



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

①9

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

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

①1 **CH 652 747 A5**

⑤1 Int. Cl.4: C 12 P 21/02
C 07 K 7/04
C 12 N 15/00
C 12 N 5/02

// A 61 K 37/32 (C 12 P 21/02,
C 12 R 1:91)

①2 **FASCICULE DU BREVET** A5

②1 Numéro de la demande: 8155/81

②2 Date de dépôt: 21.12.1981

③0 Priorité(s): 30.12.1980 JP 55-187010

②4 Brevet délivré le: 29.11.1985

④5 Fascicule du brevet
publié le: 29.11.1985⑦3 Titulaire(s):
Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku
Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)⑦2 Inventeur(s):
Sugimoto, Kaname, Okayama-shi/Okayama (JP)⑦4 Mandataire:
Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel⑤4 **Production d'hormone de stimulation de la thyroïde humaine.**

⑤7 Le procédé de production d'hormone stimulant la thyroïde humaine, HSTh, consiste à faire se multiplier in vivo, au moyen d'animaux à sang chaud, des lymphoblastoïdes humains, capables de produire HSTh, puis à laisser ces cellules, ainsi multipliées, produire l'hormone stimulant la thyroïde humaine.

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

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la production d'hormone 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 que les cellules de l'hôte animal ne la contaminent pas.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par la production simultanée d'hormone gonadotrope, chorionique, humaine, GCh.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par la production simultanée d'hormone de stimulation des follicules humains HSFh.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, 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, sulfate de magnésium et hormone libératrice de thyrotropine.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, 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.

9. Procédé selon l'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 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 de préparation des lymphoblastoïdes humains utilisés dans le procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les lymphoblastoïdes humains capables de produire HSTh 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 HSTh.

12. Procédé selon la revendication 11, 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 poumon humain.

13. Procédé selon la revendication 11, 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.

14. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules d'hybridome sont obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes humains avec des cellules d'adénome basophile humain.

15. Procédé de préparation des lymphoblastoïdes humains du procédé selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes humains est une lignée leucémique.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains est une lignée de Namalwa, de Nall-1, de Ball-1, de 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 stimulante la thyroïde humaine, ci-après désignée en abrégé par HSTh.

HSTh est une hormone sécrétée par les cellules 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 à bas prix.

La présente invention est fondée 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 de multiplication et de leur taux de production d'hormone par cellules très élevés.

Le nouveau procédé est donc 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 HSTh, 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 HSTh 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 HSTh par cellule.

L'invention concerne en plus un procédé selon la préambule de la revendication 11, ce procédé étant caractérisé par la partie caractérisante de cette revendication.

Conviennent tous les lymphoblastoïdes humains dans la mesure où ils produisent 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 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 poumon, au moyen d'une fusion cellulaire utilisant des agents tels que polyéthylène glycol ou virus de Sendaï, 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 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 multipliés 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 comme chat, chien, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, cobaye, hamster, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immunoréaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser des animaux nouveau-nés ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme œuf, embryon ou fœtus. Afin de réduire 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 greffer 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.

À 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 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. 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. On peut obtenir 10^7 à 10^{12} ou plus de lymphoblastoïdes humains par hôte. Autrement dit, le nombre de lymphoblastoïdes 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 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'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 récolté 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, pour produire HSTh. L'augmentation de la production d'HSTh peut être réalisée par la présence d'un ou plusieurs des composés suivants: aminoacides comme lysine, arginine, glycine, leucine ou cystéine, des sels miné-

raux comme chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, et sulfate de magnésium, et des hormones comme l'hormone libératrice de thyrotropine.

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

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 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'HSTh ainsi obtenue peut être avantageusement utilisée, seule ou en combinaison avec un ou plusieurs agents, pour injection, administration externe, interne ou de diagnostic, pour la prévention ou le traitement de maladies humaines.

Au cours de la présente description, la production de HSTh est dosée par le procédé de radiorécepteur décrit par S. W. Manley et coll., «J. Endocrinol.», vol. 61, pp. 419-436 (1974) et est exprimée en unités internationales (UI) par rapport à la préparation étalon d'HSTh disponible au National Institute of Medical Research (Angleterre). 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 (1967) et est exprimée en unités internationales (UI). De même, la production de GCh est dosée par le procédé de radio-immuno-essai décrit par A. R. Midgley Jr., «Endocrinology», vol. 79, pp. 10-18 (1966), et est exprimée en unités internationales (UI).

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

Exemple 1:

Des cellules d'adénome basophile humain désagrégé, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant d'adénome basophile du lobe antérieur de l'hypophyse, 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 NaH_2PO_4 et 2 mM de CaCl_2 , 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'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 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 l'on met à incuber à 37°C pendant 35 h environ pour obtenir HSTh. Les cellules sont ensuite soumises aux ultrasons, 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 fœtal 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 h pour produire de l'HSTh. La production de cette hormone est d'environ 220 mUI/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 rayons X pour la réduction de l'immunoréaction, des souris adultes reçoivent par voie sous-cutanée des implants de lignée de lymphoblastoï-

des 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.

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 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 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 *in vitro* à l'aide d'un incubateur à CO₂. 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.

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 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 plus haut. La production en HSTh n'est que de 0,1 mUI/ml de suspension cellulaire.

Exemple 6:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire de l'HSTh des cellules de carcinome de 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 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 cellules de carcinome du poumon humain sont implantées dans les cavités allantoïques d'œufs embryonnés, on n'observe pas de multiplication cellulaire.