

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 24269

(54) Production d'hormone de stimulation de la thyroïde humaine.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 37/32; C 07 G 15/00.

(22) Date de dépôt..... 28 décembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 30 décembre 1980, n° 187010/1980.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 26 du 2-7-1982.

(71) Déposant : Société dite : KK HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO, résidant au Japon.

(72) Invention de : Kaname Sugimoto.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Armand Kohn,
5, av. Foch, 92380 Garches.

La présente invention concerne un procédé pour la production d'hormone stimulant la thyroïde humaine, ci-après désignée en abrégé par HSTh.

HSTh est une hormone secrétée par les cellules
5 basophiles, humaines, du lobe antérieur de la glande hypophysaire, qui stimule la croissance de la glande thyroïde et la fixation de l'iode dans les autres hormones humaines ; elle active l'ATPase. A ce jour, il n'existe pas de procédé de production à l'échelle industrielle de HSTh
10 à bas prix.

La présente invention est basée sur la constatation inattendue, que certains lymphoblastoïdes humains, capables de produire cette hormone, conviennent pour la production industrielle de HSTh, en raison de leur vitesse
15 de multiplication, et de leur taux de production d'hormone par cellules, très élevés.

Le nouveau procédé selon l'invention de production de HSTh consiste à multiplier des lymphoblastoïdes humains, capables de produire cette hormone, par transplantation de ces cellules dans le corps d'un animal à
20 sang chaud, ou en fournissant à ces cellules, à l'aide d'un dispositif, le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud et à laisser les cellules humaines, ainsi multipliées, par l'un ou l'autre procédé, libérer l'hormone
25 HSTh.

Le procédé selon l'invention, tout en aboutissant à une production supérieure en HSTh n'exige que peu ou pas de milieu nutritif contenant du sérum coûteux pour la multiplication cellulaire, et il permet de maintenir
30 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 HSTh, peuvent être facilement multipliés, grâce à l'utilisation de fluide corporel nutritif, provenant d'un animal à sang chaud, par transplan-

tation 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.

5 Ce procédé est également caractérisé par une multiplication des cellules plus stable et plus élevée, et par une production supérieure de HSTh par cellule.

Conviennent, conformément à l'invention, tous les lymphoblastoïdes humains dans la mesure où ils produi-
10 sent HSTh 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 de HSTh, des cellules humaines qui produisent par nature cette hormone, ce sont notamment
15 des cellules basophiles du lobe antérieur de la glande hypophysaire, des cellules de tumeurs hypophysaires ou des cellules d'adénome chromophile de la glande hypophysaire, ou des cellules humaines, qui produisent de l'HSTh ectopique comme les cellules du carcinome du poulmon, au
20 moyen de fusion cellulaire utilisant des agents tels que polyéthylène glycol ou virus de Sendai, ou de techniques de recombinaison génétique utilisant ADN ligase, nucléase et ADN polymérase ; et des lymphoblastoïdes humains qui produisent de l'HSTh ectopique. Comme la transplantation
25 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 vivantes de lymphoblastoïdes humains, multipliées,
30 est facile.

Conviennent comme animaux utilisables dans le procédé selon l'invention tous ceux, dans lesquels les lymphoblastoïdes humains peuvent se multiplier, par exemple des volailles comme poulet et pigeon, des mammifères
35 comme chat, chien, singe, chèvre, porc, vache, cheval, la-

pin, cobaye, hamster, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immunoréaction indésirable, il s'avère souhaitable d'utiliser des animaux nouveau-nés ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme oeuf, embryon ou fœtus. Afin de réduire autant que possible 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 lymphoblastoïdes humains.

Une multiplication cellulaire, stabilisée, et une augmentation de la production de HSTh peuvent être à la fois réalisées par transplantation répétée, utilisant des combinaisons de différents animaux à sang chaud : par exemple, 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 lymphoblastoïdes humains, conviennent tous les sites de l'animal, pourvu que ces cellules puissent s'y multiplier, par exemple la cavité allantoïque, ou les voies intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

A côté de cette transplantation directe des lymphoblastoïdes humains au corps de l'animal, existe la possibilité de faire se multiplier aisément les lignées classiques de lymphoblastoïdes humains capables de produire HSTh, 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 ultra-filtre 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. 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 production cellulaire par hôte est ainsi augmentée à un niveau encore supérieur, rapporté à la durée de vie de l'animal, 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 lymphoblastoïdes humains et les cellules 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, en général 1 à 5 semaines, après l'implantation des cellules. Conformément à l'invention on obtient 10^7 à 10^{12} , ou plus, de lymphoblastoïdes humains par hôte. Autrement dit, le nombre de lymphoblastoï-

des humains implantés 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
5 cellules multipliées sont-elles avantageusement utilisables pour la production d'HSTh.

En ce qui concerne le procédé grâce auquel les lymphoblastoïdes humains multipliés peuvent libérer HSTh on peut employer tout moyen permettant la libération d'
10 HSTh par ces cellules. Par exemple, les lymphoblastoïdes humains, obtenus par multiplication en ascite, en suspension, et récolte à partir 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
15 atteindre une concentration de 10^4 à 10^8 cellules par ml dans un milieu nutritif, préchauffé à une température de l'ordre de 20°C à 40°C , puis mis à incuber à cette température pendant 1 à 100 heures, pour produire HSTh. L'augmentation de la production d'HSTh peut être réalisée par
20 la présence d'un ou de plusieurs des composés suivants : amino-acides comme lysine, arginine, glycine, leucine ou cystéine ; des sels minéraux comme chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, et sulfate de magnésium ; et des hormones comme l'hormone libératrice de thyrotropine.

25 La production simultanée d'autres hormones humaines comme l'hormone stimulant les follicules (en abrégé HSFh) et la gonadotropine chorionique, humaine (en abrégé GCh), peut être réalisée conformément à l'invention.

30 L'HSTh, 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 pro-
35 duit encore plus pur, on peut obtenir une préparation de

pureté supérieure par combinaison des techniques mention-
nées plus haut avec d'autres modes opératoires classiques,
tels qu'adsorption et désorption avec échange d'ions, fil-
tration sur gel, chromatographie par affinité, fractionne-
5 ment au point isoélectrique et électrophorèse.

La préparation d'HSTh, ainsi obtenue, peut être
avantageusement utilisée, seule ou en combinaison avec un
ou plusieurs agents, pour injection, administration ex-
terne, interne ou de diagnostic, pour la prévention ou
10 le traitement de maladies humaines.

Au cours de la présente description, la produc-
tion de HSTh est dosée par le procédé de radio-récepteur
décrit par S.W. Manley et coll., J. Endocrinol., Vol., 61,
pp. 419-436 (1974) et est exprimée en Unités Internationa-
15 les (UI) par rapport à la préparation étalon d'HSTh dispo-
nible au National Institute of Medical Research (Angleter-
re). La production simultanée de HSFh est dosée par le
procédé de radio-immuno-essai décrit par C. Faiman, R.J.
Ryan, J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 27, pp. 444-447
20 (1967) et est exprimée en Unité Internationale (UI). De
même, la production de GCh est dosée par le procédé de
radio-immuno-essai décrit par A.R. Midgley Jr., Endocri-
nology, Vol. 79, pp. 10-18 (1966), et est exprimée en Uni-
tés Internationales (UI).

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

EXEMPLE 1

Des cellules d'adénome basophile humain désagrégé,
obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant
30 d'adénome basophile du lobe antérieur de l'hypophyse, sui-
vie de hachage, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémi-
ques, humains, de Namalwa, sont mises en suspension ense-
mble 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 ,
35 de manière à obtenir des concentrations cellulaires res-

pectives 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'ultra-violet, le tout est transféré 5 minutes après le mélange dans un incubateur à 37°C , et y est agité pendant 30 minutes pour réaliser la fusion cellulaire, introduisant l'aptitude à produire l'HSTh des cellules d'adénome basophile, humain, dans la lignée des lymphoblastoïdes leucémiques, humains. Après clonage selon un procédé classique de la souche de cellules d'hybridome, capable de produire l'HSTh, 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, désagrégées par hachage et mises en contact avec de la trypsine. Après lavage des cellules avec du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum foetal 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 l'on met à incuber à 37°C pendant 35 heures environ pour obtenir HSTh. Les cellules sont ensuite soumises aux ultra-sons, et la quantité d'HSTh présente dans la partie surnageante est dosée. La production d'HSTh est d'environ 180 mUI/ml de suspension cellulaire. La production simultanée d'HSFh est de l'ordre de 500 mUI/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues par culture in vitro de cellules d'adénome basophile, humain, à 37°C , dans du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum foetal de veau, sont traitées comme plus haut pour produire HSTh. Cette production n'est que voisine de 0,3 mUI/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 2

- Des cellules d'adénome chromophile humain, désagrégé, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant d'adénome chromophile de l'hypophyse, suivie de hachage, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, JBL, sont mises à fusionner comme dans l'exemple 1, introduisant ainsi l'aptitude à produire de l'HSTh des cellules d'adénome chromophile humain, dans la lignée des lymphoblastoïdes leucémiques, humains. Après clonage par procédé classique de la souche de cellules d'hybridome capable de produire l'HSTh, on l'implante par voie sous-cutanée chez des hamsters nouveau-nés, ayant préalablement reçu de l'antisérum, préparé à partir d'un lapin, selon un procédé classique, afin de réduire leur immunoréaction ; ces 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 désagrégées par hachage, puis mises en suspension dans du sérum physiologique contenant de la collagénase. Après lavage des cellules avec du milieu minimal, essentiel de Eagle (pH 7,4), additionné de 5% vol./vol. de sérum humain, ces cellules sont remises en suspension pour donner une concentration de l'ordre de 10^6 cellules/ml, dans une préparation fraîche du même milieu, contenant 20 mM de L-lysine, 10 mM de sulfate de magnésium et 10 ng d'hormone libératrice de thyrotropine, puis mises à incuber à 37°C pendant 20 heures pour produire de l'HSTh. La production de cette hormone est d'environ 220 mIU/ml de suspension cellulaire.
- La production simultanée de GCh est de l'ordre de 430 UI/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 de HSTh n'est que de 8 mUI/ml de suspension

cellulaire.

EXEMPLE 3

A des rats nouveau-nés on implante, par voie intraveineuse, une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, de BALL-1, dans laquelle l'aptitude à produire de l'HSTh de cellules d'adénome basophile humain 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 HSTh. La production d'HSTh est voisine de 160 mUI/ml de suspension cellulaire.

La production simultanée d'HSFh est d'environ 900 mUI/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues comme dans l'exemple 1 par culture in vitro de lignée fusionnée de lymphoblastoïdes leucémiques humains BALL-1, sont traitées comme plus haut. La production d'HSTh n'est que de 5 mUI/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 4

Après avoir subi une irradiation de 400 rems environ de rayon-X, pour la réduction de l'immunoréaction, des souris adultes reçoivent par voie sous-cutanée des implants de lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, NALL-1, dans laquelle l'aptitude à produire l'HSTh des cellules d'adénome chromophile humain a été introduite comme dans l'exemple 1 ; puis on nourrit les souris 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 l'HSTh. La production de cette hormone est d'environ 210 mUI/ml de suspension cellulaire.

La production simultanée de GCh est de l'ordre de 480 UI/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 de HSTh n'est que de 7 mUI/ml de suspension cellulaire, environ.

5 EXEMPLE 5

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, TALL-1, dans laquelle l'aptitude à produire de l'HSTh des cellules d'adénome basophile humain, a été introduite comme dans l'exemple 1, est mise en suspension dans
10 du sérum physiologique, puis le tout est transféré dans une chambre de diffusion cylindrique en matière plastique, dont le volume inférieur 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,
15 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 7×10^8 cellules/ml, ce qui est environ 10^2 fois supérieur, ou même plus, à ce qu'on atteint avec une culture
20 in vitro à l'aide d'un incubateur à CO_2 . Les lymphoblastoïdes humains, ainsi obtenus, sont traités comme dans l'exemple 2, pour produire HSTh. Cette production est de l'ordre de 170 mUI/ml de suspension cellulaire.
25 La production simultanée de GCh est voisine de 720 UI/ml de suspension cellulaire.

Les cellules témoins, obtenues par mise en suspension dans du sérum physiologique de cellules d'adénome basophile humain, transfert de la suspension de cellules résultante
30 dans la chambre de diffusion, inclusion par voie intrapéritonéale de la chambre dans un rat, alimentation de ce dernier de manière habituelle pendant 4 semaines, et récolte des cellules de lymphoblastoïdes humains multipliées (densité environ 8×10^6 cellules/ml), sont traitées comme
35 plus haut. La production en HSTh n'est que de 0,1mUI/ml de

suspension cellulaire.

EXEMPLE 6

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de l'HSTh
5 des cellules de carcinome de poumon, humain, a été introduite comme dans l'exemple 1, est implantée dans la cavité allantoïque d'oeufs embryonnés, préalablement mis à incu-
ber à 37°C pendant 5 jours. Après incubation des oeufs embryonnés à cette température, pendant 1 semaine supplémen-
10 taire, les lymphoblastoïdes humains, multipliés, sont récoltés et traités comme dans l'exemple 1 pour produire HSTh. Cette production est voisine de 140 mUI/ml de suspension cellulaire.

Lors de l'expérimentation témoin, au cours de laquelle des
15 cellules de carcinome du poumon humain sont implantées dans les cavités allantoïques d'oeufs embryonnés, on n'observe pas de multiplication cellulaire.

Revendications

1. Procédé pour la production d'hormone stimulante de la thyroïde humaine (HSTh), par multiplication de lymphoblastoïdes humains, capables de produire HSTh et libération de cette hormone par des 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 à ce que les cellules de l'hôte animal ne la contaminent pas.

5. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les lymphoblastoïdes humains, capables de produire HSTh, sont des cellules d'hybridome obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains, avec des cellules humaines capables de produire HSTh.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules d'hybridome sont obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains avec des cellules de carcinome du poulmon humain.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules d'hybridome sont obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains avec

des cellules d'adénome chromophile humain.

8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules d'hybridome sont obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains avec
5 des cellules d'adénome basophile humain.

9. Procédé selon une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée leucémique.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en
10 ce que la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains, est une lignée de Namalwa, de NALL-1, de BALL-1, de TALL-1 ou JBL.

11. Procédé selon une des revendications 1 à 10, caractérisé par la production simultanée d'hormone gonadotrope, chorionique, humaine (GCh).
15

12. Procédé selon une des revendications 1 à 11, caractérisé par la production simultanée d'hormone de stimulation des follicules humains (HSFh).

13. Procédé selon une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'on laisse les lymphoblastoïdes humains multipliés, libérer l'HSTh, en présence d'un ou de plusieurs des produits suivants : leucine, glycine, lysine, arginine, cystéine, chlorure de sodium, chlorure de potassium, chlorure de calcium, sulfate de magnésium et
20 hormone libératrice de thyrotropine.

14. Procédé selon une des revendications 1 à 13, 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, lapin, rat, cobaye, hamster, souris ou souris nue.
30