on enrobe les comprimés avec de l'ester phtalique de méthyl cellulose.

55 Ces comprimés peuvent être avantageusement utilisés seuls, ou comme renforçateur en combinaison avec un produit chimiothérapeutique comme doxorubicine, fluoro-uracile ou mitomycine C, pour le traitement du carcinome du côlon et du carcinome du foie.

60 Exemple C-1

Des souris sont immunisées comme dans l'expérimentation A-2, à ceci près que l'on utilise comme antigène un LK 2 très pur, obtenu par le procédé décrit dans l'expérimentation A-3. Ensuite, des cellules de rate de ces animaux sont mises en suspension avec une lignée 65 de myélome de souris, P3-NS-1/1-Ag4-1, un produit de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Japon, dans une solution saline renfermant 140 mM de NaCl, 54 mM de KCl, 1 mM de NaH₂PO₄ et 2 mM de CaCl₂, de manière à avoir des densités cellulaires respecti-

ves de 10^4 cellules/ml. On ajoute à cette suspension cellulaire une solution saline fraîche de même composition, mais renfermant en plus du virus Sendai, préalablement inactivé par une irradiation aux UV, avec refroidissement à la glace, et on laisse reposer ce mélange pendant 5 reprises. Puis on le dilue environ 20 fois dans un milieu RPMI 1640 à 37°C , et les cellules d'hybridome capables de produire l'anticorps anti-LK 2, sont clonées comme dans l'expérimentation A-2. Les cellules d'hybridome clonées sont transplantées par voie intrapéritonéale dans des hamsters âgés de 7 jours (environ 10^7 cellules par hamster) dont l'immunoréaction a été affaiblie par des modes opératoires classiques, et l'on récupère l'anticorps monoclonal à partir des corps des animaux comme dans l'expérimentation A-2.

Tout comme l'anticorps monoclonal préparé dans l'expérimentation A-2, le produit présente une neutralisation immunologiquement spécifique de l'activité cytotoxique de LK 2.

La stabilité de l'anticorps monoclonal en solution aqueuse est étudiée par dosage des activités neutralisantes résiduelles après mise à incuber dans les conditions prescrites: lors d'une incubation à pH 7,2 et de différentes températures pendant 30 minutes, 80% ou plus de l'activité est conservée à 60°C ; mais 90% ou plus est perdue à 70°C . Après incubation à 4°C et différentes valeurs de pH pendant 16 heures, l'activité reste stable dans un intervalle de pH compris entre 2 et 11.

Lors de l'étude de plusieurs propriétés de l'anticorps monoclonal, on constate que l'anticorps monoclonal selon l'invention résiste au mercapto-2 éthanol, et suscite une réaction spécifique antigène-anticorps avec un anticorps anti-immunoglobuline de souris. Ainsi, l'anticorps monoclonal selon l'invention se classe-t-il dans le groupe des anticorps de l'immunoglobuline.

Exemple C-2

Un anticorps anti-LK 2 monoclonal est préparé comme dans l'exemple C-1, à ceci près que l'on remplace P3-NS-1/1-Ag4-1 par une lignée de myélome de souris, SP2/0-Ag14, provenant de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Japon.

Lors de la neutralisation immunologiquement spécifique par l'anticorps monoclonal de l'activité cytotoxique de LK 2, on obtient des résultats semblables à ceux de l'exemple C-1. Ainsi, l'anticorps monoclonal se situe-t-il dans la classe des anticorps d'immunoglobuline G.

Il est bien entendu que la description détaillée et les exemples particuliers indiquant des formes de réalisation préférées de l'invention ne sont donnés qu'à titre d'illustration; différents changements et modifications possibles apparaîtront à l'homme de l'art en partant de cette description détaillée, sans sortir du cadre de l'invention.