



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪

⑪ CH 652 749 A5

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

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

⑤① Int. Cl.⁴: C 12 P 21/02
C 07 K 7/36
C 12 N 15/00
C 12 N 5/02

// A 61 K 37/30 (C 12 P 21/02,
C 12 R 1:91)

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 8326/81

㉔ Date de dépôt: 29.12.1981

㉓ Priorité(s): 30.12.1980 JP 55-187012

㉒ Brevet délivré le: 29.11.1985

㉑ Fascicule du brevet
publié le: 29.11.1985

㉒ Titulaire(s):
Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku
Kenkyujo, Okayama-shi/Okayama (JP)

㉒ Inventeur(s):
Sugimoto, Kaname, Okayama-shi/Okayama (JP)

㉒ Mandataire:
Patentanwaltsbüro Eder & Cie., Basel

㉒ Production de calcitonine humaine.

㉒ Le procédé de production de calcitonine humaine, CTh, consiste à faire se multiplier in vivo, au moyen d'animaux à sang chaud, des cellules humaines capables de produire la CTh, puis à laisser les cellules, ainsi multipliées, libérer cette hormone.

Les rendements CTh sont ainsi bien supérieurs à ceux que l'on obtient par un procédé classique de culture de tissus in vitro; ils rendent possible son utilisation en quantités suffisantes, pour la prévention et le traitement de maladies humaines.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la production de calcitonine humaine CTh par multiplication de cellules humaines capables de produire cette hormone et libération de la calcitonine par les cellules multipliées, caractérisé en ce qu'on utilise, pour la multiplication cellulaire, un animal à sang chaud.

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

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

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

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on laisse les cellules humaines multipliées libérer la CTh, en présence d'un ou de plusieurs des produits suivants: glycine, leucine, lysine, arginine, cystéine, chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, sulfate de magnésium, AMP dibutylcyclique et prostaglandine E.

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

7. Procédé de préparation des cellules humaines utilisées dans le procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les cellules humaines, capables de produire CTh, 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 CTh.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire CTh sont des cellules de thyroïde ou des cellules carcinoïdes.

9. Procédé selon l'une des revendications 7 ou 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 Ball-1, Nall-1, Tall-1 ou JBL.

La présente invention concerne un procédé selon le préambule de la revendication 1, à savoir un procédé de production de calcitonine humaine, ci-après désignée en abrégé par CTh.

CTh est une hormone sécrétée par les cellules parafolliculaires humaines de la glande thyroïde; elle supprime la libération du calcium des os dans le sang, et également la sécrétion d'insuline. A ce jour, il n'existe pas de procédé de production à l'échelle industrielle de CTh à bas prix.

La présente invention est fondée sur la constatation inattendue que l'utilisation de lymphoblastoïdes humains capables de produire la CTh comme producteurs de cette hormone aboutit à un taux de multiplication cellulaire élevé et également à une forte production de CTh par cellule, d'où l'intérêt de cette utilisation.

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

Le procédé selon l'invention, tout en aboutissant à une production supérieure en CTh, 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 CTh 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 CTh par cellule.

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

Convienient tous les lymphoblastoïdes humains dans la mesure où ils produisent CTh et se multiplient aisément dans le corps d'un animal à sang chaud; par exemple, peuvent être utilisés les lymphoblastoïdes humains dans lesquels les sites génétiques codant la production de CTh sont introduits à partir de cellules humaines capables par nature de produire cette hormone comme les cellules parafolliculaires de la glande thyroïde ou les cellules d'adénome de la thyroïde, ou de cellules de tumeurs humaines capables de produire de la CTh ectopique, comme les cellules carcinoïdes ou les cellules de tumeur du poumon, au moyen de la technique de fusion cellulaire utilisant des agents comme polyéthylène glycol ou virus de Sendai, ou au moyen de la technique de recombinaison génétique utilisant des enzymes comme ADNligase, nucléase et ADNpolymérase, ainsi que des lymphoblastoïdes humains capables de produire de la CTh ectopique.

En outre, comme la transplantation au corps de l'animal des lignées de lymphoblastoïdes humains établis mentionnés plus haut aboutit à la formation de tumeurs massives pouvant être facilement désagrégées, et que ces tumeurs ne sont guère contaminées par les cellules de l'hôte animal, la récolte des lymphoblastoïdes humains multipliés vivants est facile.

Convienient comme animaux utilisables tous ceux dans lesquels les cellules peuvent se multiplier, par exemple des volailles comme poulet et pigeon, des mammifères comme chat, chien, singe, chèvre, porc, vache, cheval, lapin, cobaye, hamster, rat, souris ou souris nue. Comme cette transplantation cellulaire provoque une immuno-réaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser des animaux nouveaux-nés, ou en bas âge, ou encore au stade le plus jeune possible, comme œuf, embryon ou fœtus. Afin de réduire l'immuno-réaction, 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'immuno-réaction 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 établies.

Une multiplication cellulaire stabilisée et une augmentation de la production de CTh 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 lymphoblastoïdes humains chez le hamster, où ils 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 de la même 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, convienient 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, établies de lymphoblastoïdes humains, capables de produire CTh 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 mem-

brane 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 lymphoblastoïdes humains. De plus, comme la chambre de diffusion peut être conçue, si nécessaire, pour être placée sur l'hôte animal et permettre au fluide corporel de ce dernier de circuler dans la chambre, les parois de celle-ci peuvent être munies de fenêtres latérales, transparentes, permettant l'observation de la suspension de cellules, ainsi que le remplacement et l'échange avec une chambre fraîche; la multiplication cellulaire est ainsi augmentée à un niveau encore supérieur, rapporté à la durée de vie de l'animal, et la production par animal est encore accrue sans sacrifice de l'hôte. En outre, lorsqu'on utilise cette chambre de diffusion, comme les cellules humaines multipliées peuvent être facilement récoltées et qu'il n'y a pas manifestation d'immunoréaction du fait de l'absence de contact direct entre les 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 lymphoblastoïdes humains peut s'effectuer facilement par procédé classique, même après la transplantation cellulaire, et elle ne nécessite pas de soins particuliers.

La multiplication cellulaire maximale est atteinte environ 1 à 20 semaines après l'implantation des cellules, habituellement 1 à 5 semaines après.

On peut obtenir 10^7 à 10^{12} ou plus de lymphoblastoïdes humains par hôte. Autrement dit, le nombre de cellules humaines implantées chez l'hôte animal s'accroît 10^2 à 10^7 fois ou plus, ou bien est d'environ 10^1 à 10^6 fois ou plus celui que l'on obtient avec un procédé de culture de tissu *in vitro*, utilisant un milieu nutritif; aussi ces lymphoblastoïdes sont-ils avantageusement utilisables pour la production de CTh.

En ce qui concerne le procédé grâce auquel les lymphoblastoïdes humains, multipliés par l'un des modes opératoires décrits plus haut, peuvent libérer CTh, on peut employer tout moyen permettant la libération de cette hormone à partir de 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 atteindre une concentration de 10^4 à 10^8 cellules/ml dans un milieu nutritif, maintenus à une température de l'ordre de 20 à 40°C, puis mis à incuber à cette température pendant 1 à 100 h, pour libérer CTh.

Afin d'augmenter la production de CTh à partir des lymphoblastoïdes humains, on peut ajouter, au milieu nutritif mentionné plus haut, un inducteur de CTh, par exemple un aminoacide comme lysine, arginine, glycine, cystéine et leucine, des sels minéraux comme chlorure de sodium, de potassium ou de calcium, et sulfate de magnésium et des hormones comme AMP dibutylcyclique et prostaglandine E.

La CTh ainsi obtenue peut être recueillie facilement grâce aux 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 CTh 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 de CTh 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 CTh dans le milieu de culture est dosée par le procédé de radio-immuno-essai décrit par N.A. Samaan et coll., «J. Lab. Clin. Med.», vol., 81, pp. 671-681 (1973),

et est exprimée en poids déterminé par rapport à la courbe dose-réponse obtenue avec une préparation de calcitonine de référence, disponible à l'Organisation mondiale de la Santé.

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

Exemple 1:

Des cellules de thyrophyma humain haché et désagrégé et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa sont mises en suspension ensemble dans un récipient avec une solution saline contenant 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 mis à incuber sous agitation pendant 30 min pour réaliser la fusion cellulaire, introduisant l'aptitude à produire CTh dans la lignée des lymphoblastoïdes humains de Namalwa. Après clonage selon un procédé classique de la lignée de cellules d'hybridome capable de produire CTh, 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 suspension dans du sérum physiologique contenant 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 bovidé, les cellules sont remises en suspension, à une concentration de 10^5 cellules/ml, dans une préparation fraîche du même milieu qui contient 20 mM de CaCl_2 et 30 mM de L-arginine, et l'on met à incuber à 37°C pendant 40 h environ pour obtenir CTh. Les cellules sont ensuite soumises aux ultrasons, et la quantité de CTh présente dans la partie surnageante est dosée. La production de CTh est d'environ 4,4 µg/ml de suspension. Les cellules témoins, obtenues par culture *in vitro* de cellules de thyrophyma humain, dans du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionné de 10% en volume/volume de sérum fœtal de bovidé, et mises à incuber à 37°C, sont traitées comme plus haut pour produire CTh. Cette production n'est que voisine de 10 ng/ml de suspension.

Exemple 2:

Des cellules carcinoïdes humaines hachées et désagrégées, obtenues par extraction à partir d'un patient souffrant d'argentaffinoma des bronches, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL sont fusionnées comme dans l'exemple 1, introduisant ainsi l'aptitude à produire CTh dans la lignée de lymphoblastoïdes humains JBL. Après clonage selon un procédé classique de la lignée de cellules d'hybridome capable de produire CTh, on l'implante par voie sous-cutanée chez des hamsters nouveau-nés, ayant préalablement reçu par injection de l'antisérum préparé à l'aide de lapin selon un procédé classique, puis les animaux sont nourris de manière habituelle pendant 3 semaines.

Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant environ 10 g chacune, sont extraites, hachées et mises en suspension dans du sérum physiologique contenant de la collagénase pour les désagréger. Après lavage avec du milieu de Eagle (pH 7,4) minimal essentiel additionné de 5% volume/volume de sérum humain, les cellules d'hybridome sont remises en suspension, de manière à obtenir une concentration de l'ordre de 10^6 cellules/ml, dans une préparation fraîche du même milieu, contenant 10 mM de CaCl_2 , 40 mM de SO_4Mg et 0,1 mM de dibutylcyclique AMP; on met alors à incuber à 37°C pendant 30 h, pour produire CTh. La production de cette hormone est de l'ordre de 3,7 µg/ml de suspension. L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1 par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes humains fusionnés JBL, dans laquelle a été introduite l'aptitude à produire CTh, et abandon des cel-

lules multipliées pour libérer CTh. La production de cette hormone n'est que d'environ 60ng/ml de suspension.

Exemple 3:

A des rats nouveau-nés on implante, par voie intraveineuse, une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Ball-1, dans laquelle l'aptitude à produire CTh de cellules de thyrophyma 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 libérer CTh. La production de cette hormone est voisine de 4,1 µg/ml de suspension. L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1, par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains fusionnés Ball-1, dans laquelle est introduite l'aptitude à produire CTh, et abandon de la lignée de cellules multipliées pour laisser se libérer CTh. La production de cette hormone n'est que d'environ 85 ng/ml de suspension.

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 d'une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Nall-1, dans laquelle l'aptitude à produire CTh des cellules de tumeur du poumon humain a été introduite comme dans l'exemple 2, puis on nourrit les animaux de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant environ 15 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 2, pour libérer CTh. La production est de l'ordre de 5,2 µ/ml de suspension.

L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 2 par culture *in vitro* de la lignée de lymphoblastoïdes humains Nall-1, dans laquelle est introduite l'aptitude à produire CTh, et traitement des cellules multipliées pour libérer cette hormone. La production n'est que de l'ordre de 90 ng/ml de suspension.

Exemple 5:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains Tall-1, dans laquelle l'aptitude à produire CTh des cellules de thyrophyma

a été introduite comme dans l'exemple 1, est mise en suspension dans du sérum physiologique, puis le tout est transféré dans une chambre de diffusion cylindrique en matière plastique, dont le volume intérieur est de l'ordre de 10 ml, muni d'une membrane filtrante ayant une dimension de diamètre 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 cellules humaines ainsi obtenues sont traitées comme dans l'exemple 2, pour libérer CTh. La production de cette hormone est de l'ordre de 3,1 µg/ml de suspension.

L'expérimentation témoin est réalisée, comme plus haut, par mise en suspension des cellules de thyrophyma humain dans une chambre de diffusion, qui est ensuite incluse par voie intrapéritonéale dans un rat adulte, que l'on nourrit de manière habituelle pendant 4 semaines. La densité de cellules humaines ainsi obtenues au cours de cet essai est de l'ordre de 6×10^6 cellules/ml. Ces cellules sont traitées comme dans l'exemple 2 pour libérer CTh. La production de cette hormone n'est que d'environ 15 ng/ml de suspension.

Exemple 6:

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire CTh des cellules carcinoïdes humaines 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 cellules humaines multipliées sont récoltées et traitées comme dans l'exemple 1 pour libérer CTh. La production de cette hormone est voisine de 2,6 µg/ml de suspension.

Bien que l'essai témoin ait été réalisé comme plus haut, par implantation de cellules carcinoïdes humaines dans les cavités allantoïques d'œufs embryonnés, on n'y observe aucune multiplication cellulaire.