

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 15923

(54) Procédé de production d'une substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoïétiques humaines.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 37/14.

(22) Date de dépôt..... 18 juillet 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 20 juillet 1979, n° 92355/79, et 15 mai 1980, n° 65625/80.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 6 du 6-2-1981.

(71) Déposant : Société dite : MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. et Société dite : THE GREEN CROSS CORPORATION, résidant au Japon.

(72) Invention de : Fumimaro Takaku, Katsuhiko Ogasa, Morino Kuboyama, Nobuya Yanai, Muneo Yamada et Yoshiteru Watanabe.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Société de protection des inventions,
25, rue de Ponthieu, 75008 Paris.

La présente invention concerne un médicament contre la granulocytopénie humaine et plus particulièrement un procédé de préparation d'une substance qui agit directement sur les cellules souches granulopoiétiques (désignées simplement ci-après sous le nom de cellules souches), stimulant ainsi la prolifération et la différenciation de ces cellules [dans ce qui suit, une telle substance est désignée sous le nom de CSF (facteur de stimulation des colonies)].

Il est bien connu que le CSF joue un rôle essentiel dans la granulopoïèse et dans la formation des monocytes (cellules qui doivent encore grandir pour donner des macrophages), et/ou des macrophages, car le CSF du corps humain vivant agit sur les cellules souches qui sont les cellules mères de ces granulocytes, monocytes et macrophages, en induisant leur prolifération et leur différenciation [Metcalf, D., Experimental Haematology, Vol. 1, 185-201 (1973)]. On se serait attendu à ce que le CSF, présentant cette activité, soit utilisé comme médicament pour le traitement de la granulocytopénie [Fumimaro Takakn, Igakn no Ayumi (Progress in Medical Science), Vol. 95, N°2, 41-50 (1975)]. L'utilisation effective du CSF comme médicament n'a cependant pas été encore réalisée en raison du fait que le mécanisme de formation des granulocytes, monocytes et macrophages in vivo est compliqué, qu'il existe toujours une partie inconnue dans le comportement du CSF dans ce mécanisme, et qu'il était difficile de produire de grandes quantités de CSF d'une qualité pharmacologiquement acceptable.

En ce qui concerne l'utilisation du CSF comme réactif de diagnostic, on savait que la mesure du nombre de cellules réagissant au CSF dans les cellules de la moelle des os est d'une grande importance pour le pronostic concernant un malade souffrant de leucémie myélogène (Nakao and Takakn, Ed. : "Proliferation and Diffe-

rentiation of Blood Cells - Fundamental and Clinical aspects -, p. 29, Published by Kagakn Hyoronsha Co., Japan, 1975) et que le CSF est utile comme stimulateur du réactif de référence à cet effet. Cependant, de même
5 que dans le cas de l'utilisation pharmaceutique indiquée ci-dessus, l'utilisation du CSF dans le diagnostic n'a pas encore été mis en pratique en raison de la difficulté de produire de grandes quantités de CSF ayant une qualité suffisante pour l'utilisation diagnostic.

10 Pour la préparation du CSF qui agit directement sur les cellules souches, on connaît des procédés qui consistent à cultiver des leucocytes du sang périphérique [Price, G.B. et al., Biochemical Journal, Vol. 148, 209-217 (1975)], des cellules placentaires humaines
15 [Burges, A.W. et al., Blood, Vol. 49, N°4, 513-583 (1977)] ou un certain type de cellules cancéreuses dites tumeurs produisant du CSF [Nakaaki Osawa et al., Acta Hematologica Japonica, Vol. 42, N°2, 237 (1979)]. Parmi ces procédés, ceux qui sont susceptibles de produire du
20 CSF convenant pour l'utilisation pharmaceutique sont les deux premiers. Cependant, les procédés classiques utilisant ces cellules sont des procédés expérimentaux destinés à la préparation de faibles quantités de CSF et qui ne conviennent pas pour la production à grande
25 échelle. De plus, pour préparer le CSF par les procédés classiques, le sérum est un constituant indispensable du milieu de culture des cellules (en l'absence de sérum dans le milieu, il ne se forme pas de CSF) et le sérum de boeuf ou le sérum de fœtus de veau ont été
30 classiquement utilisés. Pour éviter des effets secondaires provoqués par les protéines étrangères contenues dans ces milieux, il est nécessaire d'éliminer ces protéines après culture des cellules ou d'utiliser du sérum humain. L'élimination de ces protéines du CSF
35 produit dans le milieu exige une procédure laborieuse et est difficile, tandis que le sérum humain présente

l'inconvénient de son coût élevé qui conduit à une augmentation du coût de production.

Comme il a été décrit ci-dessus, en dépit du fait que les utilisations du CSF comme médicament et
5 comme réactif de diagnostic étaient connues, aucun procédé n'avait été mis au point jusqu'à présent pour la production à grande échelle et à faible coût d'un CSF ne présentant pas d'effets secondaires.

Un des buts de l'invention est de fournir un
10 procédé permettant une production à grande échelle d'un CSF ne présentant pas d'effets secondaires et utilisable comme médicament contre la granulocytopenie humaine, et comme réactif de diagnostic pour la leucémie myélogène.

Conformément à l'invention, il est fourni un
15 procédé de production d'une substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoïétiques humaines, qui consiste à cultiver des monocytes et des macrophages, isolés du sang périphérique humain, dans un milieu synthétique pour
20 culture de tissu, contenant une glycoprotéine isolée de l'urine humaine et capable de stimuler la formation de granulocytes humains ou de macrophages et de granulocytes de souris, produisant ainsi une substance active dans le milieu, et à récupérer la substance active du milieu.

25 .La glycoprotéine capable de stimuler la formation de granulocytes humains [désignés ci-après sous le nom de glycoprotéine (H)], qui est isolée de l'urine humaine et utilisée dans l'invention, est décrite en détail dans la demande de brevet japonaise en cours
30 d'examen n° 140.707/79, dans la demande de brevet allemande n° 2.910.745 et dans la demande de brevet britannique n° 2.016.477. Une glycoprotéine capable de stimuler la formation de macrophages et de granulocytes de souris a été isolée de l'urine humaine, elle a été décrite comme
35 une glycoprotéine connue contenant de l'acide sialique par Stanley and Metcalf, Australian Journal of Experi-

mental Biological Medical Science, 47, 467-483 (1969) ;
stanley et al., Federation Proceedings, 34, N° 13, 2272-
2278 (1975) ; Laukel et al., Journal of Cellular Physio-
logy, 94, 21-30 (1978) etc..

- 5 Le milieu synthétique pour culture de tissus
utilisés dans l'invention peut être un milieu synthétique
du commerce destiné à l'utilisation dans la culture des
tissus ou une culture cellulaire telle que par exemple
le milieu 5A de McCoy, T.A., Maxwell, M., et Kruse, P.F.:
10 Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 100 : 115-118 (1959),
vendu par Gibco Co., Mélange de Nutrients HAMF-10 [Ham,
R. G., Exp. Cell Res., 29 : 515-526, sold by Gibco Co.],
RPMI-1640 [Iwakata, S., Grace J. T. J., N. Y. I. of Med.,
64/18 : 2279-2282 (September 15, 1964) vendu par Nissui
15 Seiyakn Co.], ou du milieu MEM de Eagle supplémenté en
amino-acides [Eagle, H. Science 130 : 432 (1959), vendu
par Nissui Seiyakn Co.].

Le procédé de l'invention est décrit ci-dessous
en détail.

- 20 (1) Isolement des monocytes et des macrophages.

Du sang recueilli de la veine d'individus en
bonne santé au moyen d'une seringue héparinisée est
placé dans un tube à essai stérile et laissé au repos à
la température ambiante pendant une à deux heures. Les
25 opérations ultérieures sont toutes effectuées dans des
conditions aseptiques. Après repos, la couche supérieure
de leukocyte est recueillie, lavée une fois avec un
milieu synthétique pour culture de tissus, et soumise à
la précipitation centrifuge à gradient de densité
30 [Mahmood, T. et W.A. Robinson, Blood, 51, N°5, 879-887
(1978)] pour la fractionner en une couche contenant des
monocytes, macrophages et des lymphocytes et une autre
couche contenant des granyocytes. La première couche
est recueillie pour obtenir une fraction cellulaire. La
35 fraction cellulaire est mise en suspension dans un milieu
synthétique du commerce pour culture de tissus (désigné

ci-après en abrégé sous le nom de milieu) et elle est centrifugée pour éliminer et rejeter les liquides surnageant. Les cellules ainsi recueillies sont lavées par addition du même milieu que ci-dessus. Le lavage est

5 répété au moins deux fois. Les cellules lavées sont mises en suspension dans un faible volume du même milieu. Une partie de la suspension obtenue est soutirée et le nombre de cellules est mesuré avec un compteur automatique des cellules du sang. Le rapport en nombre des monocytes et

10 des macrophages au lymphocytes est déterminé par examen microscopique d'un frottis traité par le colorant de Wright - Giemsa. La suspension cellulaire est répandue sur une boîte de Pétri en verre ou en matière plastique de sorte que le nombre d'inocula (monocytes et macropha-

15 ges) puisse prendre la valeur prescrite, de préférence de 10^5 à 10^7 par boîte, puis additionné d'un milieu synthétique du commerce pour culture de tissus supplémentée avec 5 à 20 % (en volume par rapport au milieu; ceci vaut également pour ce qui suit) de sérum, et laissé

20 reposer en atmosphère humidifiée dans de l'air à 5 % de CO_2 à 37°C pendant 1 à 2 heures. Pendant la période de repos, les monocytes et les macrophages se collent sur le fond de la boîte, tandis que les lymphocytes restent en suspension dans le milieu. Le milieu est ensuite jeté

25 et la boîte lavée plusieurs fois par addition d'un milieu ne contenant pas de sérum ou un sérum physiologique. Après le traitement, la plus grande partie des lymphocytes est éliminée, tandis que les monocytes et les macrophages restent fixés sur le fond de la boîte. Par examen

30 microscopique, on trouve que 95 % ou davantage des cellules fixées sur le fond sont des monocytes et des macrophages, et que leur nombre est de 10^5 à 10^7 par boîte.

(2) Culture des monocytes et macrophages.

35 A la boîte de culture ci-dessus, on ajoute un milieu synthétique avec ou sans supplément de sérum et

contenant au moins 0,1 µg/ml de milieu de glycoprotéine (H) ou de fraction contenant de la glycoprotéine (H) ou au moins 500 unités/ml de milieu de glycoprotéine (M) ou de fraction contenant de la glycoprotéine (M) (l'unité de glycoprotéine sera décrite plus loin), de telle sorte que la densité de population des monocytes et des macrophages puisse être d'au moins 10^5 /ml de milieu. Le milieu inoculé est mis à incuber à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'air à 5 % de CO₂ pendant 1 à 7 jours pour produire du CSF dans le milieu. Le milieu synthétique utilisé ci-dessus est le milieu du commerce précédemment mentionné pour la culture des tissus.

Les conditions optimales pour la production de CSF conformément à l'invention en ce qui concerne la durée de culture, la quantité de glycoprotéines à ajouter, la quantité de cellules à inoculer, la quantité de sérum à incorporer et le type de milieu sont décrits ci-après dans les exemples plus expérimentaux.

Dans la préparation du CSF pour l'utilisation pharmaceutique conformément à l'invention, on utilise un milieu contenant du sérum humain ou un milieu exempt de sérum pour éviter des effets secondaires provoqués par des protéines étrangères. Pour préparer le CSF en vue d'utilisation comme réactif de diagnostic, d'autre part, on peut utiliser un milieu additionné de sérum de boeuf ou de sérum de fœtus de veau. Il est également possible d'utiliser un flacon de culture à la place de la boîte de Pétri. En outre, on peut utiliser plusieurs fois les monocytes et macrophages qui ont subi la culture.

(3) Glycoprotéine devant être ajoutée au milieu.

La glycoprotéine utilisée dans le procédé de l'invention est celle isolée de l'urine humaine et capable de stimuler la formation de granulocytes humains ou de macrophages et de granulocytes de souris ou une fraction contenant cette glycoprotéine.

La glycoprotéine capable de stimuler la formation de granulocytes humains peut être obtenue conformément à la description de la demande de brevet japonaise en cours d'examen N° 140.707/79 et des autres brevets, 5 tels que décrits ci-dessous.

L'urine fraîche recueillie d'un individu en bonne santé est ajustée à pH 6-9, de préférence 7-8, avec des solutions acides ou alcalines diluées et centrifugées pour éliminer les impuretés contenues dans 10 l'urine. Le liquide surnageant ainsi obtenu est mis en contact avec un adsorbant contenant du silicium, tel que par exemple du gel de silice, un gel de silice-silicate de magnésium, de la terre de diatomée, un verre de silice ou de la bentonite, et les constituants adsor- 15 bés sont élevés avec une solution alcaline, de préférence à pH 9, ou supérieure. La solution alcaline utilisée pour l'élution n'est pas déterminante, mais elle est de préférence une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium, d'hydroxyde de sodium etc. a une concentration de 0,3 à 20 1,5 M. L'éluat ainsi obtenu est ajusté à pH 7-8 et additionné d'un sel neutre tel que par exemple du sulfate d'ammonium à 70 % de la saturation pour relarguer la substance active, ce qui fournit une fraction brute contenant la glycoprotéine. La fraction brute ci-dessus 25 est redissoute dans une faible partie d'une solution alcaline débarrasser des substances de faible masse moléculaire, ayant une masse moléculaire de 10.000 ou moins, par ultrafiltration et mise en contact avec un échangeur de cations (par exemple du carboxyméthyl-dex- 30 trane, de la carboxyméthylcellulose ou de la phosphocellulose) pour éliminer les impuretés contenues dans la solution. Avant ce contact, la fraction brute contenant la glycoprotéine et l'échangeur d'ions sont mis en équilibre à pH 6-8 avec une solution tampon de préférence 35 0,01 - 0,15 M, de façon que le contact puisse être effectué dans des conditions de pH pratiquement neutre.

La plus grande partie de la glycoprotéine traverse l'échangeur d'ions sans être adsorbée. Après concentration, l'effluent concentré est mis en équilibre avec une solution tampon diluée à pH 6-8, et versé sur une colonne d'échangeur d'anions (par exemple, de la DEAE-cellulose mise en équilibre avec le même tampon que ci-dessus), pour adsorber la glycoprotéine sur la colonne. La glycoprotéine adsorbée est éluée par élution à gradient de concentration linéaire en utilisant une solution saline 0,1 à 0,3 M, par exemple une solution de chlorure de sodium. L'élution s'effectue à une concentration en sel de 0,1 M ou davantage, mais il est difficile d'obtenir une séparation parfaite. Les fractions d'effluents aux concentrations en sel de 0,1-0,3 M sont rassemblées, et si nécessaire, les fractions rassemblées sont désalinisées et concentrées (la fraction obtenue est désignée sous le nom de fraction A). La fraction A peut être utilisée telle quelle dans le procédé de l'invention.

Il est également possible, avant de la soumettre à l'élution par gradient de concentration linéaire, de purifier la fraction de glycoprotéine par adsorption sur un échangeur d'anions et élution progressive avec une solution saline 0,1-0,3 M.

En vue d'une purification ultérieure, la fraction A obtenue ci-dessus est soumise à une chromatographie de filtration sur gel sur un gel de polymère fortement réticulé ayant une reprise d'eau de 10 à 20 ml/g, telle que par exemple le "Sephadex G-150" ou le "Biogel P-100"; les substances actives sont développées avec un tampon salin 0,05-0,1 M et des fractions ayant des valeurs d'effluents relatives de 1,11 à 1,60, de préférence de 1,11 à 1,45, sont recueillies, désalinisées et concentrées ou lyophilisées (cette fraction est désignée sous le nom de fraction B).

La fraction B contenant la glycoprotéine ainsi obtenue peut aussi être utilisée dans le procédé de

l'invention. Le volume d'effluents relatif dont il est question ici est le volume exprimé par le rapport V_e/V_0 (ou V_e représente le volume de solvant nécessaire pour élever la substance dans la colonne et V_0 représente le
5 volume de vide de la colonne de gel).

En vue d'une purification ultérieure, la substance semi-purifiée obtenue ci-dessus est dissoute dans une solution tampon diluée contenant un sel 1,0 à 2,0 M par exemple une solution de tampon phosphate à pH 6,0 à
10 8,0, de préférence 6,0 à 7,0, contenant du chlorure de sodium 1,0 à 2,0 M, et soumise à une chromatographie d'affinité avec comme adsorbant un sucre tel que par exemple la concanavoline A - Sépharose 4B (fournie par Pharmacia Fine Chemical) qui a été mise en équilibre
15 avec la même solution tampon. La glycoprotéine adsorbée sur la colonne d'affinité est élevée avec une solution saline 1,0-2,0 M dans du tampon diluée à pH 6,0-8,0, de préférence 6,0-7,0, contenant la saccharide (par exemple α -méthyl-D-glucoside) 20-100 mM. Les fractions contenant
20 la glucoprotéine sont combinées, et si nécessaire désalinisées et concentrées ou lyophilisées. La fraction obtenue peut également être utilisée dans le présent procédé.

En vue d'une purification supplémentaire, la
25 fraction ci-dessus est soumise à une électrophorèse de zones préparatives en utilisant comme milieu de support, par exemple un gel de polyacrylamide ou un gel d'agar, à pH 7,0-9,0, et on recueille une fraction de glycoprotéine hautement purifiée du milieu de support avec une
30 solution saline diluée en refroidissant. Cette fraction est désalinisée et concentrée ou lyophilisée. La glycoprotéine purifiée peut aussi être utilisée dans le procédé de l'invention.

La glycoprotéine utilisée dans le présent
35 procédé, qui stimule la formation des granulocytes et des macrophages de souris, a été décrite dans la lité-

rature précitée. La méthode de préparation de Stanley et Metcalf, celle de Stanley et al. et celle de Laukel et al. sont décrites en détail dans les exemples 6, 5 et 7, respectivement, dans la présente description.

5 L'activité biologique des préparations de glycoprotéine pour les cellules de moelle osseuse de souris, est déterminée de la façon décrite ci-après et exprimée en terme d'"unité". A 1 ml de milieu de McCoy 5A supplémenté avec 20 % de sérum de fœtus de veau, on
10 ajoute de l'agar-agar à 0,3 % et 1×10^5 cellules de moelle osseuse de souris C₅₇Bl/6J, avec 0,1 ml de la glycoprotéine essayée ou une fraction la contenant. On place le milieu contenant la glycoprotéine ainsi préparée dans une boîte de Pétri en matière plastique de
15 35 mm de diamètre, et on la fait incubé à 37°C en atmosphère humidifiée d'air à 5 % de CO₂ pendant 7 jours. Lorsque l'incubation est terminée, on compte le nombre de colonies séparées contenant chacune 50 cellules ou davantage avec un microscope inversé. L'activité biolo-
20 gique d'un échantillon formant une colonie est supposée être d'une unité. Pour évaluer le degré de purification d'un échantillon de glycoprotéine, on calcule l'activité spécifique par l'équation suivante :

$$25 \quad \text{activité spécifique} = \frac{\text{unité de l'échantillon}}{\text{quantité de glycoprotéine ou de fraction contenant de la glycoprotéine (mg)}}$$

L'activité spécifique augmente avec l'avancement de la purification. La glycoprotéine ou la fraction
30 contenant la glycoprotéine ajoutée au milieu dans le procédé de l'invention peut être une fraction purifiée ayant une activité spécifique élevée, mais elle est de préférence une glycoprotéine d'une activité assez faible obtenue au cours de la purification. Les quantités des
35 glycoprotéines (H) et (M) devant être ajoutées au milieu sont d'au moins 0,1 µg, de préférence de 10 à 100 µg pour 1 ml de milieu, et d'au moins 500 unités, de préfé-

rence de 1000 unités ou davantage pour 1 ml du milieu respectivement.

(4) Récupération de la substance active dans le milieu conditionné.

5 Le milieu conditionné contenant du CSF préparé comme il a été décrit ci-dessus est recueilli dans la boîte de Pétri et centrifugé à 1.000-2.000 x g pendant 5 à 10 minutes pour obtenir un liquide surnageant contenant du CSF d'activité élevée.

10 Le liquide surnageant ci-dessus est utilisable pour la préparation d'un réactif de diagnostic clinique ou d'un réactif de référence pour tester la formation de colonies par des cellules souches granulopoiétiques humaines. A cet effet, l'activité du liquide surnageant
15 est ajustée de telle sorte que 0,1 ml du liquide surnageant puisse contenir une activité de CSF suffisante pour former au moins 100 colonies de granulocytes humains, il est filtré à travers un filtre à membrane, et placé aseptiquement dans un récipient, puis hermétique-
20 quement scellé de façon à obtenir un réactif liquide. Un réactif sous forme de poudre préparé par lyophilisation aseptique du substrat stérile ci-dessus.

 Pour l'usage pharmaceutique, on dialyse un milieu conditionné obtenu en utilisant un milieu exempt
25 de sérum ou un milieu supplémenté en sérum humain contre de l'eau pour éliminer les constituants du milieu, et on le stérilise par filtration sur membrane. Si nécessaire, on concentre le filtrat, on le verse aseptiquement dans un récipient et on le scelle hermétiquement de façon
30 à obtenir un médicament sous forme liquide. Il est également possible d'obtenir un médicament sous forme de poudre en stérilisant la solution dialysée par filtration sur membrane et en la lyophilisant aseptiquement.

 Pour purifier encore le CSF destiné à l'usage
35 pharmaceutique, on sépare le liquide surnageant ci-dessus en une fraction de masse moléculaire élevée (masse molé-

culaire supérieure à 5.000 ou 10.000) et une fraction de faible masse moléculaire (masse moléculaire inférieure à 5.000 ou 10.000) au moyen d'une membrane d'ultrafiltration (limite de séparation des masses moléculaires 5.000 ou 10.000). Bien que les deux fractions contiennent du CSF, 90 % ou davantage du CSF se trouve dans la fraction de masse moléculaire élevée.

On peut obtenir un médicament en concentrant sous vide la fraction de faible masse moléculaire. Le concentrat de masse moléculaire élevée est dissout dans une solution tampon 0,01-0,1 M (pH 6,0-8,0) et mis en contact avec une résine échangeuse d'anion telle que par exemple de la DEAE-cellulose, du DEAE-Séphadex ou du QAE-Séphadex qui a été mis en équilibre avec cette solution tampon, pour faire adsorber le CSF sur la résine. Le CSF adsorbé sur la résine est élevé par une solution tampon 0,1-0,3 M (pH 6,0-8,0) pour obtenir un produit purifié.

L'éluat ci-dessus peut encore être purifié par concentration et chromatographie ultérieure sur tamis moléculaire par filtration sur gel. Le gel destiné à la filtration sur gel peut être par exemple du "Séphadex G-150", du "Biogel P-100" et de l'"Ultrogel AcA-44".

Lorsque l'activité de CSF est obtenue en utilisant un milieu exempt de sérum, de traitement par une résine échangeuse d'anions peut être omis et la purification est effectuée directement par chromatographie à filtration sur gel. Une solution tampon de développement approprié dans la chromatographie de filtration sur gel est une solution tampon 0,01-0,3 M (pH 6,0-8,0). Les fractions d'activité de CSF obtenues par filtration sur gel sont rassemblées et la fraction globale est concentrée, désalinisée et lyophilisée pour obtenir un CSF purifié.

Sur les CSF purifiés obtenus ci-dessus, on effectue une analyse des protéines contaminantes par

immunoélectrophorèse en utilisant de l'antisérum humain et de l'antisérum de boeuf. Des traces de protéines analogues à la globuline humaine et de protéines analogues à la sérum-albumine et à la globuline provenant vraisemblablement toutes deux du sérum de fœtus de veau sont détectées dans les CSF obtenus à partir d'un milieu supplé-
5 menté en sérum de fœtus de veau. Par ailleurs, comme absolument aucune de ces substances protéiniques n'est détectable dans le CSF produit dans le milieu
10 exempt de sérum, celui-ci peut être utilisé comme médicament exempt d'effets secondaires.

Pour l'injection, les médicaments liquides sont utilisés tels quels et les poudres sont avantageusement dissoutes dans de l'eau stérile, du sodium physiologique stérile, etc. avant l'emploi.
15

Le médicament préparé par le présent procédé est administré à un malade souffrant de granulocytopénie à une dose effective supérieure à 77,8 mg/kg de poids corporel/jour.

20 • Exemple expérimental 1.

Expérience sur la période d'incubation.

(1) Isolement de monocytes et de macrophages et préparation de la glycoprotéine.

On isole des monocytes et des macrophages comme
25 il sera décrit ultérieurement dans l'exemple 1-(1). Les glycoprotéines utilisées dans l'expérience ont été préparées comme il sera décrit ci-après dans l'exemple 1-(2) et dans l'exemple 5-(2). La glycoprotéine (H) préparée comme dans l'exemple 1-(2) est un produit hautement
30 purifié au stade de purification finale et la glycoprotéine (M) préparée comme dans l'exemple 5-(2) est un produit de pureté ordinaire (activité spécifique : 180.000).

(2) Incubation des monocytes et des macrophages.

On prépare deux milieux contenant chacun
35 100 µg/ml de glycoprotéine (H) et deux milieux exempts de glycoprotéine. Comme milieux, on utilise un milieu de

McCoy 5A exempt de sérum et un milieu de McCoy 5A complété contenant 20 % de sérum de fœtus de veau.

A chaque boîte de Pétri contenant des monocytes et des macrophages fixés sur le fond, on ajoute l'un des quatre milieux à raison de 10^6 des monocytes et macrophages par ml de milieu. Chaque milieu est mis à incuber de la même manière que dans l'exemple 1-(3). Un volume prédéterminé du milieu est retiré de chaque boîte avant l'incubation et après des périodes d'incubation de 1, 3, 5 et 7 jours.

Par ailleurs, on répète le mode opératoire ci-dessus, excepté qu'on utilise, la glycoprotéine (M) à raison de 1.000 unités/ml de milieu à la place de cette même quantité de la glycoprotéine (H).

(3) Essai du CSF dans le milieu conditionné.

L'activité du CSF de chaque milieu conditionné a été déterminée par la formation de colonies de cellules de moelle osseuse humaine. La moelle osseuse est prélevée dans le sternum d'un individu en bonne santé au moyen d'une seringue héparinisée après une ponction sternale. La moelle osseuse prélevée est centrifugée à $1.000 \times g$ pendant 10 minutes pour recueillir la couche lococytaire. La couche lococytaire est lavée avec un milieu 5A de McCoy, mise en suspension dans un milieu 5A de McCoy contenant 20 % de sérum, étalée dans une boîte de Pétri, additionnée de quelques mg/ml de milieu d'un fer carbonyle en poudre qui a été soumis à une stérilisation par l'air sec, et laissé reposer dans un incubateur à 37°C pendant 1 à 2 heures. Après repos, les cellules phagocytaires qui ont phagocyté les particules de fer carbonyle sont fixées au fond de la boîte de Pétri au moyen d'un aimant et la suspension de cellules surnageantes est recueillie. Les cellules en suspension sont des cellules de moelle osseuse non adhérentes, non phagocytaires et elles sont utilisées pour la détermination de l'activité du CSF. Ces cellules de moelle

osseuse sont lavées par centrifugation et mises en suspension dans un faible volume du milieu. Le nombre de cellules nucléées dans la suspension est déterminé après traitement par un colorant acide acétique-gentiane.

- 5 Les cellules nucléées non adhérentes, non phagocytaires sont ajoutées à un milieu 5A de Mc Coy contenant 0,3 % d'agar-agar et 20 % de sérum de foetus de veau, de telle sorte que le milieu puisse contenir 2×10^5 de ces cellules par ml. Après addition du milieu
- 10 conditionné à raison de 0,1 ml/ml de milieu, le milieu inoculé à 37°C dans une atmosphère humidifiée d'air à 5 % de CO₂ est mis à incuber pendant 10 jours. Après incubation, on compte sous un microscope le nombre de colonies formé parmi les agrégats cellulaires (le terme
- 15 "colonie" désigne ici un agrégat cellulaire contenant 40 cellules ou davantage). L'activité du CSF est exprimée par le nombre de colonies et utilisée comme mesure de la production de CSF. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Conditions de culture	Activité du CSF (nombre de colonies) pour 0,1 ml de milieu conditionné			
	Milieu contenant 20 % de sérum de foetus de veau		Milieu exempt de sérum	
	Avec addition de glycoprotéine	Sans addition de glycoprotéine	Avec addition de glycoprotéine	Sans addition de glycoprotéine
Glycoprotéine (H) avant incubation	0	0	0	0
	13 ± 3	3 ± 1	2 ± 1	0
	116 ± 4	24 ± 3	25 ± 2	1 ± 1
	117 ± 3	23 ± 1	20 ± 1	0
	98 ± 1	16 ± 4	18 ± 1	0
Glycoprotéine (M) avant incubation	0	0	0	0
	20 ± 8	6 ± 4	0	0
	89 ± 6	29 ± 8	35 ± 4	3 ± 1
	86 ± 3	30 ± 4	30 ± 6	4 ± 1
	69 ± 4	16 ± 2	23 ± 4	2 ± 1

Comme le montre la tableau 1, on trouve que par addition de l'une ou l'autre glycoprotéine, la production de CSF est presque maxima au troisième jour de l'incubation dans chacun des milieux. Dans le milieu
5 contenant 20 % de sérum de fœtus de veau, la production de CSF est nettement plus importante en présence de glycoprotéine qu'en l'absence de glycoprotéine (procédé classique). Dans le milieu exempt de sérum, le CSF est
10 formé lorsque la glycoprotéine est ajoutée, tandis qu'il ne se forme presque pas de CSF en l'absence de glycoprotéine.

Des résultats ci-dessus, il ressort clairement que dans la production de CSF par culture de monocytes et de macrophages in vitro, ces glycoprotéines stimulent
15 la production de CSF, que le milieu contienne ou non du sérum. On a trouvé aussi qu'une période d'incubation appropriée est de 3 à 7 jours, de préférence de 3 jours. Il est à noter que lorsque l'on n'ensemence pas de monocytes et de macrophages, aucune activité du CSF n'est
20 détectée dans le milieu conditionné, que la glycoprotéine soit présente ou non.

Exemple expérimental 2.

Expérience sur la quantité de glycoprotéine ajoutée au milieu.

25 On prépare des milieux en ajoutant les mêmes glycoprotéines (H) et (M) que dans l'exemple expérimental 1 à un milieu de Mc Coy 5A supplémenté avec 20 % de sérum de fœtus de veau et un milieu de Mc Coy 5A exempt de sérum. Dans le cas de la glycoprotéine (H), la quantité
30 ajoutée au milieu est de 0,1, 1,0, 10,0 ou 100µg/ml de milieu. Dans le cas de la glycoprotéine (M), la quantité ajoutée est de 100, 500, 1.000 ou 2.000 unités/ml de milieu. Chaque milieu préparé est versé dans la boîte de Pétri contenant des monocytes et macrophages fixés en
35 son fond, et mis à incuber pendant 3 jours de la même manière qu'à l'exemple expérimental 1. L'activité du CSF

de chaque milieu conditionné est déterminée comme dans l'exemple expérimental 1 pour évaluer la production de CSF. Les échantillons obtenus en faisant incuber chaque milieu sans addition de glycoprotéine ont été
5 utilisés comme témoin. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

10	Quantité de glycoprotéine ajoutée	Activité du CSF (nombre de colonies) pour 0,1 ml de milieu conditionné	
		Milieu contenant 20 % de sérum de fœtus de veau	Milieu exempt de sérum
15	Glycoprotéine (H) (µg/ml)		
	0 (témoin)	24 ± 3	1 ± 1
	0,1	51 ± 2	9 ± 1
	1,0	116 ± 4	25 ± 2
	10,0	166 ± 10	53 ± 3
20	100,0	170 ± 8	80 ± 4
25	Glycoprotéine (M) (unités/ml)		
	0 (témoin)	21 ± 6	2 ± 1
	100	28 ± 3	6 ± 3
	500	96 ± 10	13 ± 6
	1000	129 ± 8	49 ± 6
30	2000	170 ± 6	85 ± 8

Comme le montre le tableau 2, par addition de l'une ou l'autre glycoprotéine, la production de CSF augmente avec la quantité de glycoprotéine ajoutée.
35 Compte tenue des résultats ci-dessus, ainsi que des

résultats précédemment indiqués dans le tableau 1 (résultats obtenus par 3 jours d'incubation), on peut admettre que la production de CSF est augmentée de façon marquée par la présence de 0,1 μ g de glycoprotéine (H) ou de 500 unités de glycoprotéine (M) dans 1 ml du milieu. Dans le présent procédé, par conséquent, la quantité de glycoprotéine devant être ajoutée à 1 ml du milieu est d'au moins 0,1 μ g, de préférence de 10 à 100 μ g pour la glycoprotéine (H) et d'au moins 500 unités, de préférence de 1.000 unités ou davantage pour la glycoprotéine (M).

Exemple expérimental 3.

Expérience sur la quantité de monocytes et de macrophages à inoculer dans le milieu.

Une série de milieux conditionnés ont été obtenus en répétant le mode opératoire de l'exemple expérimental 1, excepté que le nombre de monocytes et de macrophages inoculés dans 1 ml du milieu est de 0, 10^3 , 10^4 , 10^5 ou 10^6 ; 1 μ g de la glycoprotéine (H) ou 500 unités de la glycoprotéine (M) sont ajoutées à 1 ml du milieu de Mc Coy 5A supplémenté par 20 % de sérum de foetus de veau ou de milieu Mc Coy 5A exempt de sérum; la durée d'incubation est de 3 jours. Dans les milieux conditionnés obtenus, on détermine l'activité du CSF pour évaluer la production de CSF de la même manière qu'à l'exemple expérimental 1. Les résultats expérimentaux sont donnés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

5	Nombre de cellules inoculées (nombre/ml)	Activité du CSF (nombre de colonies) pour 0,1 ml de milieu conditionné	
		Milieu contenant 20 % de sérum de foetus de veau	Milieu exempt de sérum
10	Milieu contenant de la glycopro- téine (H)		
	0	0	0
	10^3	13 ± 1	0
	10^4	20 ± 2	6 ± 1
15	10^5	116 ± 4	25 ± 2
	10^6	185 ± 7	69 ± 5
20	Milieu contenant de la glycopro- téine (M)		
	0	0	0
	10^3	19 ± 6	0
	10^4	29 ± 10	8 ± 4
	10^5	98 ± 6	31 ± 3
25	10^6	169 ± 9	74 ± 2

Comme il ressort clairement du tableau 3, dans l'un quelconque des milieux utilisés dans l'expérience, une forte quantité de CSF a été formée lorsqu'au moins 10^5 cellules étaient présentes dans 1 ml du milieu. Dans le procédé de l'invention, par conséquent, il est souhaitable d'inoculer au moins 10^5 de monocytes et de macrophages dans 1 ml du milieu.

Exemple expérimental 4.

Expérience comparative concernant la production de CSF sur divers milieux.

On compare les uns aux autres quatre milieux du commerce pour culture de tissus ou culture de cellules en ce qui concerne la production du CSF. Les milieux utilisés dans l'expérience comprennent le milieu de Mc Coy 5A (Gibco Co.), le mélange de nutriments HAMF-10 (Gibco Co.), le RPMI-1640 (Nissui Seiyaku Co.), et le milieu MEM d'Eagle complété par des amino acides (Nissui Seiyaku Co.).

A chacun des milieux ne contenant pas de sérum supplémenté on ajoute 1,0 µg/ml de milieu de la glycoprotéine (H) ou 500 unités/ml de milieu de la glycoprotéine (M). On met à incuber les milieux préparés pendant 3 jours de la même manière que dans l'exemple expérimental 1. Dans les milieux conditionnés, on détermine l'activité du CSF de la même manière que dans l'exemple expérimental 1, pour évaluer la production de CSF. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 4.

20

TABLEAU 4

Milieu	Activité du CSF (nombre de colonies) pour 0,1 ml de milieu conditionné	
	Avec addition de glycoprotéine (H)	Avec addition de glycoprotéine (M)
McCoy 5A	69 ± 5	83 ± 6
HAMF - 10	71 ± 3	76 ± 8
RPMI - 1640	75 ± 3	81 ± 1
MEM	48 ± 1	46 ± 5

Comme il ressort clairement du tableau 4, l'un quelconque des quatre milieux ci-dessus peut être utilisé pour effectuer le procédé de l'invention, bien que la production de CSF soit un peu plus faible dans le milieu MEM.

35

Exemple expérimental 5.

Expérience sur la quantité de sérum ajoutée au milieu.

Des milieux conditionnés sont obtenus de la même manière que dans l'exemple expérimental 1, excepté que l'on utilise des milieux qui ont été préparés en ajoutant à du milieu de Mc Coy 5A 0, 5, 10, 20 ou 30 % de sérum humain (Green Cross Co.) ou de sérum de foetus de veau (Flow Laboratory Co.), tous deux ayant été chauffés à 58°C pendant 30 minutes, puis 1 µg/ml de milieu de la glycoprotéine (H) ou 500 unités/ml de milieu de la glycoprotéine (M) ; le nombre des monocytes et des macrophages inoculés dans chaque milieu est de 10^5 /ml ; et la durée d'incubation est de 3 jours. Dans les milieux conditionnés obtenus, on détermine l'activité du CSF de la même manière que dans l'exemple expérimental 1 pour évaluer la production de CSF. Les résultats sont donnés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

20

25

30

Quantité de sérum ajouté (%)	Activité du CSF (nombre de colonies) pour 0,1 ml de milieu conditionné	
	Avec addition de sérum humain	Avec addition de sérum de foetus de veau
Milieu contenant la glycoprotéine (H)		
aucun	25 ± 2	25 ± 2
5	55 ± 1	43 ± 1
10	120 ± 5	98 ± 3
20	150 ± 3	116 ± 4
30	141 ± 2	108 ± 2

TABLEAU 5 (suite)

Milieu contenant la glycoprotéine (M)			
	aucun	21 $\pm$ 8	21 $\pm$ 8
5	5	49 $\pm$ 6	51 $\pm$ 4
	10	109 $\pm$ 5	89 $\pm$ 2
	20	124 $\pm$ 7	102 $\pm$ 6
	30	123 $\pm$ 8	92 $\pm$ 5

10. Comme il ressort du tableau 5, lorsque la quantité de l'un ou l'autre sérum ajoutée au milieu augmente, la production de CSF augmente. Bien que conformément à l'invention le CSF soit produit dans un milieu exempt de sérum, on peut ajouter du sérum de
- 15 boeuf ou du sérum de fœtus de veau au milieu lorsque la production d'une grande quantité de CSF est nécessaire pour l'utilisation comme réactif. La quantité effective de sérum à ajouter à cet effet est d'au moins 5 %, de préférence de 10 % ou davantage.

20 Exemple expérimental 6.

L'expérience sur l'addition d'une fraction contenant de la glycoprotéine et d'une fraction hautement purifiée.

- Dans les exemples expérimentaux 1 à 5, on a
- 25 utilisé de la glycoprotéine purifiée comme substance active ayant un effet stimulant sur la formation de granulocytes humains (Cas I) et d'autre part, on a utilisé une glycoprotéine de pureté ordinaire (activité spécifique : 180.000) comme substance active ayant un
- 30 effet stimulant sur la formation de macrophages et de granulocytes de souris (Cas II). La présente expérience a été effectuée, comme il est décrit ci-après, pour démontrer que dans le procédé de l'invention, on peut utiliser une matière semi-purifiée à la place de la
- 35 glycoprotéine purifiée dans le Cas I, et qu'une fraction moins purifiée ainsi qu'une matière hautement purifiée

peuvent être utilisées à la place de la glycoprotéine de pureté ordinaire dans le Cas II.

Les fractions contenant de la glycoprotéine utilisée dans l'expérience correspondant au Cas I sont les fractions A et B préparées comme il est décrit ci-après dans l'exemple 1. Ces fractions sont ajoutées chacune à un milieu McCoy 5A exempt de sérum en quantité variable de 0, 0,5, 1,0, 5,0 et 10 mg/ml correspondant respectivement à 0, 8,3, 16,6, 83,3 et 166,6 µg/ml de milieu en terme de glycoprotéine active dans la fraction A et de 0, 41,7, 83,4, 417 et 834 µg/ml de milieu en terme de glycoprotéine active dans la fraction B. Le nombre de monocytes et de macrophages inoculés dans chaque milieu est de 10^5 /ml et la durée d'incubation est de 3 jours. Des milieux conditionnés sont obtenus par incubation dans des conditions par ailleurs identiques à celles de l'exemple expérimental 1.

Comme les fractions A et B contenaient de la sérum albumine humaine excrétée dans l'urine, les échantillons témoins ont été préparés en ajoutant de la sérum albumine humaine (Sigma Co.) au milieu McCoy 5A dans une quantité correspondant à celle contenue dans les milieux préparés ci-dessus ; les conditions d'incubation étaient les mêmes que ci-dessus.

Dans chaque milieu conditionné, on a déterminé l'activité du CSF de la même manière que dans l'exemple expérimental 1 pour évaluer la production de CSF. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 6.

Comme dans le Cas II, les matières glycoprotéiniques utilisées dans la présente expérience étaient la fraction C (activité spécifique : 21.000), la fraction D (activité spécifique : 54.000) et la matière hautement purifiée (activité spécifique : 1.240.000) décrites dans l'exemple 5 et préparées comme à l'exemple 5. Les milieux conditionnés ont été obtenus en répétant le mode opératoire expérimental décrit ci-dessus à propos

du Cas I, excepté que les fractions C et D et la matière hautement purifiée (voir exemple 5) ont été ajoutés chacun aux milieux en quantité variable, de 0, 100, 500, 1.000 et 2.000 unités/ml de milieu à la place des quantités indiquées des fractions A et B (voir exemple 1) et les essais de contrôle en utilisant la sérum albumine humaine ont été omis. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 6.

TABLEAU 6

10	Quantité ajoutée	Activité du CSF (nombre de colonies) pour 0,1 ml de milieu conditionné		
15	Glycoprotéine de l'exemple 1 (mg/ml)	Fraction A	Fraction B	Témoin
	Aucun	0	0	0
	0,5	60 $\pm$ 1	59 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
	1,0	121 $\pm$ 1	114 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2
	5,0	170 $\pm$ 3	103 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2
20	10,0	148 $\pm$ 2	98 $\pm$ 4	26 $\pm$ 1
	Glycoprotéine de l'exemple 5 (unités/ml)	Fraction C	Fraction D	Matière hautement purifiée
25	Aucun	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
	100	8 $\pm$ 2	10 $\pm$ 4	5 $\pm$ 2
	500	36 $\pm$ 6	37 $\pm$ 4	10 $\pm$ 3
	1000	74 $\pm$ 5	66 $\pm$ 5	21 $\pm$ 4
30	2000	122 $\pm$ 8	113 $\pm$ 6	44 $\pm$ 9

Effet du degré de purification de la glycoprotéine ayant un effet stimulant sur la formation de granulocytes humains.

La production de CSF dans un milieu additionné de la fraction A ou B est supérieure à celle dans le milieu témoin, ce qui indique que la glycoprotéine

stimule la production de CSF. Par comparaison avec l'exemple figurant dans le tableau 2, dans lequel 10 $\mu\text{g/ml}$ de glycoprotéine ont été ajoutés au milieu exempt de sérum, la production de CSF était plus élevée dans l'exemple présenté dans le tableau 6, dans lequel 0,5 mg/ml de la fraction A (8,3 $\mu\text{g/ml}$ en terme de glycoprotéine), ont été ajoutés, bien qu'une faible quantité de glycoprotéine ait été ajoutée dans ce dernier exemple. Ceci semble dû à l'influence de la sérum albumine et d'autres ingrédients inconnus de l'urine humaine contenue dans la fraction A.

Si l'on compare le milieu ajouté avec la fraction A avec celui ajouté avec la fraction B en ce qui concerne la production de CSF, on voit que lorsque la quantité ajoutée est de 0,5 ou de 1,0 mg/ml, les deux fractions sont comparables l'une à l'autre, mais à des taux plus élevés, la fraction B donne lieu à une production de CSF plus faible. Ceci résulte probablement du fait que la teneur en sérum albumine urinaire humaine de A est plus élevée que celle de B et que l'addition de la fraction B dans une quantité plus importante que 5 mg/ml conduit à une addition excessive de glycoprotéine. En tenant compte collectivement de ces résultats, il est à présumer que la sérum albumine etc. contenue dans l'urine humaine et la glycoprotéine ont un effet synergique d'augmentation de la production de CSF et qu'une production de CSF maxima est obtenue en ajoutant au milieu environ 100 $\mu\text{g/ml}$ de glycoprotéine.

En ce qui concerne la glycoprotéine ayant un effet stimulant sur la formation de macrophages et de granulocytes de souris (Cas II), il ressort du tableau 6 que dans tous les cas la production de CSF augmente de façon approximativement proportionnelle à la quantité de glycoprotéine ajoutée au milieu. Par comparaison avec les résultats du tableau 2 obtenus en utilisant un milieu exempt de sérum, la production de CSF est plus

élevée dans le cas de la présente expérience dans laquelle on utilise la fraction C ou la fraction D, bien que la quantité de glycoprotéine ajoutée au milieu soit la même que dans le premier cas. Ceci semble provenir de l'influence de la sérum albumine etc. contenue dans les fractions C et D qui provient d'urine humaine. Les résultats obtenus en ajoutant une glycoprotéine hautement purifiée montre clairement que bien que la production de CSF augmente avec la quantité de cette glycoprotéine, l'augmentation est inférieure à celle obtenue dans les cas des fractions C et D et de la matière de pureté ordinaire (tableau 2). Ces résultats laissent présumer que dans les milieux exempt de sérum, la sérum albumine et les autres substances provenant de l'urine humaine joue le même rôle que le sérum en ce qui concerne la production de CSF.

Dans tous les cas, par conséquent, pour appliquer avantageusement le procédé de l'invention, il est préférable d'ajouter au milieu une glycoprotéine brute qu'une glycoprotéine purifiée. Lorsqu'on ajoute une glycoprotéine brute, celle-ci est ajoutée à raison d'au moins 0,1 µg/ml de milieu dans le Cas I ou d'au moins 500 unités/ml de milieu dans le Cas II.

Exemple expérimental 7.

Expérience sur la dose efficace, etc.

La dose efficace et la dose toxique aigue (DL₅₀) du CSF produit par le procédé de l'invention ont été déterminées par l'essai sur l'animal ci-après.

Un milieu conditionné préparé de la même manière qu'à l'exemple 3 a été stérilisé par filtration sur membrane, puis filtré à travers une membrane d'ultrafiltration (limite de séparation des masses moléculaires : 10.000), concentré, désalinisé et lyophilisé pour obtenir du CSF sous forme de poudre. Déterminé par le même procédé que dans l'exemple expérimental 1, le nombre de colonies formées avec les cellules de moelle

osseuse est de 4.500/mg. A titre de comparaison, l'essai a été répété en utilisant des cellules de moelle osseuse de souris C3H/He et on a trouvé que le nombre de colonies formées avec les cellules de moelle osseuse de souris
5 était de 7.000/mg.

Quatre vingt souris males C3H/He (agées de six semaines et d'un poids corporel moyen de 20 g) ont été réparties au hasard en 16 sous groupes de chacun 5 membres. Les sous groupes ont été assemblés au hasard pour
10 former 4 groupes de chacun 4 sous groupes.

Le CSF obtenu ci-dessus est dissout dans une solution de sérum physiologique stérile pour obtenir 3 solutions de 1 mg/0,1 ml (pour le groupe I), 2 mg/0,1 ml (pour le groupe II) et 4 mg/0,1 ml (pour le groupe III).
15 On a administré la solution à chaque souris par voie sous cutanée à la dose de 0,1 ml/souris/jour, pendant 5 jours consécutifs. Au bout de 1, 3, 7 et 11 jours à partir du début d'administration, des échantillons de sang ont été recueillis sur cinq souris d'un sous groupe
20 de chaque groupe (le sous groupe sur lequel les échantillons de sang avaient été recueillis, ont été exemptés de l'essai ultérieur). Le nombre de leucocytes dans le sang périphérique a été déterminé au moyen d'un compteur de cellules sanguines automatique et le nombre de granulocytes a été déterminé au microscope sur des frottis
25 colorés au Wright-Gimsa, pour déterminer l'augmentation du nombre de leucocytes et de granulocytes résultant de l'administration du CSF. Un groupe (groupe I) ayant reçu 0,1 ml de sérum physiologique stérile ne contenant pas
30 de CSF a été traité de la même manière que ci-dessus et a été utilisé comme groupe témoin. Les résultats expérimentaux sont donnés dans le tableau 7.

TABLEAU 7

Groupe Durée de l'essai (jours)	(Témoin) I		II		III		IV	
	Leucocyte	Granulocyte	Leucocyte	Granulocyte	Leucocyte	Granulocyte	Leucocyte	Granulocyte
1	55 ± 20	14 ± 7	53 ± 4	13 ± 8	51 ± 5	16 ± 4	59 ± 8	20 ± 5
3	59 ± 7	12 ± 8	63 ± 9	18 ± 4	98 ± 10	40 ± 10	123 ± 6	60 ± 8
7	41 ± 8	12 ± 4	74 ± 8	28 ± 6	140 ± 8	60 ± 9	201 ± 5	102 ± 14
11	58 ± 8	15 ± 6	102 ± 9	45 ± 10	185 ± 14	75 ± 13	260 ± 19	121 ± 21

Note : 1 - les valeurs numériques correspondent ici au nombre de cellules du sang par mm³ de sang x 10⁻².

2 - chaque résultat expérimental correspond à la moyenne de cinq souris.

Par comparaison avec le groupe I (témoin), parmi les groupes ayant reçu du CSF, le groupe II présente une augmentation double du nombre de leukocytes et une augmentation de presque trois fois du nombre de granulocytes au bout de onze jours à partir du début de l'essai (six jours après la fin de l'administration). Par comparaison avec le groupe I, le groupe IV présente une augmentation remarquable d'environ 4,5 fois du nombre des leukocytes et d'environ 8 fois du nombre des granulocytes. Compte tenu des résultats ci-dessus, on peut supposer que la dose efficace chez la souris est de 50 mg/kg de poids corporel/jour. Comme l'activité de formation de colonie du CSF utilisé dans l'expérience ci-dessus est plus élevée pour les cellules de moelle osseuse de souris que pour les cellules de moelle osseuse humaine, d'un facteur de 1,556, la dose efficace pour un malade souffrant de granulocytopenie qui exerce sur les cellules de moelle osseuse humaine un effet équivalent à l'effet chez les souris est d'environ 77,8 mg/kg de poids corporel/jour.

La toxicité aiguë du CSF préparée conformément à l'invention a été déterminée en utilisant le même CSF que dans l'essai ci-dessus pour la dose d'administration et des souris C3H/He (agées de 6 à 8 semaines et d'un poids corporel moyen de 20,4 g). Aucun cas de mort n'a été observé sur le groupe (5 males et 5 femelles) ayant reçus 4,0 g de CSF/kg de poids corporel. En conséquence, la toxicité aiguë était trop faible pour être déterminée par l'essai ci-dessus.

30 EXEMPLE 1

(1) Isolement des monocytes et des macrophages.

Deux cents millilitres de sang périphérique provenant d'êtres humains normaux sont recueillis dans un flacon de collecte du sang contenant 1.000 unités d'héparine et mélangés sous agitation modérée. On fait passer le sang héparinisé dans une éprouvette de verre

stérile d'un diamètre de 20 mm et d'un volume de 200 ml, et on le laisse reposer pendant 2 heures à la température ambiante. Après repos, on recueille avec précaution la couche de leucocyte supérieure au moyen d'une pipette, 5 on la dilue avec du milieu McCoy 5A exempt de sérum à deux fois le volume initial, on la centrifuge à 1.500 g pendant 15 minutes. On jette le liquide surnageant et on met en suspension le sédiment dans 20 ml de milieu McCoy 5A, déposé sur une solution de métrizoate de sodium 10 (masse spécifique $d = 1,077$) dans un tube de centrifugeuse, et on le centrifuge à 400 g pendant 30 minutes. La couche blanche contenant les monocytes, les macrophages et les lymphocytes au bas de la couche supérieure et recueillie avec une pipette, lavée par addition de 15 milieu McCoy 5A, centrifugée à 1.500 g pendant 10 minutes et le liquide surnageant est jeté. Ce traitement est répété deux fois supplémentaires. Les cellules ainsi obtenues sont mises en suspension dans 20 ml du milieu Mc Coy 5A et une partie d'entre elles est utilisée pour 20 compter le nombre de cellules au moyen d'un compteur automatique de cellule du sang, fabriquée par la (Toa Manufacturing Co.). On prépare un frottis de la suspension, on le colore avec le colorant de Wright-Giemsa, et on détermine morphologiquement le nombre de lympho- 25 cytes ainsi que le nombre de monocytes et de macrophages pour calculer le rapport des cellules. La proportion des monocytes et des macrophages est de 25,5 %.

On place une partie aliquote de 5 ml de la suspension dans chacune des quatre boîtes de Pétri, de 30 15 cm de diamètre, on y ajoute 30 ml de milieu McCoy 5A supplémenté avec 10 % de sérum de fœtus de veau, et on la laisse reposer à 37°C pendant 2 heures dans une atmosphère humidifiée d'air à 5 % de gaz carbonique. Après repos, on jette le milieu et on ajoute 30 ml de 35 milieu Mc Coy 5A, et, après avoir agité énergiquement, on jette le milieu pour éliminer les lymphocytes. La

proportion de monocytes et de macrophages restant est déterminée par la même méthode d'essai que ci-dessus, elle est de 95 % dans chacune des boîtes.

(2) Préparation de la glycoprotéine.

5 La glycoprotéine est préparée de la manière suivante par le procédé décrit dans la demande de brevet japonais en cours d'examen n° 14.707/79 et les autres demandes de brevets précitées.

10 On ajuste à pH 8 400 litres d'urine fraîche recueillie sur des êtres humains normaux avec une solution d'hydroxyde de sodium à 10 % et on les centrifuges à 15.000 g dans une centrifugeuse continue à 0°C, ce qui éliminent les matières insolubles, et on recueille le liquide surnageant. On ajuste le liquide surnageant
15 à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique à 10 % et on le fait passer à travers une colonne (10 x 80 cm) garnie de gel de silice. On élue les constituants les constituants adsorbés sur le gel de silice avec 40 litres d'ammoniac à 5 %. On ajuste l'éluat ainsi obtenu à pH 7,5
20 avec de l'acide sulfurique 1 N, on l'additionne de sulfate d'ammonium en poudre à une concentration de 70 %, on le laisse reposer à 0°C pendant une nuit, et on recueille le précipité formé par filtration.

On dissout le précipité dans deux litres
25 d'ammoniac à 5 %, on le place dans un tube à dialyse (Visking Co.) et on le dialyse à fond contre une solution tampon phosphate 0,05 M (pH 6,5). On ajuste la solution dialysée à 10 litres avec cette solution tampon et on la fait passer à travers une colonne d'échange d'ion CM
30 Séphadex C-50 (40 x 40 cm) équilibrée avec une solution de tampon phosphate 0,05 M. On élimine les contaminants par adsorption sur la colonne échangeuse d'ions et on recueille l'effluent.

On concentre 10 litres de l'effluent ci-dessus
35 en utilisant un concentrateur à fibre creuse Diaflow (type DC-30, Amicon Co.) et on dialyse le concentrat

contre une solution tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0)
pendant une nuit à 5°C. On ajuste la solution dialysée
à 1 litre avec la même solution tampon et on la fait
passer à travers la colonne de DEAE-cellulose (4,0 x 40 cm)
5 qui a été équilibrée avec la même solution tampon. Après
lavage avec une solution tampon tris-HCl 0,1 M, on élue
les constituants adsorbés avec une solution tampon tris-
HCl 0,1 M (pH 7,0) contenant du chlorure de sodium 0,3 M.
On recueille l'éluat et on le dialyse contre une solution
10 tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0).

On fait à nouveau passer la solution dialysée
à travers la colonne de DEAE-cellulose (4,0 x 40 cm) qui
a été activée par mise en équilibre avec la même solution
tampon et élue par élution à gradient de concentration
15 linéaire de NaCl (gradient de concentration de l'ion
chlorure, 0,1 - 0,3 M) pour recueillir les fractions
élues à des concentrations d'ion chlorure de 0,15 à
0,25 M. La fraction mise en pool est additionnée de
sulfate d'ammonium en poudre à 70 % de la saturation et
20 le précipité formé est recueilli, dissout dans une
faible portion de la solution de tampon tris-HCl 0,1 M
(pH 7,0) et dialysé contre le même tampon pour recueillir
la solution dialysée (fraction A).

On développe 20 ml de la solution dialysée
25 ci-dessus sur une colonne de Séphadex G-150 (4,0 x 60 cm)
qui a été mise en équilibre avec du tampon tris-HCl 0,1 M
(pH 7,0) et on recueille les fractions correspondant
à une valeur relative d'effluent de 1,11-1,45. On dialyse
à fond la fraction combinée contre l'eau distillée et on
30 lyophilise la solution dialysée pour obtenir environ
500 mg d'une poudre (fraction B).

On dissout 200 mg de la poudre ci-dessus dans
une solution de tampon phosphate 0,02 M (pH 7,0) conte-
nant du chlorure de sodium 1,0 M et on la fait passer
35 sur une colonne d'affinité concanavoline 1 - Sépharose 4B
(100 ml) qui a été mise en équilibre avec la même solu-

tion tampon. On lave soigneusement la colonne avec un tampon phosphate 0,02 M (pH 7,0) contenant du chlorure de sodium 1,0 M puis on l'élue avec un tampon phosphate 0,02 M (pH 7,0) contenant 50 mM d' α -méthyl-D-glucoside et du chlorure de sodium 1,0 M. On dialyse l'éluat contre l'eau distillée et on lyophilise la solution dialysée.

En outre, on dissout environ 50 mg de la poudre lyophilisée obtenue ci-dessus dans 1 ml d'un tampon tris-glycine 0,125 M (pH 6,8) contenant 10 % de glycérol et on le soumet à une électrophorèse sous 10 mA en refroidissant au moyen d'un appareil d'électrophorèse préparative (Fuji Kabara - II de la Fuji Riken Co.) en utilisant un gel d'acrylamide à 8 % (pH 8,9 ; 20 x 25 mm). On recueille la fraction ayant une mobilité relative de 0,46 avec une solution tampon tris-glycine 0,025 M (pH 8,3), puis on la dialyse contre de l'eau distillée et on lyophilise la solution dialysée pour obtenir environ 10 mg de glycoprotéine. En répétant les opérations ci-dessus, on obtient environ 30 mg de glycoprotéine.

(3) Culture de monocytes et de macrophages.

On ajoute la glycoprotéine obtenue ci-dessus à 30 ml d'un milieu McCoy 5A supplémenté contenant 20 % de sérum de fœtus de veau à raison de 100 μ g/ml de milieu et on verse 30 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri qui contient des macrophages et monocytes adhérents comme il a été décrit en (1) de cet exemple. Le nombre de monocytes et de macrophages dans le milieu est de 10^6 /ml de milieu. On met à incuber le milieu préparé à 37°C pendant 3 jours dans une atmosphère humidifiée d'air à 5 % de gaz carbonique, pour obtenir un milieu conditionné contenant du CSF.

(4) Purification du CSF dans le milieu conditionné.

On centrifuge le milieu recueilli (2,000 g) à 2°C pendant 10 minutes pour recueillir environ 120 ml du

liquide surnageant limpide que l'on concentre au moyen d'une membrane d'ultrafiltration (Amicon Co. ; limite de séparation des masses molaires 10.000). On additionne le concentré de 100 ml d'une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) et on le concentre à nouveau à 5 ml.

On fait passer la solution obtenue ci-dessus dans une colonne de DEAE-cellulose (2,0 x 60 cm) qui a été mise en équilibre avec du tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) et on élue le CSF avec un gradient de concentration linéaire de NaCl (0 à 3 M). On réunit les fractions actives élevées et on les concentre au moyen de l'appareil à membrane d'ultrafiltration ci-dessus. On fait passer la solution concentrée dans une colonne de Séphadex G-150 (2,0 x 90 cm) qui a été mise en équilibre avec une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) et on la développe avec la même solution tampon pour recueillir les fractions correspondant à une masse moléculaire de 65.000 - 90.000 et les fractions correspondant à une masse moléculaire de 30.000 - 60.000. On combine ces fractions et on les concentre au moyen de l'appareil à membrane d'ultrafiltration. On additionne la solution concentrée d'eau distillée, on la désalinise et on la concentre pour obtenir environ 5 ml d'une solution contenant du CSF purifié. On trouve que cette solution a une activité de formation de 41.000 colonies de granulocytes humains par ml, cette activité étant déterminée de la même manière que dans l'exemple expérimental 1.

EXEMPLE 2

D'une manière analogue à celle de l'exemple 1, on isole des monocytes et des macrophages du sang périphérique humain et on les traite pour préparer la glucoprotéine purifiée. En utilisant un milieu préparé en ajoutant la glycoprotéine purifiée au milieu McCoy 5A exempt de sérum à raison de 100 µg/ml de milieu, on obtient environ 5 ml d'une solution contenant du CSF purifié d'une manière analogue à l'exemple 1. Cette

solution présente une activité de formation de 16.000 colonies de granulocyte humain par ml de solution, ces activités étant déterminées de la même manière que dans l'exemple expérimental 1.

5 EXEMPLE 3

D'une manière analogue à celle de l'exemple 1, on sépare des monocytes et des macrophages du sang périphérique humain et on les traite pour préparer la fraction contenant les glycoprotéines (fraction A). En
10 utilisant un milieu préparé en ajoutant cette fraction à un milieu de McCoy 5A exempt de sérum à raison de 5 mg (83,3 mg en terme de glycoprotéine)/ml de milieu, on obtient environ 120 ml d'un milieu conditionné. On dialyse le milieu conditionné contre de l'eau distillée et
15 on concentre la solution dialysée par évaporation à basse température pour obtenir environ 5 ml d'une solution contenant du CSF. Cette solution présente une activité de formation de 36.700 colonies de granulocyte humain par ml de la solution, cette activité étant
20 déterminée de la même manière que dans l'exemple expérimental 1.

EXEMPLE 4

D'une manière analogue à celle de l'exemple 1, on sépare des monocytes et des macrophages du sang
25 périphérique humain et on les traite pour préparer la fraction contenant la glycoprotéine (fraction B). En utilisant un milieu préparé en ajoutant cette fraction à un milieu de McCoy 5A contenant 10 % de sérum humain à raison de 1 mg (83,3 µg en terme de glycoprotéine)/ml
30 de milieu, on obtient environ 5 ml d'une solution contenant du CSF d'une manière analogue à celle de l'exemple 1. Cette solution présente une activité de formation de 43.200 colonies de granulocyte humain par ml de la solution, cette activité étant déterminée de
35 la même manière que dans l'exemple expérimental 1.

EXEMPLE 5

(1) Préparation de la glycoprotéine.

Conformément au procédé de Stanley et al. décrit précédemment, on prépare la glycoprotéine et les fractions contenant la glycoprotéine de la manière suivante.

On dialyse contre de l'eau à travers une membrane d'ultrafiltration 400 litres d'urine fraîche recueillie d'êtres humains normaux. On ajuste la solution dialysée à pH 7,4 et on la fait passer à travers une colonne de DEAE-cellulose (20 x 15 cm) qui a été mise en équilibre avec une solution tampon tris-HCl 0,003 M (pH 7,4), pour permettre aux substances actives de s'adsorber sur la colonne. Les substances actives adsorbées sont lavées avec 20 litres d'une solution tampon tris-HCl 0,1 M contenant du chlorure de sodium 0,04 M, puis éluées avec 20 litres d'une solution tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) contenant du chlorure de sodium 0,15 M et on dialyse l'éluat contre de l'eau distillée (fraction C).

On ajoute un gel de phosphate de calcium à la solution dialysée ci-dessus dans la proportion de 58 ml de gel/g de protéine pour permettre aux substances actives de s'adsorber sur le gel. On recueille le gel de phosphate de calcium par filtration, on le lave deux fois avec 20 litres d'un tampon phosphate 0,005 M (pH 6,5) et on l'élue avec 5 litres d'un tampon phosphate de 0,025 M. On centrifuge l'éluat à 12.000 g pendant 10 minutes pour recueillir le liquide surnageant. On dialyse le liquide surnageant contre de l'eau distillée et on concentre la solution dialysée à environ 50 ml par évaporation sous vide. On met en équilibre le concentré avec du tampon tris-HCl 0,1 M, on le fait passer dans une colonne de DEAE-cellulose (2,5 x 90 cm) qui a été mise en équilibre avec le même tampon, et on l'élue avec une solution tampon tris-HCl 0,1 M contenant du chlorure

de sodium par la technique d'élution à gradient de concentration linéaire de chlorure (gradient de concentration du chlorure de sodium 0 à 0,15 M). On recueille les fractions contenant la glycoprotéine, et on les concentre au moyen d'une membrane d'ultrafiltration (fraction D).

On soumet le concentré obtenu ci-dessus à une filtration sur gel en utilisant une colonne de Biogel P-100 (2,5 x 110 cm), qui a été mise en équilibre avec une solution tampon tris-HCl 0,03 M, pour obtenir 230 mg de glycoprotéine (produit de pureté ordinaire).

On dissout 100 mg du produit de pureté ordinaire dans une solution tampon acétate 0,1 M (pH 6,0) contenant du NaCl 1,0 M, $MgCl_2$ 0,001 M, $MnCl_2$ 0,001 M et $CaCl_2$ 0,001 M, on la fait passer sur une colonne de concanavaline A-Sépharose 4B (36 x 1,0 cm) qui a été mise en équilibre avec la même solution tampon, et on l'élue avec une solution d' α -méthyl-D-glucoside 0,1 M pour obtenir 8 mg de glycoprotéine (produit hautement purifié).

On détermine les activités biologiques sur des cellules de moelle osseuse de souris de glycoprotéines de pureté diverse par la méthode indiquée ci-dessus. Les résultats sont donnés dans le tableau 8.

TABLEAU 8

25

Echantillon	Activité spécifique
Produit semi-purifié	
Fraction A	21.000
Fraction B	54.000
Produit de pureté ordinaire	180.000
Produit hautement purifié	1.240.000

30

(2) Culture des monocytes et des macrophages et purification du CSF dans le milieu conditionné.

35

On répète les modes opératoires des exemples 1(3)

et 1-(4) excepté qu'on utilise 1.000 unités/ml de milieu de glycoprotéine de pureté ordinaire à la place de la glycoprotéine hautement purifiée. On obtient environ 5 ml d'une solution contenant du CSF purifié qui présente
5 une activité de formation de 35.000 colonies de granulocyte humain par ml de la solution.

EXEMPLE 6

On prépare environ 5 ml d'une solution contenant du CSF purifié en répétant le mode opératoire de
10 l'exemple 5, excepté qu'on utilise une glycoprotéine préparée de la manière ci-après par la méthode de Stanley and Metcalf à la place de la glycoprotéine préparée par la méthode de Stanley et al. La solution contenant du CSF purifié obtenue dans le présent exemple
15 a une activité de formation de 9.800 colonies de granulocyte humain par ml de la solution.

On dialyse 20 litres d'urine humaine contre de l'eau du robinet à la température ambiante pendant 8 à 12 heures. A la solution dialysée, on ajoute 75 g
20 de DEAE-cellulose mise en équilibre et 100 ml d'un tampon tris-HCl 1,0 M (pH 7,0). On mélange intimement le mélange obtenu pour permettre à la glycoprotéine de s'adsorber sur la DEAE-cellulose. Après avoir éliminé le liquide surnageant, on lave la DEAE-cellulose trois fois avec
25 du tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) contenant du chlorure de sodium 0,05 M. Puis on élue la glycoprotéine adsorbée avec 300 ml de tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) contenant du chlorure de sodium 0,5 M (on répète six fois cette série d'opérations). On concentre l'éluat par évaporation
30 sous vide à 40°C et on le dialyse contre du tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0). On fait passer la solution dialysée dans une colonne de DEAE-cellulose (2,3 x 44 cm) qui a été mise en équilibre avec du tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) pour permettre à la glycoprotéine de s'adsorber
35 sur la DEAE-cellulose. Après avoir lavé la colonne avec le même tampon contenant du chlorure de sodium 0,05 M, on

élue la glycoprotéine adsorbée par la technique d'élution à gradient de concentration de chlorure de sodium en utilisant un chlorure de sodium 0,1 à 0,5 M dans le même tampon. On dialyse l'éluat contre de l'eau et on concentre la solution dialysée par évaporation sous vide, puis on la lyophilise. On dissout la matière lyophilisée dans du tampon tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) et on la fait passer dans une colonne de Séphadex G-150 (2,3 x 150 cm), qui a été mise en équilibre avec le même tampon, pour recueillir la fraction de glycoprotéine. On dialyse cette fraction et on la lyophilise pour obtenir environ 12 mg d'une poudre ayant une activité spécifique sur les cellules de la moelle osseuse de souris d'environ 36.000.

EXEMPLE 7

On sépare des monocytes et des macrophages du sang périphérique humain de la même manière que dans l'exemple 1. On prépare une fraction contenant de la glycoprotéine de la même manière que ci-dessous conformément au procédé précité de Laukel et al., et on ajoute à un milieu de McCoy 5A exempt de sérum à raison de 2.000 unités/ml de milieu. En utilisant ce milieu, on effectue une culture d'une manière analogue à celle de l'exemple 5, pour obtenir 120 ml de milieu conditionné. On dialyse le milieu conditionné contre de l'eau distillée et on concentre la solution dialysée par évaporation sous vide à basse température, ce qui donne environ 5 ml d'une solution contenant du CSF, présentant une activité de formation de 29.000 colonies de granulocyte humain par ml de la solution, cette activité étant déterminée de la même manière qu'à l'exemple expérimental 1.

On dialyse contre de l'eau du robinet courante 50 litres d'urine humaine au moyen d'un appareil d'ultra-filtration sur membrane (CL 100 de la Asahi Kasei Co.). On fait passer la solution dialysée à travers une colonne DEAE-cellulose (10 x 30 cm) qui a été mise en équilibre avec du tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,3), pour permettre

à la glycoprotéine de s'adsorber sur la DEAE-cellulose. Après lavage de la colonne avec du tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,3) supplémenté avec du chlorure de sodium 0,05 M, on élue la glycoprotéine avec le même tampon supplémenté
5 avec du chlorure de sodium 0,3 M. On dialyse l'éluat contre du tampon tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) supplémenté avec NaCl 0,5 M, CaCl_2 2 mM et MgCl_2 2 mM. On fait passer la solution dialysée sur une colonne de concanavaline A - Sepharose 4B (2,6 x 40 cm) qui a été mise en
10 équilibre avec le même tampon pour permettre à la glycoprotéine de s'adsorber sur la colonne. Après avoir lavé la colonne avec le même tampon, on élue la glycoprotéine avec le même tampon supplémenté par de l' α -méthyl-D-mannoside 0,15 M. On concentre l'éluat par
15 ultrafiltration pour obtenir environ 7 ml d'une fraction contenant 6 mg en terme de protéine de glycoprotéine dans 1 ml. L'activité spécifique de cette fraction est d'environ 20.000 sur les cellules de moelle osseuse de souris.

20 EXEMPLE 8

On sépare des monocytes et des macrophages du sang périphérique humain de la même manière qu'à l'exemple 1. Une fraction contenant de la glycoprotéine (fraction D) préparée de la même manière qu'à l'exemple 5
25 est ajoutée à un milieu de McCoy 5A supplémenté avec 10 % de sérum humain à raison de 2.000 unités/ml de milieu. En utilisant ce milieu, on obtient environ 5 ml d'une solution contenant du CSF purifié d'une manière analogue à celle de l'exemple 5. Cette solution présente
30 une activité de formation de 24.000 colonies de granulocyte humain par ml de la solution, cette activité étant déterminée de la même manière que dans l'exemple expérimental 1.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'une substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoïétiques humaines, caractérisé en ce qu'on cultive des monocytes et des
5 macrophages, qui sont séparés du sang périphérique humain, dans un milieu synthétique pour culture de tissu contenant une glycoprotéine séparée de l'urine humaine et capable de stimuler la formation des granulocytes humains et des macrophages et granulocytes de souris,
10 produisant ainsi une substance active dans le milieu, et en ce qu'on recueille la substance active du milieu.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la glycoprotéine est une glycoprotéine capable de stimuler la formation de granulocytes
15 humains.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la glycoprotéine est une glycoprotéine capable de stimuler la formation de macrophages et de granulocytes de souris.

20 4. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la culture est effectuée en présence de sérum.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que le sérum présent dans le milieu
25 est du sérum humain.

6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la quantité de sérum est d'au moins 5 % par rapport au volume du milieu.

7. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que la teneur en glycoprotéine du
30 milieu est d'au moins 0,1 µg par ml du milieu.

8. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que la teneur en glycoprotéine du milieu est d'au moins 500 unités par ml du milieu.

9. Procédé de production d'une substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoiétiques humaines suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la
5 glycoprotéine est une matière partiellement purifiée accompagnée de protéines urinaires.

10. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le nombre de cellules de monocytes et de macrophages inoculées dans le milieu est d'au
10 moins 10^5 par ml du milieu.

11. Substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoiétiques humaines, caractérisée en ce qu'elle est produite par le procédé suivant la revendication 1.

15 12. Substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoiétiques humaines, caractérisée en ce qu'elle est produite par le procédé suivant la revendication 2.

20 13. Substance capable de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules souches granulopoiétiques humaines, caractérisée en ce qu'elle est produite par le procédé suivant la revendication 3.