

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 81 14524

⑤4 Production d'hormone de croissance humaine.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 21/00; A 61 K 37/36; C 12 N 5/00.

⑫ Date de dépôt..... 27 juillet 1981.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : Japon, 31 juillet 1980, n° 105273/1980.

④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 5-2-1982.

⑦1 Déposant : Société dite : KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KEN-
KYUJO, 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 amélioré pour la production d'hormone de croissance humaine, ci-après désignée par hGH.

Les procédés classiques connus de production d'hGH, 5 tels que synthèse chimique, culture de tissus in vitro, ou culture de microorganismes recombinés génétiquement, n'aboutissent qu'à de très faibles rendements, avec un coût élevé.

La présente invention permet d'éviter ces inconvénients de l'art antérieur. Elle est basée sur la constatation 10 que l'on peut obtenir de façon inattendue des cellules humaines capables de produire de l'hGH en quantité de 2 à 50 fois supérieure, par cellule, à celle que l'on obtient lors de culture de tissus in vitro, grâce à la multiplication de cellules humaines, capables de produire de l'hGH, réalisée au moyen 15 d'animaux à sang chaud.

Le nouveau procédé selon l'invention de production d'hGH consiste à multiplier des cellules humaines capables d'effectuer une telle production, en les transplantant dans le corps d'un animal à sang chaud, ou bien en les laissant se 20 multiplier dans un dispositif, dans lequel leur est apporté le fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud, puis à exposer les cellules multipliées par l'un des modes opératoires précédents de multiplication, à l'action d'un inducteur de hGH.

25 Le procédé selon l'invention, en dehors du fait qu'il permet une production plus forte d'hGH, ne nécessite pas ou très peu de milieu nutritif contenant du serum coûteux, pour la multiplication des cellules, et facilite, bien plus que dans le cas des cultures de tissus in vitro, la conserva- 30 tion du milieu de culture au cours de la multiplication cellulaire. En particulier, toutes les cellules humaines, capables de produire de l'hGH, peuvent se multiplier facilement, grâce au fluide corporel nutritif, fourni par un animal à sang chaud, soit par transplantation de ces cellules à l'ani- 35 mal, soit par la mise en suspension de ces cellules dans une

chambre de diffusion conçue pour recevoir le fluide corporel nutritif, l'animal étant nourri à la manière habituelle. Ce procédé est également caractérisé par une multiplication des cellules plus stable et plus élevée, et par une production
5 supérieure d'hGH, par cellule.

Les cellules qui conviennent conformément à l'invention sont des cellules productrices d'hGH qui se multiplient facilement dans le corps d'animaux à sang chaud. On peut citer notamment les cellules humaines qui produisent par nature de
10 l'hGH, comme les cellules acidophiles humaines, intactes, provenant de l'hypophyse antérieure, celles qui sont transformées par le virus E B ou l'irradiation aux rayons X, et des cellules acidophiles d'adénome provenant d'un malade souffrant d'adénome acidophile de l'hypophyse ; les cellules
15 de carcinome du poumon humain, qui produisent de l'hGH ectopique ; et des lignées de cellules établies, des cellules ci-dessus, sont facilement réalisables selon l'invention. De même, l'utilisation de lignées de lymphoblastoïdes humains établis, facilement conservables, introduites avec les gènes
20 dominants la production d'hGH, au moyen de techniques de recombinaison génétique avec utilisation d'enzymes tels que ADN-ligase, nucléase et ADN-polymérase, ou par fusion cellulaire, utilisant des agents tels que polyéthylène glycol ou virus de Sendai, aboutit commodément à une multiplication
25 cellulaire remarquablement supérieure, lorsque leurs cellules sont transplantées dans le corps d'animaux à sang chaud, et à une production, par cellule, d'hGH, 2 à 10 fois supérieure. En outre, comme la transplatation des lignées de lymphoblastoïdes humains établis, mentionnés plus haut, au corps de
30 l'animal, entraîne la formation de tumeurs massives, et que ces tumeurs massives ne sont guère contaminées par les cellules de l'hôte animal, et sont désagrégées facilement, les cellules de lymphoblastoïdes humains multipliées, vivantes, peuvent être facilement récoltées.

35 Comme animaux utilisables conformément à l'inven-

tion, conviennent tous les animaux, dans lesquels les cellules peuvent se multiplier, et avantageusement les volailles comme poulet et pigeon et des mammifères comme chien, chat, singe, chèvre, cochon, vache, cheval, lapin, cobaye, rat, hamster, 5 souris et souris nue. Comme cette transplantation cellulaire fait naître une immunoréaction indésirable, il est souhaitable d'utiliser un animal nouveau-né ou en bas âge, ou au stade le plus jeune possible comme oeuf, embryon ou fœtus. Afin de réduire l'immunoréaction, l'animal peut être traité avant la 10 transplantation cellulaire, par une irradiation aux rayons X ou de l'ordre de 200 à 600 rem, ou recevoir une injection d'antiserum ou d'agent immunosuppresseur, préparé selon le procédé classique. Comme la souris nue, utilisée comme animal à sang chaud, présente une immunoréaction plus faible, même 15 à l'état adulte, on peut y transplanter commodément et laisser s'y multiplier rapidement, sans prétraitement, toutes les cellules humaines établies.

Une multiplication cellulaire stabilisée et une augmentation de la production d'hGH, peuvent être réalisées 20 par transplantation répétée, utilisant une combinaison de différents animaux à sang chaud ; par exemple, ces objectifs peuvent être atteints par implantation d'abord de cellules humaines chez un hamster, où elles se multiplient, puis par réimplantation chez la souris nue. En outre, la transplanta- 25 tion répétée peut s'effectuer avec des animaux de la même classe ou division, aussi bien qu'avec ceux de la même espèce ou du même genre.

L'endroit, où les cellules humaines sont implantables peut être tout site de l'animal où les cellules se multi- 30 plient ; par exemple la cavité allantoïque, les voies intraveineuses, intrapéritonéale ou sous-cutanée.

En dehors de cette transplantation directe des cellules dans le corps d'un animal, toutes les cellules humaines établies, classiques, capables de produire de l'hGH, 35 peuvent se multiplier grâce à l'utilisation de fluide corporel

nutritif, apporté par le corps d'un animal par inclusion, par exemple par voie intrapéritonéale, dans le corps de l'animal d'une chambre de diffusion classique, de taille et de forme variées, munie d'une membrane poreuse filtrante, d'un ultra-
5 filtre, ou de fibre creuse, dont la dimension des pores a un diamètre de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-5} m, qui empêche la contamination par pénétration des cellules de l'hôte, à l'intérieur de la chambre de diffusion, et permet l'apport du fluide corporel nutritif de l'animal aux cellules. De plus, comme la
10 chambre de diffusion peut être éventuellement de forme appropriée, elle peut être placée par exemple sur l'hôte animal, pour laisser circuler le fluide corporel du corps de l'animal vers la chambre, ce qui permet l'observation de la suspension de cellules dans la chambre par une ou plusieurs fenêtres latérales transparentes, prévues dans la paroi de cette chambre,
15 ainsi que le remplacement par échange avec une chambre fraîche ; de cette façon la multiplication cellulaire augmente à un niveau encore supérieur par rapport à la durée de vie de l'animal, et la production de cellules par animal est encore
20 augmentée sans sacrifice de l'hôte. En outre, lorsqu'on utilise une telle chambre de diffusion, comme les cellules humaines multipliées peuvent être récoltées facilement, et qu'aucune immunoréaction n'est suscitée en raison de l'absence de contact direct entre les cellules humaines et celles de
25 l'hôte animal, tout animal à sang chaud peut être utilisé comme hôte conformément à l'invention, sans traitement préalable destiné à réduire l'immunoréaction.

L'alimentation de l'hôte animal implanté avec des cellules humaines peut être effectuée facilement par un procédé classique, même après la transplantation de cellules, et
30 ne nécessite aucun soin particulier.

La multiplication maximale des cellules est atteinte au bout de 1 à 20 semaines environ, après la transplantation. Lorsque la lignée de cellules humaines établies, implantée
35 dans l'animal provient d'une tumeur humaine, ou des lignées

de lymphoblastoïdes humains, la multiplication cellulaire maximale est atteinte entre 1 à 5 semaines après la transplantation cellulaire, en raison de leurs vitesses de multiplication très supérieures.

- 5 Conformément à l'invention, le nombre de cellules humaines, obtenues par hôte, s'étage entre 10^7 et 10^{12} ou plus. Autrement dit, le nombre de cellules humaines, transplantées dans le corps de l'animal, est multiplié par 10^2 à 10^7 ou plus, ou est environ égal à 10 à 10^6 fois ou plus,
- 10 celui qui est atteint par le procédé de culture in vitro de tissu, utilisant un milieu nutritif ; il en ressort que ces cellules peuvent être utilisées pour la production d'hGH.

- En ce qui concerne le procédé d'induction de l'hGH, on peut utiliser tout procédé dans lequel les cellules humaines, obtenues par le mode opératoire mentionné plus haut,
- 15 nes, obtenues par le mode opératoire mentionné plus haut, libèrent de l'hGH. Par exemple, les cellules humaines, multipliées, obtenues 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
- 20 de ladite tumeur, sont mises en suspension à une concentration de l'ordre de 10^4 à 10^8 cellules/ml dans un milieu nutritif, maintenues à une température voisine de 20° à 40°C ; elles sont ensuite soumises à cette température à l'action d'un inducteur d'hGH pendant 1 à 20 heures, pour produire l'hGH.
- 25 Les inducteurs préférés d'hormone de croissance sont des amino-acides comme lysine, arginine, tryptophane, leucine, acide casamino et L-DOPA, des métabolites d'acides-amino comme sérotonine, et des peptides.

- L'hGH, ainsi obtenue, peut être recueillie facilement par des techniques de purification et séparation utilisant des modes opératoires classiques tels que relargage, dialyse, filtration, centrifugation, concentration et lyophilisation. Lorsque l'on souhaite disposer d'une préparation d'hGH encore plus purifiée, on peut l'obtenir par une combinaison des techniques mentionnées plus haut, avec des tech-
- 30
- 35

niques classiques comme adsorption et désorption avec échange d'ion, filtration sur gel, chromatographie par affinité, fractionnement au point isoélectrique et électrophorèse.

Comme la préparation d'hGH, ainsi obtenue, est identique immunologiquement à une préparation étalon d'hGH, elle peut être avantageusement utilisée, seule ou en combinaison avec un ou plusieurs agents, pour injection, administration externe, interne, ou diagnostic, en vue de la prévention et du traitement de maladies humaines, aussi bien que pour la stimulation de la croissance humaine.

Dans la présente description, la production d'hGH dans le milieu de culture est dosée par le procédé de radio-immunoessai décrit par S.M. Glick et coll., Nature Vol. 199, page 784 (1963), et est exprimée en poids, rapporté à ceux de la préparation étalon de hGH distribuée par le National Institute of Health.

Les exemples suivants constituent une illustration non limitative de formes de réalisation du procédé selon l'invention.

20 EXEMPLE 1

Des cellules désagrégées d'adénome acidophile humain, obtenues par extraction à partir d'un malade souffrant d'adénome acidophile de la glande hypophysaire, suivi de broyage, sont implantées par voie sous-cutanée à des souris nues adultes, qui sont nourries de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives, résultantes, formées sous la peau et pesant 10g chacune, sont désagrégées par extraction, broyage, puis sont mises en suspension dans du sérum physiologique contenant de la trypsine. Après lavage avec du milieu Earle 199 (pH 7,2), les cellules sont additionnées avec 10% en volume/volume de sérum foetal de bovidé, puis remises en suspension dans une préparation fraîche du même milieu, contenant 30 mM de L-arginine en tant qu'inducteur d'hormone de croissance ; on laisse incubé à 37°C pendant 6 heures pour produire hGH. Les cellules sont alors soumises

aux ultra-sons, et l'hGH surnageant est dosé : sa production est de l'ordre de 500 ng/ml de suspension de cellules.

Les cellules témoin, obtenues par culture in vitro de cellules d'adénome acidophile humain dans du milieu de Earle 199 (pH 7,2), additionnées de 10% en volume/volume de serum foetal de bovidé, et mises à incuber à 37°C, sont traitées comme plus haut avec l'inducteur d'hormone de croissance : la production de hGH n'est alors que de l'ordre de 100 ng/ml de suspension de cellules.

10 EXEMPLE 2

Des cellules désagrégées d'adénome acidophile humain, obtenues par extraction, à partir d'un malade souffrant d'adénome acidophile de la glande hypophysaire, suivi de broyage, et une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa, sont mises ensemble en suspension 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 donner des concentrations cellulaires respectives de l'ordre de 10^3 /ml. Cette suspension, refroidie à la glace, est mélangée avec une préparation de la même solution saline contenant du virus de Sendai préalablement inactivé par irradiation ultra-violette, le tout transféré dans un incubateur à 37°C, environ 5 minutes après le mélange, et y est agité pendant 30 minutes environ pour réaliser la fusion cellulaire, introduisant dans la lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains, l'aptitude des cellules d'adénome acidophile humain à produire de l'hGH. Après clonage selon un procédé classique des cellules d'hybridome capables de produire hGH, ces cellules sont implantées par voie intrapéritonéale dans des souris blanches adultes qui sont ensuite nourries de manière habituelle pendant 5 semaines. Les tumeurs massives résultantes, environ 15 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1, mais les 30 mM de L-argine sont remplacés par de la L-DOPA. La production de hGH est voisine de 1 800 ng/ml de suspension de cellules.

L'expérimentation témoin est conduite comme dans l'exemple 1 par culture in vitro des cellules d'hybridome et exposition des cellules multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de croissance. La production de hGH n'est que de 100 ng/ml de suspension de cellules.

EXEMPLE 3

Après injection d'antiserum, préparé à partir de lapin selon le procédé classique, à des hamsters, nouveau-nés, afin de réduire l'immunoréaction possible, résultant de la transplantation des cellules, on implante à ces animaux, par voie sous-cutanée, une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire l'hGH des cellules d'adénome acidophile humain, est introduite comme dans l'exemple 2 ; les animaux sont ensuite nourris de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives résultantes, formées sous la peau et pesant 10 g chacune, sont ——— extraites et traitées comme dans l'exemple 1. La production de hGH est de l'ordre de 2 000 ng/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est conduite comme dans l'exemple 1 par culture in vitro de lignée de lymphoblastoïdes leucémiques, humains JBL, fusionnés, et exposition des cellules multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de croissance. La production d'hGH n'est que de 200 ng/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 4

A des rats nouveau-nés on implante, par voie intra-veineuse, une lignée de lymphoblastoïdes humains de Namalwa, dans laquelle l'aptitude à produire l'hGH des cellules d'adénome acidophile humain est introduite comme dans l'exemple 2; puis on nourrit les rats de manière habituelle, pendant 4 semaines. Les tumeurs massives résultantes, environ 40 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 1 pour donner l'hGH. La production d'hGH est voisine de 1 500 ng/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1 par culture in vitro de lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains de Namalwa fusionnés, et exposition des cellules multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de croissance. La production de hGH n'est alors que de 100 ng/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 5

Des souris adultes sont irradiées avec environ 400 rem de rayon-X, afin de réduire leurs immunoréaction ; on leur implante, par voie sous-cutanée, des cellules d'adénome acidophile humain, obtenu comme dans l'exemple 1 ; et sont nourries de manière habituelle pendant 3 semaines. Les tumeurs massives, résultantes, formées sous la peau et pesant 15 g chacune, sont extraites et traitées comme dans l'exemple 2 ; la production d'hGH est de l'ordre de 600 ng/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1, par culture in vitro de cellules d'adénome acidophile, et exposition des cellules multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de croissance. La production d'hGH n'est que de l'ordre de 200 ng/ml de suspension cellulaire.

EXEMPLE 6

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude à produire l'hGH des cellules d'adénome acidophile humain est introduite comme dans l'exemple 3, est mise en suspension dans du serum physiologique, et le tout est transféré dans une chambre de diffusion de 10 ml environ de volume interne, munie d'une membrane dont la dimension du diamètre des pores est voisine de $0,5\mu$; cette chambre est incluse par voie intrapéritonéale chez un rat adulte. Cette chambre est enlevée du rat après 4 semaines, durant lesquelles le rat a été nourri à la manière habituelle. La densité en cellules humaines dans cette chambre, atteinte lors de cette opération, est d'environ 5×10^9 cellules/ml, ce qui est 10^3 fois supérieur ou plus, à ce que l'on obtient par

culture in vitro au moyen d'un incubateur à CO₂. Les cellules, ainsi obtenues, sont traitées comme dans l'exemple 1 pour produire hGH ; cette production est d'environ 2 200 ng/ml de suspension cellulaire.

5 L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1, par culture in vitro de lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, et exposition des cellules multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de croissance. La production d'hGH n'est que de 200 ng/ml de suspension cel-
10 lulaire.

EXEMPLE 7

Une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL, dans laquelle l'aptitude des cellules d'adénome acido-
phile humain à produire de l'hGH a été introduite comme dans
15 l'exemple 3, est implantée dans la cavité allantoïque d'oeufs embryonnés, préalablement mis à incuber à 37°C pendant 5 jours. Après mise en incubation de ces oeufs à cette même température pendant 1 semaine supplémentaire, les cellules humaines multipliées sont récoltées, puis traitées comme dans
20 l'exemple 1 pour donner hGH. La production en hGH est voisine de 1 300 ng/ml de suspension cellulaire.

L'expérimentation témoin est réalisée comme dans l'exemple 1, par culture in vitro de lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains JBL fusionnés, et exposition des
25 cellules multipliées à l'action de l'inducteur d'hormone de croissance. La production d'hGH n'est que de 200 ng/ml de suspension cellulaire.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la production d'hormone de croissance humaine par multiplication de cellules humaines capables d'en produire, caractérisé en ce que, avant de les exposer à l'action d'un inducteur de cette hormone, on soumet les-dites cellules à l'action in vivo d'un fluide corporel nutritif d'un animal à sang chaud.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les-dites cellules sont transplantées directement dans le corps de l'animal à sang chaud.

10 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les-dites cellules se multiplient dans un dispositif dans lequel on leur apporte le fluide nutritif corporel de l'animal.

15 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le dispositif est une chambre de diffusion.

5. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire l'hormone de croissance sont des cellules humaines, acidophiles, intactes, provenant de l'hypophyse antérieure, celles qui sont transformées par le virus E B ou par irradiation aux rayons-X, ou des cellules d'adénome acidophiles humaines.

20 6. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire l'hormone de croissance sont des cellules établies des cellules selon la revendication 5.

7. Procédé selon une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules humaines capables de produire l'hormone de croissance sont des cellules d'hybridome obtenues par fusion cellulaire d'une lignée de lymphoblastoïdes leucémiques humains avec une des cellules selon la revendication 5 ou 6.

8. Procédé selon une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'inducteur de l'hormone est un amino-acide, notamment lysine, arginine, tryptophane, leucine, acide casamino, un métabolite d'acide-amino comme sérotonine ou un poly-

peptide.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'animal à sang chaud est une volaille comme poulet ou pigeon, un mammifère comme chien, chat, singe,
5 chèvre, cochon, vache, cheval, lapin, cobaye, rat, hamster, souris ou souris nue.

10. Hormone de croissance humaine obtenue par le procédé selon une des revendications 1 à 9.