



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85036** (13) **C2**

(51) **МПК (2006)**

A61K 38/16

A61K 31/00

A61K 39/39

A61P 35/00

A61P 37/00

A61P 43/00

C07K 5/107 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/805 (2006.01)

A61K 38/19

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІНГІБІТОР ТА СТИМУЛЯТОР ПРОЛІФЕРАЦІЇ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) 20040402942

(22) 06.04.2004

(24) 25.12.2008

(31) 08/627,173

(32) 03.04.1996

(33) US

(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.

(72) УОЛП СТВІВЕН Д., ЦИРЛОВА ІРЕН

(73) УЕЛЛСТАТ ТЕРЕПЬЮТІКС КОРПОРЕЙШН

(56) WO9325071 A1, 23.12.93.

KARELIN et al., "Proteolytic Degradation of Hemoglobin in Erythrocytes Leads to Biologically Active Peptides", PEPTIDES, 1995, Vol. 16, No. 4, pages 693-697.

(57) Пептид, який має послідовність, вибрану з групи, до складу якої входять біотин-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val, (йодо)Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val, Phe-Pro-His-(йодо)Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val та (йодо)Phe-Pro-His-(йодо)Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Al-Gln-Val.

Цей винахід має відношення до використання модуляторів проліферації стовбурових клітин для регулювання мітотичного циклу стовбурових клітин при лікуванні людей та тварин від автоімунних захворювань, старіння, раку, мієлодисплазії, передлейкозу, лейкозу, псоріазу, синдрому набутого імунodefіциту (СНІД), мієлодиспластичних синдромів, гіпопластичної анемії або інших захворювань, у тому числі гіпер- або гіпопроліферативних станів, а також до застосування таких сполук для анальгезії. Цей винахід також має відношення до способу лікування людей або тварин, яким призначено або яких було піддано обробці хіміотерапевтичними речовинами, іншими речовинами, які

пошкоджують стовбурові клітини, які знаходяться у стані мітотичної активності, або радіоактивному опроміненню та для захисту проти таких речовин під час обробок ex vivo. І, нарешті, цей винахід має відношення до поліпшення підтримки та розмноження культур стовбурових клітин для авто- та алотрансплантаційних процедур або для переносу генів, а також до обробок in vivo для поліпшення таких процедур.

Більшість клітин на термінальній стадії диференціювання у відновлювальних системах є короткоіснуючими і повинні бути безперервно замінюваними впродовж їх строку існування. Наприклад, клітини крові походять від самовідновлювальної

(13) **C2**

(11) **85036**

(19) **UA**

популяції поліпотентних гемопоетичних стовбурових клітин (HSC). Гемопоетичні стовбурові клітини є субпопуляцією гемопоетичних клітин. Гемопоетичні клітини можна одержати, наприклад, з кісткового мозку, крові пупкового канатика або периферичної крові (немобілізованої або мобілізованої за допомогою такого агента, як G-CSF (гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор); до гемопоетичних клітин належить популяція стовбурових клітин, клітини-попередники, диференційовані клітини, А-клітини, стромальні клітини та інші клітини, які вносять свій вклад до середовища, яке є необхідним для продукування зрілих клітин крові. Гемопоетичні клітини-попередники являють собою субпопуляцію стовбурових клітин, які є більш обмеженими щодо своєї здатності до розвитку. Клітини-попередники є здатними до диференціювання тільки за одним або двома напрямками (наприклад, BFU-E (еритроїдна бурсотвірна одиниця) та CFU-E (колонієтвірна одиниця еритроцитів), які забезпечують утворення лише еритроцитів або CFU-GM (гранулоцитарна-макрофагальна колонієтвірна одиниця), які забезпечують утворення гранулоцитів та макрофагів), у той час як стовбурові клітини (наприклад, CFU-MIX (колонієтвірна одиниця змішаної культури клітин) та CFU-GEMM (колонієтвірна одиниця гранулоцитів-еритроцитів-макрофагів-мегакаріоцитів) можуть утворювати численні напрямки диференціювання та/або інші стовбурові клітини. Оскільки гемопоетичні стовбурові клітини є необхідними для розвитку усіх зрілих клітин гемопоетичної та імунної систем, їх виживаність є суттєвою для повторного відтворення повністю функціональної системи захисту хазяїна у суб'єктів, яких було піддано лікуванню хіміотерапевтичними або іншими засобами.

Продукування гемопоетичних клітин регулюється цілою низкою факторів, які стимулюють ріст та диференціювання гемопоетичних клітин, причому деякі з них, наприклад, еритропоетин, GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор) та G-CSF, застосовуються зараз у клінічній практиці. Однією частиною контрольної сітки, яку не було піддано екстенсивному характеризованню, однак, є фізіологічний механізм, який контролює статус мітотичної активності стовбурових клітин [Івз (Eaves) та інші, Blood 78: 110-117, 1991; Лорд (Lord) у Stem Cells (видавець К.С. Поттен (C.S. Potten), стор.401-22, 1997 (видавництво Academic Press, Нью-Йорк)].

У попередніх дослідженнях Лорд та співробітники продемонстрували існування розчинних білкових факторів у нормальних та регенерованих екстрактах кісткового мозку, які можуть пригнічувати або стимулювати проліферацію стовбурових клітин [див. огляд у: Лорд та Райт (Wright), Blood Cells 6: 581-593, 1980; Райт та Лорімор (Lorimore), Cell Tissue Kinet. 20: 191-203, 1987; Маршалл (Marshall) та Лорд, Int. Rev. Cyt. 167: 185-261, 1996]. Ці активні продукти було позначено, як інгібітор стовбурових клітин (SCI) та стимулятор стовбурових клітин (SCS), відповідно.

До цього часу з екстрактів кісткового мозку, одержаних, як описано Лордом та іншими (оглядові статті, посилання на які зроблено перед тим), не

було очищено молекул, які відповідали б характеристикам SCS. Очищення SCS або SCI з первинних джерел не було здійснено внаслідок труднощів, пов'язаних з проведенням випробувань *in vivo*, які потребують великої кількості опромінених мишей. У намаганні перебороти згадані проблеми, Прагнелл (Pragnell) та співробітники розробили пробу *in vivo* для визначення первинних гемопоетичних клітин (CFU-A (колонієтвірна одиниця стовбурових клітин крові)) та відібрали лінії клітин, як джерело пригнічувальної активності [див., Грехем (Graham) та інші, Nature 344: 442-444, 1990]. У попередніх дослідженнях макрофаги було ідентифіковано, як можливі джерела SCI [Лорд та інші, Blood Cells 6: 581-593, 1980], та відібрано лінію клітин макрофагів мишей J774.2 [Грехем та інші, Nature 344: 442-444, 1990]. Кондиціоноване середовище з цієї лінії клітин було використано Грехемом та іншими для очищення; було виділено пептид-інгібітор, який виявився ідентичним до попередньо описаного цитокіну - макрофагального медіатора алергічного запалення 1-альфа (MIP-1 α). Було клоновано рецептори для MIP-1 α ; подібно іншим хемокінетичним рецепторам, згадані рецептори MIP-1 α є рецепторами сьомого трансмембранного домену (або "G-пов'язаними" рецепторами), з'єднаними з білками, які зв'язують гуаніновий нуклеотид (GTP), G_i пригнічувального підкласу ("G_i") [огляд наведено у Мурфі (Murphy), Cytokine & Growth Factor Rev., 7: 47-64, 1996]. Позначення "пригнічувальний" відносно підкласу G_i вказує на його пригнічувальний вплив на аденілатциклазу.

MIP-1 α було виділено з лінії клітин, а не з первинного матеріалу. У той час як Грехем та інші спостерігали, що антитіла до MIP-1 α анулювали активність неочищеного екстракту кісткового мозку, інші дослідники продемонстрували важливість інших пригнічувальних активних продуктів. Наприклад, Грехем та інші [J. Exp. Med., 178: 925-32, 1993] висловили припущення щодо того, що головним інгібітором гемопоетичних стовбурових клітин є TGF β (трансформувальний фактор росту), а не MIP-1 α . Додатково, Івз та інші (PNAS, 90:12015-19, 1993) висловили припущення щодо того, що як MIP-1 α , так і TGF β , є присутніми у нормальному кістковому мозку на субоптимальних рівнях і що пригнічення вимагає синергізму між двома згаданими факторами.

Нещодавно були одержані миші, ген MIP-1 α у яких було видалено шляхом гомологічної рекомбінації [Кук (Cook) та інші, Science 269: 1583-5, 1995]. У таких мишей не спостерігається явного розладу гемопоетичної системи, що ставило б під сумнів роль MIP-1 α , як фізіологічного регулятора мітотичної активності стовбурових клітин за нормальних гомеостатичних умов. Подібним же чином, незважаючи на те, що трансформувальний фактор росту бета (TGF β) також має пригнічувальний вплив на стовбурові клітини, тривалий період часу, якого потребують стовбурові клітини для відповіді на цей цитокін, дозволяє припустити, що він не є ендогенним фактором, присутнім у екстрактах кісткового мозку; додатково, нейтралізуючі антитіла до TGF β не ліквідують активності SCI у

супернатантах кісткового мозку [Гемпсон (Hampson) та інші, *Exp. Nemat.* 19: 245-249, 1991].

Інші дослідники описують додаткові інгібуючі фактори стовбурових клітин. Фріндел (Frindel) та співробітники виділили тетрапептид з кісткового мозку зародка великої рогатої худоби та з екстрактів печінки, який має інгібиторну активність відносно стовбурових клітин [Ленфант (Lenfant) та інші, *PNAS*, 86: 779-782, 1989]. Пауковіц (Paukovits) та інші [*Cancer Res.* 50: 328-332, 1990] визначили характеристики пентапептиду, який, у своїй мономерній формі, є інгібитором, а у своїй димерній формі – стимулятором мітотичної активності стовбурових клітин. Інші фактори також було заявлено, як інгібітори у різних системах *in vitro* [див., Райт та Прагаелл у *Bailliere's Clinical Haematology*, том 5, стор.723-39, 1992 (Bailliere Tindall, Париж); Маршалл та Лорд, *Int. Rev. Cyt.* 167: 185-261, 1996].

Цирлова (Tsyrlova) та інші, авторське свідоцтво СРСР №1561261, розкриває процес очищення інгібітора проліферації стовбурових клітин.

[У міжнародних заявках WO 94/22915 та WO 96/10634] розкривається інгібітор проліферації стовбурових клітин, і, завдяки цьому, їх у повному обсязі включено до цього опису посиланням.

До цього часу жоден з цих факторів не було схвалено до клінічного використання. Існує, однак, необхідність у ефективних інгібіторах стовбурових клітин. Головним токсичним ефектом, пов'язаним з хіміотерапією або променевою терапією, є знищення нормально проліферуючих клітин, наслідком чого може бути супресія кісткового мозку або токсичний вплив на шлунково-кишковий тракт. Ефективний інгібітор стовбурових клітин забезпечить захист цих клітин та дозволить оптимізувати згадані схеми лікування. Подібно тому, як існує підтверджена потреба у різноманітних стимулювальних цитокінах (наприклад, таких цитокінів, як ІЛ(інтерлейкін)-1, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-7, ІЛ-9, ІЛ-11, ІЛ-13, ІЛ-14, ІЛ-15, G-CSF, GM-CSF, еритропоетин, тромбопоетин, фактор стовбурових клітин, ліганд *flk2/flt3* і т.п., які стимулюють мітотичну активність гемопоетичних клітин) у залежності від клінічної ситуації, також, можливо, з'явиться необхідність і у різноманітних інгібуючих факторах для задоволення різних клінічних потреб.

Додатково, існує необхідність у швидкому обертанні (реверсуванні) напрямку активності такого інгібітора. Попередні дослідження Лорда та інших (оглядові роботи, посилання на які було зроблено перед тим) продемонстрували, що інгібіторна активність може бути реверсована шляхом додання стимулювального активного продукту. Незважаючи на те, що було ідентифіковано різноманітні стимулювальні цитокіни стовбурових клітин (див. перед тим), жоден з них не був продемонстрований, як такий активний продукт, опис якого наведено Лордом та співробітниками, що є присутнім у екстрактах кісткового мозку або здатним до реверсування активності інгібітора.

Гемопоетичні клітини-попередники та стовбурові клітини у нормальних дорослих людей знаходяться, головним чином, у кістковому мозку. За певних умов, наприклад, під час хіміотерапії або лікування цитокінами, наприклад, G-CSF, значна

кількість згаданих клітин-попередників та стовбурових клітин виходить до периферичної крові. Цей процес називають "мобілізацією" [огляд у Сіммонс (Simmons) та інші, *Stem Cells* 12 (додаток 1): 187-202, 1994; Шедінг (Scheding) та інші, *Stem Cells* 12 (додаток 1):203-11, 1994; Манген (Mangan), *Sem. Oncology*, 22: 202-9, 1995; Мултен (Moolten), *Sem. Oncology*, 22: 271-90, 1995]. Нещодавно опубліковані дані дозволяють зробити припущення, що переважна більшість мобілізованих клітин-попередників не відіграє активної ролі у мітотичному циклі [Роберте (Roberts) та Меткалф (Metcalf), *Blood*, 86: 1600-, 1995; Донахью (Donahue) та інші, *Blood*, 87: 1644-, 1996; Зігерт (Sieger) та Серке (Serke), *Bone Marrow Trans.*, 17: 467-, 1996; Учіда (Uchida) та інші, *Blood* 89: 465-72, 1997].

Гемоглобін є висококонсервативним тетрамерним білком, молекулярна маса якого дорівнює приблизно 64000 Да. Він складається з двох альфа- та двох бета-ланцюгів. Кожен зі згаданих ланцюгів зв'язує одну молекулу гему (феропротопорфірину IX) залізовмісної простетичної групи. Альфа- та бета-ланцюги хребетних, можливо, були утворені з одного предкового гена, який подвоївся з подальшою дивергенцією; два ланцюги зберігають значний рівень ідентичності послідовностей як між собою, так і між різними хребетними (див. Фіг.16А). У людини, альфа-ланцюговий кластер на хромосомі 16 вміщує два альфа-гени (альфа 1 та альфа 2), які кодують ідентичні поліпептиди, а також гени, які кодують інші альфаподібні ланцюги: дзета, тета та декілька нетранскрибованих псевдогенів (див. Фіг.16В: кДНК та амінокислотні послідовності альфа-ланцюга людини). Бета-ланцюговий кластер на хромосомі 11 складається з одного бета-ланцюгового гена та декількох бетаподібних генів: дельта, епсилон, G-гамма та A-гамма, а також, щонайменше, двох неекспресованих псевдогенів (див. Фіг.16С: кДНК та амінокислотні послідовності бета ланцюга людини).

Експресія цих генів змінюється впродовж розвитку. Під час гемопоезу у людини, який було екстенсивно охарактеризовано, еритробласти зародка успішно синтезують тетрамери двох дзета-ланцюгів та двох епсилон-ланцюгів (Gower I), двох альфа-ланцюгів та двох епсилон-ланцюгів (Gower II) або двох дзета-ланцюгів та двох гамма-ланцюгів (Hb Portland). Впродовж ембріогенезу переважаюча форма являє собою зародковий гемоглобін (Hb F), до складу якого входить два альфа-ланцюги та два гамма-ланцюги. Гемоглобін дорослої людини (два альфа- та два бета-ланцюги) починає синтезуватись впродовж зародкового періоду; під час народження 50% гемоглобіну знаходиться у дорослій формі і перехід завершується приблизно на 6 місяці життя. Переважаюча більшість гемоглобіну (приблизно 97%) у дорослої людини належить до різновиду з двома альфа- та двома бета-ланцюгами (Hb A) з існуванням незначних кількостей Hb F або дельта-ланцюга (Hb A₂).

Для експресування рекомбінантних гемоглобін-нових ланцюгів у *E. coli* та дріжджів використову-

ють декілька методів [наприклад, Джессен (Jessen) та інші, *Methods Enz.*, 231: 347-364, 1994; Люкер (Looker) та інші, *Methods Enz.*, 231: 364-374, 1994; Огден (Ogden) та інші, *Methods Enz.*, 231: 374-390, 1994; Мартін де Льяно (Martin de Llano) та інші, *Methods Enz.*, 231: 364-374, 1994]. Поки що виділений альфа-ланцюг людини експресувати рекомбінантними методами у значних кількостях неможливо [наприклад, Гофман (Hoffman) та інші, *PNAS* 87: 8521-25, 1990; Ернан (Hernan) та інші, *Biochem.* 31: 8619-28, 1992]. Очевидно, виділений альфа-ланцюг не набуває стійкої конформації і швидко деградує у *E. coli*. Наслідком коекспресії бета-ланцюга з альфа-ланцюгом є підвищена експресія обох (Гофман та інші, та Ернан та інші, цитовані роботи). Незважаючи на те, що альфа-ланцюг було експресовано, як злитий білок із частиною бета-ланцюга та сайтом розпізнавання фактора Ха [Haraї (Nagai) та Торгерсен (Thorgersen), *Methods Enz.*, 231: 347-364, 1994], за цих умов він експресується, як нерозчинне тіло включення.

До складу як бета-ланцюга, так і альфа-ланцюга входять сайти зв'язування гаптоглобіну. Гаптоглобін є білком сироватки з надзвичайно високою спорідненістю до гемоглобіну [наприклад, Патнем (Putnam) у *The Plasma Proteins-Structure, Function and Genetic Control* (видавець Патнем Ф.В. (Putnam F.W.)), том 2, стор.1-49 (видавництво Academic Press, Нью-Йорк)); Хванг (Hwang) та Гріп (Greer), *JBC*, 255: 3038-3041, 1980]. Транспортування гаптоглобіну до печінки є головним катаболічним шляхом циркулювання гемоглобіну. Для гаптоглобіну існує один зв'язувальний сайт на альфа-ланцюзі (амінокислоти 121-127) та два на бета-ланцюзі (ділянки амінокислот 11-25 та 131-146) [Казім (Kazim) та Атацці (Atassi), *Biochem. J.* 197: 507-510, 1981; Маккормік (McCormick) та Атацці, *J. Prot. Chem.* 9: 735-742, 1990].

Біологічно активні пептиди з опіатною активністю було одержано шляхом протеолітичного розщеплення гемоглобіну [огляд у Карелін (Karelin) та інші, *Peptides*, 16: 693-697, 1995]. Альфа-ланцюг гемоглобіну має кислотолабільний сайт розщеплення між амінокислотами 94-95 [Шефер (Shaeffer), *J. Biol. Chem.* 269: 29530-29536, 1994].

Крегаєр (Kregler) та інші [Ехр. *Nemat.* 9: 11-21, 1981] встановили, що гемоглобін має підсилювальний вплив на колонії клітин-попередників кісткового мозку мишей (CFU-C). Такі проби демонструють вплив на популяції клітин-попередників CFU-GM та CFU-M (макрофагальна колонієтворна одиниця), у протилежність до таких стовбурових клітин, як CFU-MIX. Згадані автори спостерігали активність на обох виділених альфа- та бета-ланцюгах гемоглобіну. Цю активність було ліквідовано шляхом обробки N-етилmaleїмідом, що дало змогу Креглеру та іншим припустити необхідність сульфгідрильних груп. Це спостереження, разом з фактом того, що стимуляторна активність була стійкою до розщеплення трипсином, дозволили Креглеру та іншим зробити припущення про те, що за згадану активність відповідає C-кінцевий гідрофобний домен або "центральна" ділянка. Мокатташ (Moqattash) та інші [Acta. *Haematol.* 92: 182-186, 1994] встановили, що рекомбінантний гемо-

глобін має стимуляторний вплив на кількість клітин-попередників CFU-E, BFU-E та CFU-GM, що співпадало зі спостереженнями відносно геміну. Меллер (Mueller) та інші [Blood 86: 1974, 1995] встановили, що очищений гемоглобін дорослої людини стимулює клітини-попередники еритроцитів таким же самим чином, що і клітини-попередники геміну.

Петров (Petrov) та інші [Bioscience Reports 15: 1-14, 1995] розкрив застосування "неідентифікованої мієлопептидної суміші" при лікуванні гемолітичної анемії у мишей лінії W^v/W^v. Згадана суміш підвищувала численність колоній селезінки, зокрема, колоній еритроїдного типу.

Гем та гемін було піддано екстенсивному дослідженню відносно їх впливу на гемопоєз [див. оглядові роботи С. Саеса (S. Sassa) *Seminars Hematol.* 25: 312-20, 1980 та Н. Абрахама (N. Abraham) та інших, *Int. J. Cell Cloning*, 9: 185-210, 1991]. Гем є необхідним для визрівання еритроblastів; гемін (хлорфєропротопорфєрин IX, тобто гем з додатковим іоном хлориду) *in vitro* підвищує проліферацію CFU-GEMM, BFU-E та CFU-E. Подібним же чином, гемін підвищує об'єм клітинного вмісту у культурах декстерівського типу.

"Опіати" є речовинами з аналгетичними властивостями, подібними морфіну, головній активній речовині опію. Опіати можуть бути невеликими органічними молекулами, такими як морфін, інші алкалоїди або синтетичні сполуки, або ендогенними пептидами, наприклад, енкефалінами, ендорфінами, динорфінами та їх синтетичними похідними. Ендогенні опіатні пептиди продукуються *in vivo* з більших попередників - передпроенкефаліну А у разі Met- та Leu-енкефалінів, передпроопіомеланокортину у разі α , β та γ ендорфінів, та передпродінорфіну у разі динорфінів А та В, α -неоендорфіну та β -неоендорфіну. На додаток до цього, пептиди з опіатною активністю можуть бути одержаними з неklasичних джерел, наприклад, внаслідок протеолізу або гідролізу білків, наприклад, α або β казеїну, пшеничної клейковини, лактальбуміну, цитохромів або гемоглобіну, або з інших видів, наприклад, жаб'ячої шкіри (дерморфіни) або мозкової речовини надниркових залоз великої рогатої худоби. Такі пептиди називають "екзорфінами", у протилежність до класичних ендорфінів; їх також називають атиповими опіатними пептидами [Зудру (Zioudrou) та інші, *JBC* 254: 2446-9, 1979; Кіріон (Quiñon) та Вайсс (Weiss), *Peptides* 4:445, 1983; Лукас (Loukas) та інші, *Biochem.* 22: 4567, 1983; Брантл (Brantl), *Eur. J. Pharm.* 106: 213-14, 1984; Брантл та інші, *Eur. J. Pharm.* 111: 293-4, 1985; Брантл та інші, *Eur. J. Pharm.* 125: 309-10, 1986; Брантл та Нубер (Neubert), *TIPS* 7: 6-7, 1986; Гламста (Glamsta) та інші, *BBRC* 184: 1060-6, 1992; Тешмахер (Teschemacher), *Handbook Exp. Pharm.* 104: 499-28, 1993; Петров та інші, *Bioscience Reports* 15: 1-14, 1995; Карелін та інші, *Peptides* 16: 693-7, 1995]. Крім того, було також показано, що інші ендогенні пептиди, наприклад, сімейства Tyr-MIF (фактор гальмування міграції)-1, також мають опіатну активність [Рід (Reed) та інші, *Neurosci. та Biobehav. Rev.* 18: 519-25, 1994].

Опіати здійснюють свій вплив шляхом зв'язування ендogenous опіатних рецепторів трьох головних фармакологічних класів - міу, дельта та каппа. Рецептори, які представляють кожний фармакологічний клас, було клоновано і показано, що це є G-зв'язані рецептори, які відносяться до G_i [огляд у: Пізін (Reisine) та Белл (Bell), *TINS* 16: 506-510, 1993; Уль (Uhl) та інші, *TINS* 17: 89-93, 1994; Кнапп (Knapp) та інші, *FASEB J.* 9: 516-525, 1995; Сато (Sato) та Мінамі (Minami), *Pharm. Ther.* 68: 343-64, 1995; Кіфер (Kieffer), *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 615-635, 1995; Пізін, *Neuropharm.* 34: 463-472, 1995; Закі (Zaki) та інші, *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* 36: 379-401, 1996].

Специфічні агоністи та антагоністи є доступними для рецептора кожного типу, наприклад, для міу рецепторів (які вибірково активізуються DAMGO та DALDA і вибірково антагонізуються STOP та налоксоназіном), для каппа рецепторів (які вибірково активізуються фумаратом GR 89696 та U-69593 і вибірково антагонізуються погбіналторфіміну гідрохлоридом) та для дельта рецепторів (які вибірково активізуються DADLE та DPDPE і вибірково антагонізуються натріндолом). На додаток до цього, існують антагоністи широкого спектру дії (наприклад, налоксон) та агоністи (наприклад, еторфін), які діють на рецептори усіх трьох підтипів.

Як класичні, так і атипові опіатні пептиди можуть піддаватись хімічним змінам або дериватизуватись для зміни їх специфічних властивостей зв'язування опіатних рецепторів [огляд у: Грабі (Hruby) та Геріг (Gehrig), *Med. Res. Rev.* 9: 343-401, 1989; Шіллер (Schiller), *Prog. Med. Chem.* 28: 301-40, 1991; Тешмахер, *Handbook Exp. Pharm.* 104: 499-28, 1993; *Handbook of Experimental Pharmacology*, А. Герц (A. Hertz) (видавець), томи 104/І та 104/ІІ, 1993, видавництво Springer Verlag, Берлін; Карелія та інші, *Peptides*, 16: 693-7, 1995]. До прикладів належать похідні дерморфіну (наприклад, DALDA) та енкефалінів (наприклад, DADLE, DAMGO або DAMME). Пептиди, які за нормальних умов не зв'язуються з опіатними рецепторами, наприклад, соматостатин, також можуть бути дериватизованими для демонстрування специфічного зв'язування опіатних рецепторів (наприклад, STOP [Хокінс (Hawkins) та інші, *J. Pharm. Exp. Ther.* 248: 73, 1989]). Аналоги можуть бути також одержаними з алкалоїдів, наприклад, морфіну, зі зміненими властивостями зв'язування рецептора (наприклад, героїн, кодеїн, гідроморфон, оксиморфон, леворфанол, левалорфан, гідроксидон, оксикодон, наторфін, налоксон, налтрексон, бупренорфін, буганорфанол та налбуфін); на додаток до цього, невеликі молекули, які структурно не пов'язані з морфіном, також можуть діяти на опіатні рецептори (наприклад, меперидин та представники того ж роду альфапродин, дифеноксилат та фентаніл) [див. *Handbook of Experimental Pharmacology*, цитовано перед тим; *The Pharmacological Basis of Therapeutics* Гудмана та Гілмана, 7 видання, А.Г. Гілман (A.G. Gilman), Л.С. Гудман (L.S. Goodman), Т.В. Ралл (T.W. Rail) та Ф. Мурад (F. Murad) (видавці) 1985, компанія Macmillan Publishing Co., Нью-Йорк].

Ендogenous опіатні пептиди (енкефаліни, ендорфіни та динорфіни) мають консервативний N-кінцевий тетрапептид Tyr-Gly-Gly-Phe, за яким ідуть Leu або Met та будь-яка залишкова C-кінцева послідовність. Наслідком видалення гідроксильної групи на N-кінцевому Tyr (що веде до появи N-кінцевого Phe) є повна втрата активності відносно Met-енкефаліну. Ці структурні дані ведуть до появи гіпотези "інформація-адреса", за якою N-кінцева "інформація" передає біологічну активність, у той час як C-кінцева "адреса" передає специфічність та підсилену активність [Чавкін (Chavkin) та Гольдштейн (Goldstein), *PNAS* 78: 6543-7, 1981]. Екзорфіни, як правило, мають Tyr-Pro, які заміщують N-кінцеві Tyr-Gly класичних опіатних пептидів; проліновий залишок, як гадають, надає підвищену стійкість проти амінопептидазного розщеплення [Шіп (Shipp) та інші, *PNAS* 86: 287-, 1989; Гламста та інші, *BBRC* 184: 1060-6, 1992].

Нещодавно було клоновано сирітський рецептор ("ORL1") внаслідок спорідненості його послідовності з опіатними рецепторами міу, дельта та каппа [Моллеро (Mollereau) та інші, *FEBS* 341: 33-38, 1994; Фукада (Fukuda) та інші, *FEBS* 343: 42-46, 1994; Бунзов (Bunzow) та інші, *FEBS* 347: 284-8, 1994; Чен (Chen) та інші, *FEBS* 347: 279-83, 1994; Ванг (Wang) та інші, *FEBS* 348: 75-79, 1994; Кейт (Keith) та інші, *Reg. Peptides* 54: 143-4, 1994; Вік (Wick) та інші, *Mol. Brain Res.* 27: 37-44, 1994; Хелфорд (Halford) та інші, *J. Neuroimmun.* 59: 91-101, 1995]. Було клоновано ліганд для цього рецептора, який називають по-різному-ноціцептином або сирітським FQ (у подальшому він буде називатись "ноціцептин"). Було показано, що він є гептадекапептидом, який було одержано з більшого попередника [Муньє (Meunier) та інші, *Nature* 377: 532-535, 1995; Райншайд (Reinscheid) та інші, *Science* 270: 792-794, 1995]. Було показано, що він має проноціцептивні, гіпералгетичні функції *in vivo*, у протилежність до класичних опіатів, які мають анальгетичні властивості. Ноціцептин має Phe-Gly-Gly-PheN-кінцеву ділянку, у протилежність до Tyr-Gly-Gly-PheN-кінцевої ділянки класичних опіатних пептидів, які обговорювались перед тим. У відповідності до вимоги присутності N-кінцевого Tyr для опіатної активності у класичних опіатних пептидів, ноціцептин майже не демонструє або демонструє незначну спорідненість до опіатних рецепторів міу, каппа або дельта. Подібним же чином, у опіатного антагоніста широкого спектру дії налоксону відсутня помітна спорідненість до ORL1.

Спостерігалось, що енкефаліни мають вплив на гематопоез мишачих *in vivo* за умов іммобілізаційного стресу [Гольдберг (Goldberg) та інші, *Folia Biol. (Прага)* 36: 319-331, 1990]. Leu-енкефалін пригнічував, а met-енкефалін стимулював гемопоєз кісткового мозку. Ці ефекти були опосередковані, як гадають Гольдберг та інші, внаслідок впливу на рівні глюкокортикоїдів та міграцію Т-лімфоцитів. Крізанак-Бенгез (Rizanas-Bengez) та інші [Biomed. & Pharmacother. 46: 367-43, 1992; Biomed. & Pharmacother. 49: 27-31, 1995; Biomed. & Pharmacother. 50: 85-91, 1996] досліджували ефекти цих сполук *in vitro*. Попередня обробка кісткового мозку мишачих Met- або Leu-енкефаліном

або налоксоном впливала на кількість клітин-попередників GM, що спостерігалась під час аналізу колоній. Цей ефект був дуже змінним і наслідком його була супресія, стимуляція або відсутність ефекту; додатково, була відсутня чітка залежність між дозою та реакцією. Ця змінність Крізанакон-Бенгезом та іншими була віднесена на рахунок циркадних ритмів та А-клітин.

Нещодавно було продемонстровано, що миші, мію-опіатний рецептор у яких було видалено за допомогою гомологічної рекомбінації, мають підвищену кількість CFU-GM, BFU-E та CFU-GEMM на стегнову кістку. Клітини-попередники селезінки та кісткового мозку у цих мишей з видаленим мію-рецептором мали більш високу мітотичну активність, у порівнянні до нормальних мишей. Не було визначено, чи були ці ефекти обумовлені прямим або опосередкованим впливом на стовбурові клітини кісткового мозку внаслідок відсутності мію-рецептора у цих тварин [Броксмейер (Broxmeyer) та інші, Blood 88: 338a, 1997].

I. Хіміотерапія та радіотерапія раку

Наслідком продуктивного дослідження факторів стимулювання росту є клінічне використання цілого ряду згаданих факторів (еритропоетин, G-CSF, GM-CSF тощо). Ці фактори зменшили рівень захворюваності та смертності, пов'язаний з хіміотерапевтичною та променевою терапією. Додаткові клінічні благотворні наслідки для пацієнтів, які піддаються хіміотерапії або опроміненню, можуть бути реалізовані альтернативною стратегією блокування надходження стовбурових клітин до мітотичного циклу, завдяки чому забезпечується їх захист від побічних токсичних ефектів. Реверсування цього захисту забезпечить швидке відновлення функції кісткового мозку після хіміо- або радіотерапії.

II. Трансплантування кісткового мозку та стовбурових клітин, ex vivo розмноження стовбурових клітин та десенсибілізування пухлинних клітин

Трансплантація кісткового мозку (BMT) є придатним лікуванням для різноманітних гематологічних, аутоімунних та злоякісних захворювань. У лікувальних методах, які застосовуються на цей час, використовують гемопоетичні клітини, одержані з крові пупкового канатика, печінки зародка або з периферичної крові (немобілізованої або мобілізованої такими речовинами, як G-CSF або циклофосфамід), а також з кісткового мозку; стовбурові клітини можуть бути неочищеними, частково очищеними (наприклад, шляхом афінної очистки популяції CD34⁺) або високоочищеними (наприклад, за допомогою клітинного сортера зі збудженням флуоресценції з використанням таких маркерів, як CD34, CD38 або родамину). Маніпулювання гемопоетичними клітинами ex vivo використовують зараз для розмноження первинних стовбурових клітин для одержання популяції, придатної для трансплантації. Оптимізація цієї процедури потребує: (1) достатньої кількості стовбурових клітин, здатних до підтримки довгострокового відновлення гемопоезу; (2) вичерпання Т-лімфоцитів, які індукують реакцію "трансплантат проти хазяїна" та (3) відсутності залишкових злоякісних клітин. Ця процедура може бути оптимізо-

вана шляхом включення інгібітора(-ів) стовбурових клітин та/або стимулятора(-ів) стовбурових клітин.

Ефективність десенсибілізування гемопоетичних клітин цитотоксичними лікарськими засобами для винищення залишкових злоякісних клітин обмежена внаслідок токсичності цих сполук для нормальних гемопоетичних клітин і особливо, стовбурових клітин. Існує необхідність у ефективному захисті нормальних клітин під час десенсибілізування; захист може забезпечуватись шляхом вилучення стовбурових клітин з мітотичного циклу за допомогою ефективного інгібітора.

III. Збирання периферичних стовбурових клітин

Стовбурові клітини периферичної крові (PBSC) мають ряд потенційних переваг над кістковим мозком для аутологічної трансплантації. Пацієнти, позбавлені придатних ділянок для збору кісткового мозку внаслідок розповсюдження пухлини або попередньої радіотерапії, можуть піддаватись збиранню PBSC. Застосування стовбурових клітин крові виключає необхідність загального анестезування та хірургічних процедур у пацієнтів, які погано їх переносять. Технологія аферезу, необхідна для збирання клітин крові, є ефективною та широкодоступною у більшості значних медичних центрів. Головними обмеженнями згаданого способу є низька нормальна постійна частота стовбурових клітин у периферичній крові та їх високий мітотичний статус після мобілізаційних процедур за допомогою лікарських засобів або факторів росту (наприклад, циклофосфаміду, G-CSF, фактора стовбурових клітин). Ефективний інгібітор стовбурових клітин буде корисним для повернення цих клітин до неактивного стану, що сприятиме тим самим запобіганню їх втрати внаслідок диференціації.

IV. Лікування гіперпроліферативних розладів

Характерним для цілого ряду хвороб є гіперпроліферативний стан, при якому розрегульовані стовбурові клітини забезпечують перепродукування клітин на термінальній стадії диференціювання. До таких хвороб належать, але ними не обмежуються, псоріаз, при захворюванні яким відбувається перепродукування епідермальних клітин, стани, які передують утворенню злоякісних пухлин у шлунково-кишковому тракті, які характеризуються появою кишкових поліпів, та синдром набутого імунodefіциту (СНІД), коли первинні стовбурові клітини не є інфікованими вірусом імунodefіциту людини (ВІЛ), але мають високу мітотичну активність, наслідком чого є вичерпання стовбурових клітин. Інгібітор стовбурових клітин буде корисним при лікуванні таких станів.

V. Лікування гіпопроліферативних розладів

Характерним для цілого ряду хвороб є гіпопроліферативний стан, при якому розрегульовані стовбурові клітини не забезпечують достатнього рівня продукування клітин на термінальній стадії диференціювання. До таких хворобливих станів належать мієлодиспластичні синдроми або апластична анемія, при яких спостерігається недостатній рівень продукування клітин крові, та стани, пов'язані зі старінням, при яких спостерігається дефіцитне відновлення та заміщення клітин. Сти-

мулятор стовбурових клітин буде корисним при лікуванні таких станів.

VI. Перенос генів

Зараз у клінічних умовах використовують здатність до переносу генетичної інформації до гемопоетичних клітин. Гемопоетичні клітини є придатними мішенями для генної терапії, що обумовлено легким доступом, широким досвідом маніпулювання та лікування цієї тканини *ex vivo* та завдяки здатності клітин крові до проходження через тканини. На додаток до цього, стає можливою корекція певних генетичних дефектів людини шляхом введення функціонального гена до первинних стовбурових клітин гемопоетичної системи людини.

Існує декілька обмежень для введення генів до гемопоетичних клітин людини за допомогою векторів на основі ретровірусів або фізичних способів переносу гена: (1) Низька частота стовбурових клітин у гемопоетичних тканинах обумовила необхідність розвитку високоефективних способів переносу генів; та (2) стовбурові клітини з підвищеною мітотичною активністю виявились більш вразливими до векторного інфікування, однак підвищення частоти інфікування шляхом стимулювання проліферації стовбурових клітин ростовими факторами викликає негативні наслідки щодо довгострокової експресії генів, оскільки клітини, до складу яких входять трансгени, примушуються до необоротної диференціації і втрачають здатність до самооновлення. Ці проблеми можна поліпшити шляхом використання інгібітора стовбурових клітин для запобігання диференціації та втраті здатності до самооновлення, та стимулятора стовбурових клітин для регулювання вступу стовбурових клітин до мітотичного циклу і, тим самим, полегшити перенос генів, опосередкований ретровірусами.

Цей винахід має відношення до сполук, до яких належать пептиди та поліпептиди, які є інгібіторами та/або стимуляторами проліферації стовбурових клітин (INPROL або опіатні сполуки), та їх використання.

Цей винахід включає інгібітор проліферації стовбурових клітин, який характеризується наступними властивостями:

(a) Питома активність (IC_{50}), яка є меншою ніж або дорівнює 20нг/мл у пробі на колонієтворні одиниці селезінки (CFU-S) мишачих (див. Приклад 4),

(b) Молекулярна маса більша 10000 та менша 100000Да (визначена ультрафільтрацією),

(c) Активний продукт, чутливий до розщеплення трипсином,

(d) Більш гідрофобний, ніж MIP-1 α або TGF β та відокремлюється від обох за допомогою хроматографії зі зворотною фазою (див. Приклад 12),

(e) Біологічна активність зберігається після нагрівання впродовж 1год. при 37°C, 55°C або 75°C у водному розчині, та

(f) Біологічна активність зберігається після осадження 1% хлористоводневою кислотою у ацетоні.

Цей винахід додатково характеризується та відрізняється від інших придатних інгібіторів стовбурових клітин (наприклад, MIP-1 α , TGF β та різноманітних олігопептидів) його здатністю до забезпечення пригнічення у пробі *in vitro* після

короткого передінкубаційного періоду (див. Приклад 5).

До складу цього винаходу також входять фармацевтичні композиції, які включають INPROL, для лікування різноманітних розладів.

Цей винахід надає спосіб лікування суб'єкта, якому призначено введення засобу, здатного вбити або пошкодити стовбурові клітини, шляхом введення згаданому суб'єктові ефективної кількості композиції, яка пригнічує стовбурові клітини. Стовбуровими клітинами, які захищаються цим способом, можуть бути гемопоетичні стовбурові клітини, які звичайно є присутніми та діляться у кістковому мозку, крові пупкового канатика, печінці зародка або мобілізуються до периферичної крові. У той час як більшість мобілізованих стовбурових клітин, за результатами аналізу за допомогою клітинного сортера зі збудженням флуоресценції (FACS), знаходиться у неактивному стані, поліпотентні стовбурові клітини знаходяться у стані мітотичної активності та піддаються пригніченню за допомогою INPROL у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин. У альтернативному варіанті, стовбурові клітини можуть бути епітеліальними, розміщеними, наприклад, у кишках, на вкритій волоссям частині голови або на інших ділянках тіла або статевих клітин, які знаходяться у репродуктивних органах. Спосіб за цим винаходом може бути, у варіанті, якому віддається перевага, застосованим на людині, хоча цим способом передбачається також лікування тварин. Термін "суб'єкт" або "пацієнт", який використано у цьому описі, означає тварину, наприклад, ссавця, у тому числі людину.

Цей винахід надає також спосіб лікування суб'єкта з гіпопроліферацією стовбурових клітин шляхом введення згаданому суб'єктові ефективної кількості композиції, яка стимулює стовбурові клітини. Згаданими стовбуровими клітинами, які стимулюються цим способом, можуть бути гемопоетичні стовбурові клітини, які звичайно є присутніми у кістковому мозку, крові пупкового канатика, печінці зародка або мобілізуються до периферичної крові; згадані стовбурові клітини могли бути попередньо переведеними до неактивного стану шляхом застосування INPROL у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин. INPROL у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, надасть змогу стимулювання мітотичної активності стовбурових клітин за потребою, наприклад, після збирання стовбурових клітин для використання під час розмноження *ex vivo* або *in vivo* після трансплантації та приживлення стовбурових клітин. У альтернативному варіанті, стовбурові клітини можуть бути епітеліальними, розміщеними, наприклад, у кишках, на вкритій волоссям частині голови або на інших ділянках тіла або статевими клітинами, які знаходяться у репродуктивних органах.

За іншим аспектом, цей винахід надає спосіб захисту та відновлення гемопоетичної, імунної або іншої системи стовбурових клітин пацієнта, якого було піддано хіміотерапії, який включає введення згаданому пацієнтові ефективної кількості INPROL, яка забезпечує пригнічення стовбурових клітин

та/або стимулює поздоровлення після хіміотерапії або променевої терапії шляхом введення ефектвної кількості INPROL, яка забезпечує стимулювання стовбурових клітин.

За додатковим аспектом, цей винахід пропонує спосіб допоміжного лікування раку будь-якого типу, у тому числі такого, який відрізняється твердими пухлинами (наприклад, грудної залози, товстої кишки, легень, тестикулярного, яєчника, печінки, нирок, підшлункової залози, мозку, саркоми), шляхом введення пацієнту, який страждає на рак, ефективної кількості INPROL, яка забезпечує пригнічення стовбурових клітин, для захисту згаданих стовбурових клітин кісткового мозку, шлунково-кишкового тракту або інших органів від токсичного впливу хіміотерапії або променевої терапії та/або стимулювання поздоровлення після хіміотерапії або променевої терапії шляхом введення певних кількостей INPROL, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин.

За ще іншим аспектом, цей винахід пропонує спосіб лікування лейкозу (наприклад, хронічного мієлогенного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, хронічного лімфолейкозу, гострого лімфолейкозу, мієломи, лімфогранулематоза), який включає обробку гемопоетичних клітин, до складу яких входять проліферуючі лейкозні клітини, ефективною кількістю INPROL для пригнічення проліферації нормальних стовбурових клітин, та обробку кісткового мозку цитотоксичним засобом для знищення лейкозних клітин. Цей спосіб може бути підсилено подальшою обробкою кісткового мозку іншими засобами, які стимулюють його проліферацію; наприклад, колонієстимулювальними факторами та/або INPROL у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини. За одним із варіантів втілення цього винаходу, цей спосіб здійснюється *in vivo*. У альтернативному варіанті, цей спосіб також є придатним для *ex vivo* десенсибілізування та розмноження гемопоетичних клітин для трансплантування.

Ще за одним додатковим аспектом, згаданий спосіб включає лікування суб'єкта, який має будь-який розлад, спричинений проліферацією стовбурових клітин. Такі розлади, наприклад, псоріаз, мієлодисплазія, деякі автоімунні захворювання, імундепресія при старінні, мієлодиспластичний синдром, апластична анемія або вичерпання стовбурових клітин при СНІДі, лікуються шляхом введення згаданому суб'єктові ефективної кількості INPROL для пригнічення або стимулювання проліферації згаданих стовбурових клітин.

Цей винахід надає спосіб оборотного захисту стовбурових клітин від пошкодження цитотоксичним засобом, здатним убити або пошкодити стовбурові клітини. Згаданий спосіб включає введення суб'єкту, якому призначена обробка таким засобом, ефективної кількості INPROL, яка забезпечує пригнічення стовбурових клітин.

Цей винахід надає також спосіб оборотного стимулювання проліферації стовбурових клітин на етапі відновлення після хіміотерапії або променевої терапії. Згаданий спосіб включає введення суб'єкту, якому призначена обробка таким засо-

бом, ефективної кількості INPROL, яка забезпечує стимулювання стовбурових клітин.

Цей винахід, крім того, надає:

Інгібітор проліферації стовбурових клітин, виділений зі свинячого або іншого кісткового мозку за допомогою наведених далі процедур (див, Приклад 12):

(а) Екстрагування кісткового мозку та видалення подрібненої речовини шляхом фільтрування,

(b) Теплова обробка при 56°C впродовж 40хв. із подальшим охолодженням на льодяній бані,

(c) Видалення осаду шляхом центрифугування при 10000 g впродовж 30хв. при 4°C,

(d) Кислотне осадження шляхом додання супернатанту до 10 об'ємів перемішаного ацетону, який має температуру таїння льоду, до складу якого входить 1% (об'єм.) концентрованої хлористоводневої кислоти, та інкубування при 4°C впродовж 16год,

(e) Виділення осаду шляхом центрифугування при 20000g впродовж 30хв. при 4°C та промиванням холодним ацетоном з подальшим висушуванням,

(f) Виділення хроматографуванням зі зворотною фазою та контролювання активності шляхом пригнічення утворення колоній клітинами кісткового мозку, попередньо обробленими 5-фторурацилом та інкубуванням у присутності мишачого IL (інтерлейкіну)-3, а також абсорбуванням на 280nm та електрофорезом у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

Цей винахід також надає:

Спосіб очищення інгібітора проліферації стовбурових клітин, який по суті є позбавленим інших білкових матеріалів, який включає етапи, наведені перед тим, а також докладно описані далі.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, де інгібітор проліферації стовбурових клітин забезпечує полегшення імуносупресії, спричиненої гіперпроліферацією стовбурових клітин.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, де INPROL у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини, забезпечує полегшення супресії кісткового мозку, спричиненої гіпопроліферацією стовбурових клітин.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, де згаданий інгібітор проліферації стовбурових клітин вводиться після індукування проліферації стовбурових клітин шляхом піддання впливу цитотоксичного лікарського засобу або опромінування. Стовбурові клітини, звичайно, знаходяться у неактивному стані, але стимулюються до вступу до мітотичного циклу після хіміотерапії. Це робить їх більш чутливими до другого введення хіміотерапевтичного засобу; згаданий спосіб захищає їх від цієї обробки.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, де стимулятор проліферації стовбурових клітин (наприклад, INPROL у кількостях, які забезпечують сти-

мулювання стовбурових клітин) вводиться перед або після INPROL у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, для підсилення відновлення кісткового мозку. Кількості INPROL, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, уповільнюють швидкість проходження стовбуровими клітинами мітотичного циклу та захищають їх від хіміотерапевтичних засобів та опромінювання; кількості INPROL, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, реверсують згадане пригнічення та підсилюють відновлення кісткового мозку. У альтернативному варіанті, кількості INPROL, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, можуть застосовуватись для підсилення відновлення функціонування кісткового мозку, у той час як кількості, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, використовуються на наступному етапі для повернення згаданих стовбурових клітин до неактивного стану після досягнення відновлення функціонування кісткового мозку.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, де згаданий інгібітор проліферації стовбурових клітин вводять як ад'ювант перед або під час вакцинації з метою підвищення імунної реакції.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування імунodefіциту у ссавців, який включає введення згаданому ссавцеві імуностимулювальної кількості INPROL.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування болю у ссавця, який включає введення згаданому ссавцеві кількості INPROL, яка індукує аналгезію.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, які одержують цитотоксичні лікарські засоби або піддаються променевої терапії, який включає введення ефективної кількості інгібітора проліферації стовбурових клітин для захисту стовбурових клітин від пошкодження.

Цей винахід також надає:

Спосіб лікування людей або тварин, які одержують цитотоксичні лікарські засоби або піддаються променевої терапії, який включає введення ефективної кількості INPROL, яка забезпечує стимулювання стовбурових клітин, для прискорення виздоровлення після лікування.

Цей винахід включає також фармацевтичну композицію, до складу якої входять гемоглобін та фармацевтично прийнятний носій.

Цей винахід включає також фармацевтичну композицію, до складу якої входять (а) поліпептид, який вибрано з групи, до складу якої входять альфа-ланцюг гемоглобіну, бета-ланцюг гемоглобіну, гамма-ланцюг гемоглобіну, дельта-ланцюг гемоглобіну, епсилон-ланцюг гемоглобіну та дзета-ланцюг гемоглобіну, поліпептид, до складу якого входять амінокислоти 1-97 альфа-ланцюга гемоглобіну людини ("пептид 1-97") та поліпептид, до складу якого входять амінокислоти 1-94 альфа-ланцюга гемоглобіну людини ("пептид 1-94") та (b) фармацевтично прийнятний носій. Такі фармацевтичні композиції можуть складатись з одного поліпептиду, вибраного зі згаданої групи, суміші поліпептидів, вибраних зі згаданої групи, або

поліпептидів зі згаданої групи у формі димерів або полімерів з або без гему.

Цей винахід включає також пептиди, які мають наведені далі послідовності:

Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val ("Пептид 43-55"),

Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys

де два Cys залишки об'єднуються дисульфідним зв'язком ("Циклічний пептид 43-55"),

Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys

де два Cys залишки об'єднуються вуглецевим містком,

Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala ("Пептид 64-82") та

пептид, до складу якого входять перші 97 N-кінцевих амінокислот альфа-гемоглобіну людини, як показано на Фіг.16A.

До цього винаходу включено також білкові та пептидні послідовності, до складу яких входять модифіковані варіанти альфа-ланцюга людини, які зберігають інгібіторні та/або стимуляторні властивості відносно стовбурових клітин. Такі модифікації включають, але не обмежуються, видалення або модифікацію C-кінцевого гідрофобного домену (наслідком чого є поліпшення характеристик розчинності) та/або видалення або модифікацію домену зв'язування гаптоглобіну (наслідком чого є поліпшення фармакокінетичних властивостей). C-кінцевий гідрофобний домен альфа-гемоглобіну людини складається з ділянки від 98 амінокислоти (фенілаланін) до 141 амінокислоти (аргінін) і включає 23 гідрофобні амінокислоти з загальної кількості 44. Весь домен або одна або декілька з цих гідрофобних амінокислот (6 аланінів, 4 валіни, 8 лейцинів, 2 проліни та 3 фенілаланіни) можуть бути видалені делецією ("видалений делецією" C-кінцевий гідрофобний домен). У альтернативному варіанті, одна або декілька з цих амінокислот може бути заміщена неполярною амінокислотою (наприклад, гліцином, серином, треоніном, цистеїном, тирозином, аспарагіном або глутаміном) ("заміщений" C-кінцевий гідрофобний домен).

У іншому варіанті втілення використовують такі хімічні модифікації, наприклад, карбоксиметилювання, які послаблюють гідрофобні властивості цієї ділянки та підсилюють розчинність.

У іншому варіанті втілення, гідрофобні залишки у послідовності бета-гемоглобіну людини заміщаються відповідними гідрофільними ділянками. Наприклад, кожна з ділянок послідовності бета-гемоглобіну людини між амінокислотами 107 (гліцин) та 117 (гістидин) або між амінокислотами 130 (тирозин) та 139 (аспарагін) є відносно гідрофільною і кожна з них або обидві можуть бути заміщені еквівалентними гідрофобними ділянками альфа-гемоглобіну людини.

Домен зв'язування гаптоглобіну знаходиться у межах C-кінцевої гідрофобної ділянки і складається з амінокислот 121-127. Ця ділянка може бути видалена делецією у повному обсязі або на цій ділянці таким самим чином може бути видалена одна або декілька амінокислот ("видалений деле-

цією" С-кінцевий домен зв'язування гаптоглобіну). Ця ділянка або одна, або декілька амінокислот на цій ділянці можуть бути заміщеними іншими амінокислотами, наприклад, поліаланіном або полігліцином, або іншими амінокислотами, наслідком чого є усунення зв'язування поліпептиду з гаптоглобіном, проте підтримка пригнічувальної активності відносно стовбурових клітин ("заміщений" С-кінцевий домен зв'язування гаптоглобіну).

Іншими варіантами втілення цього винаходу передбачаються відповідні модифікації бета-ланцюга гемоглобіну (на С-кінцевій гідрофобній ділянці та/або на одному або обох доменах зв'язування гаптоглобіну (амінокислоти 11-25 та 136-146)) та відповідні модифікації дельта-, гамма-, епсилон- та/або дзета-ланцюгів гемоглобіну.

До цього винаходу включено також послідовності ДНК, які кодують вищезгадані пептиди, вектори, до складу яких входять згадані послідовності ДНК, та клітини-хазяї, до складу яких входять згадані вектори. Ці пептиди можуть бути синтезованими за допомогою стандартних хімічних способів (наприклад, твердофазним синтезом) або за допомогою рекомбінантних способів (з включенням систем злиття, наприклад, таких, у яких застосовується глутатіон-S-трансфераза [Д.Б. Сміт (D.B. Smith) та К.С. Джонсон (K.S. Johnson), *Gene* 67: 31-40, 1988], тіоредоксин [Ла Валлі (La Vallie) та інші, *Biotechnology* 11: 187-193, 1993] або убіквітин [Батт (Butt) та інші, *PNAS* 86: 2540-4, 1989; Черні (Cherney) та інші, *Biochem.* 30: 10420-7, 1991; Бейкер (Baker) та інші, *JBC* 269:25381-6, 1994; патенти США №№5132213; 5196321 та 5391490 та міжнародна заявка WO 91/17245]. Кожну з цих статей, заявок та патентів включено до цього опису як посилання.

Цей винахід додатково включає спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин зі сполукою, здатною до зв'язування опіатних рецепторів, у варіанті, якому віддається перевага, опіатних рецепторів підкласу мю. Цей винахід додатково включає спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин зі сполукою, здатною до зв'язування рецепторів ноціцептину (наприклад, ORL1). Цей винахід додатково включає спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин зі сполукою, здатною до зв'язування "опіатоподібних" рецепторів.

Пептиди (які було названо "геморфінами") було виділено з гемоглобіну, який демонструє опіатну активність [наприклад, Брантл (Brantl) та інші, *Eur. J. Pharm.* 125: 309-10, 1986; Девіс (Davis) та інші, *Peptides* 10: 747-51, 1989; Гофман та інші, *PNAS* 87: 8521-25, 1990; Ернан та інші, *Biochem.* 31: 8619-28, 1992; Карелін та інші, *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 202: 410-5, 1994; Жао (Zhao) та інші, *Ann. N.Y. Acad. Science* 750: 452-8, 1995; Петров та інші, *Bioscience Reports* 15: 1-14, 1995; Карелін та інші, *Peptides* 16: 693-697, 1995]. Кожну з цих статей включено до цього опису посиланням. Існують також інші атипівні опіатні пептиди та не-

лікі молекули [Зудру та інші, *JBC* 254: 2446-9, 1979; Кіріон та Вайсс, *Peptides* 4: 445, 1983; Лукас та інші, *Biochem.* 22: 4567, 1983; Брантл, *Eur. J. Pharm.* 106: 213-14, 1984; Брантл та інші, *Eur. J. Pharm.* 111: 293-4, 1985; Брантл та Нубер, *TIPS* 7: 6-7, 1986; Грабі та Гері, *Med. Res. Rev.* 9: 343-401, 1989; Шілпер, *Prog. Med. Chem.* 28: 301-40, 1991; Гламста та інші, *BBRC* 184: 1060-6, 1992; Тешмахер, *Handbook Exp. Pharm.* 104: 499-28, 1993; *Handbook Of Experimental Pharmacology*, А. Герц (видавець), томи 104/I та 104/II, 1993, видавництво Springer Verlag, Берлін; Рід та інші, *Neurosci. and Biobehav. Rev.* 18: 519-25, 1994; Карелін та інші, *Peptides* 16: 693-7, 1995]. Кожну з цих статей включено до цього опису посиланням. "Опіатоподібні рецептори", як використано у цьому описі, визначаються за їх здатністю до зв'язування опіатів, INPROL, геморфінів, екзорфінів, ноціцептину, членів сімейства Тур-MIF-1, алкалоїдів та/або інших сполук, які пригнічують або стимулюють проліферацію стовбурових клітин способом, який антагонізується включенням відповідної кількості налоксону (див. Приклади 29 та 38).

Цей винахід додатково включає спосіб ідентифікування рецептора(-ів) та лігандів, який включає застосування INPROL (у варіанті, якому віддається перевага, у пептидних формах, наприклад, Пептид 1-94, 1-97, 43-55 або 64-82) у пробі на зв'язування рецепторів. Цей винахід додатково включає спосіб ідентифікування рецептора(-ів) та лігандів, який включає застосування INPROL у пробі на аденілатциклазу.

Цей винахід додатково включає спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин зі сполукою (наприклад, мастопараном), здатною до активзації GTP-зв'язувальних білків, у варіанті, якому віддається перевага, білків $G_{\text{пригнічувального}}$ підтипу.

Цей винахід додатково включає спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин з пептидом, вибраним з групи пептидів-геморфінів, які мають наведену далі подібність:

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro~Tip-Thr-Gln-Arg,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro,
Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln,
Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe,
Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg,
Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln, та
Tyr-Pro-Trp-Thr,

Вищенаведені пептиди мають подібність послідовності та/або біологічну активність, подібну до інших атипівних опіатних пептидів, наприклад, опіатних пептидів сімейства Тур-MIF-1 [огляд див. Рід та інші, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 519-25, 1994], казеїнопохідних казоморфінів [Брантл та інші, *Physiol. Chem. Хоппе-Сейлера (Hoppe-Seyler)* 360: 1211-16, 1979; Лукас та інші, *Biochem.* 22: 4567-4573, 1983; Фіат (Fiat) та Джолз (Jolles), *Mol.*

Cell. Biochem. 87: 5-30, 1989], пептидів, одержаних з цитохрому b, які називають цитохрофінами [Брантл та інші, Eur. J. Pharm. 111: 293-4, 1985], різних екзорфінів та опіатних пептидів людини та інших видів, за виключенням людини [Зудру та інші, JBC 254: 2446-9, 1979; Брантл, Eur. J. Pharm. 106: 213-14, 1984; Брантл та інші, Eur. J. Pharm. 125: 309-10, 1986; Брантл та Нубер, TIPS 7: 6-7, 1986; Гламста та інші, BBRC 184: 1060-6, 1992; Тешмахер, Handbook Exp. Pharm. 104: 499-28, 1993; Карелін та інші, Peptides 16: 693-7, 1995], а також до пептидів, одержаних з комбінаторних бібліотек, відібраних за здатністю до зв'язування з опіатними рецепторами [огляд див. Дулі (Dooley) та інші, Peptide Research 8: 124-137, 1995]. Кожну з цих статей включено до цього опису посиланням.

Цей винахід включає також спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин з пептидом, вибраним із групи, до складу якої входять пептиди, пов'язані з Tyr-MIF-1, казоморфіни, цитохрофіни та екзорфіни. Зокрема, включено пептиди Tyr-MIF-1, які мають послідовності, наведені далі: Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂,

Tyr-Pro-Lys-Gly-NH₂,

Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂, та

Pro-Leu-Gly-NH₂.

Цей винахід включає також спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин з опіатним пептидом, вибраним із групи, до складу якої входять:

(D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Cl-yl⁵)-Енкефалін (DAMGO),

(D-Arg²,Leu⁴)-Дерморфін-(1-4)-амід (DALDA),

(Phe⁴)-Дерморфін-(1-4)-амід

Ac-Arg-Phe-Met-Trp-Met-Arg-NH₂,

Ac-Arg-Phe-Met-Trp-Met-Lys-NH₂, та

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-NH₂.

Цей винахід включає також спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин зі сполукою опіатного антагоніста, який обирають з групи, до складу якої входять морфін, кодеїн, метадон, героїн, меперидин, альфапродин, дифенноксилат, фентаніл, суфентаніл, альфентаніл, леворфанол, гідроксон, дигідроксон, оксикодон, гідроморфон, пропоксифен, бупренорфін, еторфін, оксиморфону декстпропоксифен та мептазинол. Зокрема, включено морфін у пригнічувальних кількостях, які становлять менше ніж 10⁻⁷ моль.

Цей винахід включає також спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин з опіатним антагоністом або змішаним агоністом/антагоністом, вибраним із групи, до складу якої входять налоксон, налтрексон, налорфін, пентазоцин, налбуфін та буторфанол. Зокрема, включено налоксон у пригнічувальних кількостях, які складають менше 10⁻⁸ моль.

Цей винахід включає також спосіб стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин з кількістю білка або пептиду, яка стимулює стовбу-

рові клітини, який обирають з групи, до складу якої входять INPROL, міоглобін, DAMGO та DALDA.

Цей винахід включає також спосіб проведення генної терапії ссавця, який включає:

а) видалення гемопоетичних клітин зі згаданого ссавця,

б) обробку згаданих гемопоетичних клітин *ex vivo* кількістю INPROL, яка стимулює стовбурові клітини, та/або опіатною сполукою,

с) трансфікування або інфікування згаданих гемопоетичних клітин попередньо визначеним геном,

д) контактування згаданих трансфікованих гемопоетичних клітин *ex vivo* з кількістю INPROL, яка пригнічує стовбурові клітини, та/або опіатною сполукою,

е) трансплантування згаданому ссавцеві гемопоетичних клітин етапу d,

ф) факультативну обробку згаданого ссавця *in vivo* кількістю INPROL, яка пригнічує або стимулює стовбурові клітини, та/або опіатною сполукою.

Цей винахід включає також спосіб проведення розмноження стовбурових клітин *ex vivo*, який включає обробку згаданих гемопоетичних клітин кількістю INPROL, яка пригнічує стовбурові клітини, та, щонайменше, одним стимулювальним цитокіном. INPROL контактує зі згаданими гемопоетичними клітинами перед, під час та/або після контактування з стимулювальним цитокіном. Розмноження стовбурових клітин *ex vivo* надає змогу одержання достатніх кількостей стовбурових клітин з обмежених джерел, наприклад, крові пупкового канатика, печінки зародка, аутологічного кісткового мозку після хіміотерапії і. т.п. або після очищення (наприклад, за допомогою клітинного сортера зі збудженням флуоресценції з застосуванням таких маркерів, як CD34, CD38 або родамін). Спроможність вибіркового вирощування певних гемопоетичних ліній, крім того, дає змогу клініцистам безпосередньо конструювати трансплантати стовбурових клітин відповідно до потреб конкретного пацієнта.

Цей винахід включає також спосіб проведення розмноження стовбурових клітин *ex vivo*, який включає обробку згаданих гемопоетичних клітин кількістю INPROL, яка стимулює стовбурові клітини, з або без щонайменше одного додаткового стимулювального цитокіну. INPROL контактує зі згаданими гемопоетичними клітинами перед, під час та/або після контактування з стимулювальним цитокіном(-ами). Застосування стимулятора стовбурових клітин дозволить розмножити стовбурові клітини та/або клітини-попередники, у той час як інгібітор стовбурових клітин буде підтримувати стовбурові клітини у недиференційованому стані. Згадана процедура може також бути оптимізована шляхом застосування INPROL *in vivo* у кількостях, які пригнічують стовбурові клітини, для підтримки згаданих стовбурових клітин у неактивному стані до їх приживлення, після чого INPROL у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини, може бути застосованим для стимулювання регенерації кісткового мозку. Факультативно, гемопоетичні клітини можуть бути розділені на два препарати; один з них обробляють кількостями INPROL, які стиму-

люють стовбурові клітини, для підсилення розмноження згаданих стовбурових клітин та/або клітин-попередників, у той час як другий обробляють кількостями INPROL, які пригнічують стовбурові клітини, для підтримки згаданих стовбурових клітин у недиференційованому стані. Після цього два згадані препарати можуть об'єднуватись і вводиться пацієнту.

Цей винахід включає також фармацевтичну композицію, до складу якої входять (а) INPROL та (b) щонайменше одна пригнічувальна сполука, яку обирають з групи, до складу якої входять MIP-1 α , TGF β , TNF α (фактор некротизації пухлин), INF α (інтерферон), INF β , INF γ , пентапептид піроGlu-Glu-Asp-Cys-Lys, тетрапептид N-ацетил-Ser-Asp-Lys-Pro та трипептид глутатіон (Gly-Cys-yGlu).

Цей винахід включає також фармацевтичну композицію, до складу якої входять (а) INPROL та (b) щонайменше один стимулювальний цитокін, який обирають з групи, до складу якої входять ЩІ-інтерлейкін)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-14, IL-15, G-CSF, GM-CSF, M-CSF (макрофагальний колонієстимулювальний фактор), еритропоетин, тромбopoетин, фактор стовбурових клітин, дельтаподібний білок та ліганд flk2/flt3.

Цей винахід описує інгібітор стовбурових клітин (INPROL), який відрізняється від відомих у цій галузі, наприклад, MIP-1 α , TGF β , тетрапептиду Фріндела (Frindel) та співробітників або пентапептиду Пауковіца (Paukovits) та співробітників (порівняй, Райт (Wright) & Прагнелл (Pragnell), 1992 (цитовано перед тим)). Природний нативний INPROL має молекулярну масу, яка перевищує 10000 Да-льтон (визначено ультрафільтрацією), що відрізняє його від тетрапептиду, а також від пентапептиду. Він є більш гідрофобним, ніж MIP-1 α або TGF β (хроматографічні системи зі зворотною фазою), що відрізняє його від згаданих цитокінів. Додатково, його спосіб дії відрізняється від способу дії будь-якого попередньо описаного інгібітора тим, що він є активним у пробі in vitro тільки у разі використання впродовж передінкубаційного періоду. MIP-1 α , наприклад, втрачає ефективність у разі його використання тільки впродовж передінкубаційного періоду (Приклад 5). Додатково, природний INPROL є активним у пробі на визначення "колонієтвірних клітин з високим проліферативним потенціалом" (HPP-PFC), у той час як MIP-1 α подібної активності не має (Приклад 6). INPROL відрізняється від стимуляторів, відомих у цій галузі, наприклад, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, еритропоетину, тромбopoетину, фактора стовбурових клітин та ліганду flk2/flt3. Природний INPROL не має або має незначну схожість послідовності зі згаданими цитокінами.

На Фіг.1-4 наведено результати електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію, якому піддається продукт після кожного етапу очищення.

Фіг.1 - Смуга 1 - хімотрипсिनоген, Смуга 2 - овальбумін, Смуга 3 - BSA (сироватковий альбумін великої рогатої худоби), Смуга 4 - фракція <30кД, Смуга 5 - фракції 30-50кД та Смуга 6 - фракції 50-100кД.

Фіг.2 - Смуга 1 - після осадження сульфатом амонію (40-80%) та смуги 2-5 - фракції DEAE (діетиламіноетилцелюлоза) (Смуга №2 представляє активну фракцію).

Фіг.3 - Смуга 1 - супернатант після осадження сульфатом амонію, Смуга 2 - активна фракція DEAE, Смуги 3-5 представляють фракції гель-фільтрації (смуга №5 представляє активну фракцію).

Фіг.4 - Смуга 2 представляє кінцевий продукт.

На Фіг.5 подано хроматограму кінцевого очищення (високоєфективна рідинна хроматографія (HPLC) зі зворотною фазою).

На Фіг.6 зображено включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм (срм=кількість імпульсів за хвилину) до клітин лінії FDCP-mix без (Контроль=0% пригнічення) та з різними кількостями INPROL, очищеного зі свинячого кісткового мозку (pINPROL). Дані нормалізовано проти контрольного значення.

На Фіг.7 подано відсоток клітин у S-фазі мітичного циклу після обробки мишей пропіонатом тестостерону (TSP), TSP плюс pINPROL або носієм (Контроль). До складу кожної групи входить 25 тварин (3-4 на часову точку).

На Фіг.8 зображено виживаність мишей, оброблених двома дозами 5-FU (фторурацил) з або без обробки pINPROL. Кожна група складається з 30 тварин.

На Фіг.9 зображено виживаність опромінених мишей з або без обробки pINPROL. Кожна група складається з 50 тварин.

На Фіг.10A та Фіг.10B зображено відновлення нормальних культур декстерівського типу через 1 тиждень (10A) та 3 тижні (10B) після обробки Ara-C або Ara-C плюс pINPROL.

На Фіг.11 зображено виживаність мишей (75 на групу) після летального опромінення та трансплантації 3×10^4 клітин кісткового мозку після попереднього інкубування з живильним середовищем (Контроль) або pINPROL (25нг/мл) впродовж 4 год. Виживаність контролювали впродовж 30 днів.

На Фіг.12 зображено кількість CFU-GM, утворених через 14 днів у культурі клітинами кісткового мозку мишей після летального опромінення та відновлення донорськими клітинами кісткового мозку, попередньо проінкубованих з pINPROL або живильним середовищем впродовж 4 год.

На Фіг.13 зображено суспендовані клітини з довгоіснуючої культури лімфоцитів, які відбирались кожного тижня, промивались та висівались з IL-7 (10нг/мл) після попереднього інкубування з живильним середовищем або pINPROL впродовж 4 год.

На Фіг.14 зображено репопуляційну здатність лейкозних клітин периферичної крові, оброблених pINPROL. Клітини, які започатковують довгоіснуючі культури клітин (LTC-IC), визначались шляхом посіву адгезивних та неадгезивних клітин довгоіснуючих культур з та без pINPROL та підрахунку CFU-GM на 7 день. Дані нормалізовано проти контрольних значень.

На Фіг.15A зображено хроматограму зі зворотною фазою C4 очищеного pINPROL, елюйованого 53% ацетонітрилу. Смуга 1 - неочищений матері-

ал, Смуга 2 - маркери молекулярної маси та Смуга 3 - очищений матеріал. На Фігурі 15B зображено хроматограму зі зворотною фазою C4 MIP-1α, елююваного 43,9% ацетонітрилу. На Фіг.15C зображено хроматограму SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) неочищеного препарату rINPROL та очищеного препарату після оберненої фази.

На Фіг.16 зображено послідовності гемоглобіну: На Фіг.16A зображено послідовності кДНК та амінокислот альфа-гемоглобіну людини; на Фіг.16B зображено послідовності кДНК та амінокислот бета-гемоглобіну людини. Числова індексація відповідно до амінокислоти. На Фіг.16C зображено порівняння амінокислотних послідовностей альфа- та бета-ланцюгів людського, мишачого та свинячого гемоглобінів.

На Фіг.17 зображено порівняння слідових кількостей (визначених за допомогою HPLC зі зворотною фазою C4) rINPROL (Фіг.17A) та кристалізованого свинячого гемоглобіну (Фіг.17B).

На Фіг.18 подано результати SDS-PAGE фракцій, одержаних шляхом відокремлення кристалізованого свинячого гемоглобіну засобами HPLC зі зворотною фазою C4. Смуга 1 - маркери молекулярної маси, Смуга 2 - фракції 48-49, одержані з першого піка (на 47,11хв.), Смуга 3 - фракції 50-51, одержані з другого піка (на 49,153хв.), Смуга 4 - фракції 54-55, одержані з третього піка (на 52,25хв.) та Смуга 5 - фракції 56-57, одержані з четвертого піка (на 53,613хв.).

На Фіг.19 подано порівняння результатів двовимірного високовольтного електрофорезу rINPROL (Фіг.19A) та очищеного свинячого бета-гемоглобіну (Фіг.19B).

На Фіг.20 подано порівняння впливу очищеного свинячого альфа-гемоглобіну, бета-гемоглобіну або rINPROL на результати аналізу FDCP-MIX.

На Фіг.21 подано результати відокремлення свинячого гемоглобіну засобами HPLC зі зворотною фазою за допомогою градієнта елювання широкого діапазону.

На Фіг.22A зображено плазмиду Гочалі (Hochuli) та інших (1988); на Фіг.22B зображено плазмиду Летшера (Loetscher) та інших (1991); на Фіг.22C зображено плазмиду pDSUb.

На Фіг.23 зображено вплив обробки INPROL'ом на дані проби на утворення груп клітин.

Для повнішого розуміння винаходу нижче наводиться докладний опис. Цей опис є суто ілюстративним і не повинен розглядатись як такий, що обмежує цей винахід; варіанти, які стануть зрозумілими фахівцю у цій галузі, повинні розглядатись як такі, що входять до обсягу цього винаходу.

Докладний опис варіантів втілення, яким віддається перевага

INPROL оборотно пригнічує або стимулює поділ стовбурових клітин. Не маючи бажання бути зв'язаним конкретною теорією, гадають, що інгібітори та стимулятори стовбурових клітин впливають на швидкість, з якою стовбурові клітини проходять через мітотичний цикл. Зокрема, INPROL є ефективним для тимчасового пригнічення або стимулювання поділу гемопоетичних стовбурових

клітин у залежності від використаної кількості. Спроможність клінічного застосування сполуки, яка може пригнічувати або стимулювати проліферацію стовбурових клітин, надає можливість точного контролювання мітотичної активності гемопоетичних стовбурових клітин, наприклад, під час проведення хіміотерапевтичних заходів, трансплантування стовбурових клітин або здійснення протоколів генної терапії. Таким чином, спосіб за цим винаходом може бути застосовано для поліпшення небажаних побічних ефектів хіміотерапевтичних заходів на гемопоетичну, мієлоїдну та імунну системи шляхом захисту стовбурових клітин від пошкодження, спричиненого хіміотерапевтичними засобами або опроміненням, які застосовуються для знищення ракових або вірусифікованих клітин або шляхом стимулювання відновлення після такого пошкодження. За одним з варіантів втілення цього винаходу, INPROL вводять пацієнту у дозі, достатній для пригнічення поділу стовбурових клітин, у той час як хіміотерапевтичний засіб діє на хвору клітину. Після завершення функції хіміотерапевтичного засобу, стовбурова клітина, пригнічена INPROL, відновить поділ без подальшої додаткової обробки. У разі необхідності підсилити відновлення гемопоєзу, додатково можуть бути застосовані фактори стимулювання росту, цитокіни або INPROL у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини.

Термін "INPROL", який використано у цьому описі, означає білки ссавців та нессавців, очищені, як наведено у Прикладах, гемоглобін, альфа-ланцюг гемоглобіну (з або без групи гему), бета-ланцюг гемоглобіну (з або без групи гему), суміші альфа- та бета-ланцюгів (з або без групи гему) та фрагменти або аналоги згаданих білків, у тому числі ембріональні, зародкові або дорослі форми (наприклад, альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- або дзета-ланцюги, подинці або у сумішах, димери або полімери, з або без групи гему), які мають здатність пригнічувати та/або стимулювати проліферацію стовбурових клітин. Термін "INPROL" означає природні, а також неприродні (наприклад, рекомбінантні та/або синтетично продуковані) форми цих білків. Термін "INPROL поліпептид" означає INPROL, який складається з 40 або більше амінокислот.

Термін "опіатні сполуки", який використано у цьому описі, означає сполуки, у тому числі опіати, але не INPROL, які зв'язуються з опіатними рецепторами (або з рецепторами, які мають послідовну спорідненість з опіатними рецепторами, наприклад, ORL1) та здійснюють свою агоністичну, антагоністичну або змішану агоністично/антагоністичну активність. Наприклад, специфічні агоністи та антагоністи існують для мю рецепторів (які вибірково активізуються DAMGO та DALDA і вибірково ант агонізуються STOP та налоксоназіном), для каппа рецепторів (які вибірково активізуються фумаратом GR 89696 та U-69593 і вибірково антагонізуються пог-біналторфіміну гідрохлоридом) та для дельта рецепторів (які вибірково активізуються DADLE та DPDPE і вибірково антагонізуються натріндолом). На додаток до цього, існують антагоністи широкого спектру дії (наприклад, налоксон) та

агоністи (наприклад, еторфін), які діють на рецептори усіх трьох підтипів. Ноціцептин, зокрема, агонізує рецептор ORL1. Опіатні сполуки, які мають стимулювальну та/або пригнічувальну активність відносно стовбурових клітин, можуть використовуватись для кожного з застосувань, які згадано у цьому описі для INPROL.

Вираз "кількість, яка стимулює стовбурові клітини", який використано у цьому описі, означає таку кількість, яка індукує проліферацію стовбурових клітин. Вираз "кількість, яка пригнічує стовбурові клітини", який використано у цьому описі, означає таку кількість, яка пригнічує проліферацію стовбурових клітин. В усіх випадках, як *in vivo*, так і *ex vivo*, обрана кількість буде залежати від специфічного INPROL або обраної опіатної сполуки та специфічних умов або застосування; зокрема, активними є як еквімолярні дози поліпептидів або фрагментів INPROL, так і еквімолярні дози опіатних пептидів або невеликих молекул.

У типовій клінічній ситуації, коли виникає необхідність у пригніченні стовбурових клітин, INPROL вводять пацієнту щоденно шляхом внутрішньовенного впорскування або впливання у стандартній дозованій формі, наприклад, від 0,01мг/кг до 100мг/кг, у варіанті, якому віддається перевага, від 0,1мг/кг до 1,0мг/кг, наприклад, за 4-60 год. до стандартної хіміотерапевтичної або променевої терапії у разі, коли виникає необхідність у пригніченні мітотичного циклу клітини.

У ситуація, коли необхідним є стимулювання мітотичного циклу клітини, наприклад, для прискорення виздоровлення після хіміотерапії або опромінення, INPROL застосовують у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини. Такі дози, звичайно, дорівнюють 1-500мг/кг, у варіанті, якому віддається перевага, вони складають від 10мг до 100мг/кг.

У тих випадках, коли виникає необхідність застосування опіатної сполуки (сполук) для пригнічення або стимулювання мітотичного циклу клітини, згадану опіатну сполуку (сполуки) застосовують у еквімолярних концентраціях відносно концентрацій, вказаних для INPROL.

За іншим варіантом втілення цього винаходу, попередня обробка INPROL у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, надає можливість застосування підвищених доз хіміотерапевтичних засобів або доз опромінення, які перевищують ті дози, які, за нормальних умов, є стерпними для пацієнтів. Подібним чином, постхіміотерапевтична або постопромінювальна обробка INPROL у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, також надає можливість підвищення звичайних стерпних доз хіміотерапевтичного засобу або опромінення.

Значна частина гемопоетичних стовбурових клітин, за нормальних умов, знаходиться у неактивному стані (мітотичний цикл не відбувається або відбувається повільно). Однак, як компенсаторна реакція на гемопоетичне пошкодження, індуковане застосуванням хіміотерапевтичних засобів, більша частина стовбурових клітин розпочинає мітотичний цикл після хіміотерапії, що робить їх особливо вразливими для наступних доз цитотоксичних хі-

міотерапевтичних засобів або терапевтичного опромінення. Завдяки пригніченню мітотичного циклу стовбурових клітин, обробка INPROL дозволяє більш раннє або більш часте введення наступних доз цитотоксичних хіміотерапевтичних засобів як у традиційних, так і у підвищених дозах.

Стовбурові клітини деяких нормальних індивідів мають спонтанно прискорену мітотичну активність; INPROL у кількостях, які пригнічують стовбурові клітини, є корисним для таких індивідів, навіть якщо він вводиться перед першою дозою опромінення або хіміотерапевтичного засобу.

За одним із варіантів втілення цього винаходу, INPROL (від 0,1мг до 6г/кг маси тіла, у варіанті, якому віддається перевага, від 1,0мг/кг до 60мг/кг) вводиться приблизно через 24 год.-10 днів після введення початкової дози хіміотерапевтичного засобу. Ще через 4-60 год., у варіанті, якому віддається перевага, через 24-48 год., вводиться наступна доза хіміотерапевтичного засобу. Цей цикл чергування введення хіміотерапевтичного засобу та INPROL продовжують відповідно до терапевтичних показань. У стандартній клінічній практиці, хіміотерапевтичні засоби та протоколи введення обирають відповідно до їх придатності для пухлин конкретних типів. Факультативно, фактори стимулювання росту, наприклад, G-CSF, фактор стовбурових клітин або INPROL у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, застосовують після хіміотерапії або променевої терапії для додаткового поліпшення відновлення гемопоетичної функції.

Для застосування *ex vivo*, у випадках, коли виникає необхідність у пригніченні проліферації стовбурових клітин, INPROL застосовують у дозі від 0,1нг до 100нг/10⁶клітин/мл, у варіанті, якому віддається перевага, 2-50нг/10⁶клітин/мл. У разі, коли виникає необхідність у стимулюванні стовбурових клітин, INPROL застосовують у дозі від 10нг до 100мг/10⁶клітин/мл, у варіанті, якому віддається перевага, 1-100мг/10⁶клітин/мл.

У тих випадках, коли виникає необхідність застосування опіатної сполуки (сполук) для пригнічення або стимулювання мітотичного циклу клітини, згадану опіатну сполуку (сполуки) застосовують у еквімолярних концентраціях відносно концентрацій, вказаних для INPROL.

За іншим варіантом втілення цього винаходу, INPROL використовують у способі приготування автологічних гемопоетичних клітин для трансплантування. Гемопоетичні клітини обробляють *ex vivo* ефективною кількістю INPROL для пригнічення поділу стовбурових клітин, після чого ракові клітини видалюють шляхом введення до культур кісткового мозку ефективною кількістю хіміотерапевтичного засобу або ефективною дозою опромінення. Перевага віддається хіміотерапевтичним засобам, специфічним для клітин у стані мітотичної активності. Оброблений подібним чином кістковий мозок повторно впорскують автологічному донору. Факультативно, згаданий пацієнт піддається обробці кількостями INPROL, які стимулюють стовбурові клітини, та/або іншим відомим засобом стимулювання гемопоєзу для поліпшення гемопоетичних функцій згаданого пацієнта. Така методика забез-

печує ефективне видалення пухлинних клітин під час трансплантування автологічного кісткового мозку, з одночасним забезпеченням захисту гемопоетичних стовбурових клітин. Такий захист може забезпечуватись протоколами очищення як *ex vivo*, так і *in vivo*. Після успішного трансплантування виникає необхідність у швидкій проліферації стовбурових клітин для відновлення нормальних функцій кісткового мозку. Це може забезпечуватись застосуванням INPROL у стимулювальних кількостях, які забезпечують стимулювання мітотичного циклу стовбурових клітин та прискорюють відновлення функцій кісткового мозку.

За іншим варіантом втілення цього винаходу, INPROL використовують у способі приготування гемопоетичних клітин для генної терапії. Гемопоетичні клітини обробляють *ex vivo* INPROL'ом у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, та/або іншим стимулювальним цитокіном(-ами) для стимулювання поділу стовбурових клітин, після чого трансфектують (у варіанті, якому віддається перевага, інфікують за допомогою, наприклад, вектору на основі ретровірусів) необхідним геном (генами). Після завершення трансфікування, клітини промивають і обробляють INPROL у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, для повернення згаданих стовбурових клітин до неактивного стану. Оброблений таким чином кістковий мозок повторно впорскують донорові. Факультативно згаданий пацієнт піддається обробці INPROL *in vivo* у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, для підтримки згаданих стовбурових клітин у неактивній формі та підсилення їх здатності до повторного заселення кісткового мозку.

За іншим варіантом втілення цього винаходу, INPROL застосовують як додатковий терапевтичний засіб при лікуванні лейкозу. Наприклад, при хворобливих станах, коли лейкозні клітини не реагують на INPROL, гемопоетичні клітини обробляють *ex vivo* INPROL'ом у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин. Введення INPROL запобігає проліферації нормальних стовбурових клітин. Таким чином, впродовж того періоду часу, коли лейкозні клітини, які проліферують, обробляються цитотоксичним засобом, специфічним для клітин у стані мітотичної активності, популяція нормальних стовбурових клітин є захищеною від пошкодження. Додатково, стимулювальний цитокін, наприклад, IL-3, GM-CSF, факультативно вводять для індукування мітотичної активності лейкозних клітин під час обробки хіміотерапевтичним засобом або опромінення, у той час як нормальні стовбурові клітини є захищеними за допомогою INPROL. Згаданого пацієнта лікують хіміотерапевтичними засобами або піддають променевої терапії для знищення лейкозних клітин і кістковий мозок з десенсибілізованими пухлинними клітинами після цього знову трансплантують згаданому пацієнту для відновлення гемопоетичних функцій.

Подібним чином, у іншому варіанті втілення цього винаходу, для лікування пацієнтів із серйозними вірусними інфекціями, які залучають клітини крові або лімфоцити, наприклад, у разі ВІЛ-

інфекції, гемопоетичні клітини обробляють *ex vivo* або *in vivo* INPROL'ом, потім противірусними засобами, лікарськими засобами, які знищують інфіковані клітини, або системами на основі антитіл, для видалення інфікованих клітин. Після мієлоаблативної противірусної або мієлоаблативної хіміотерапії для видалення з пацієнта вірусінфікованих клітин, клітини кісткового мозку, оброблені INPROL, знову повертаються згаданому пацієнту.

У іншому варіанті втілення цього винаходу, INPROL застосовують для лікування розладів, пов'язаних із гіперпроліферативними стовбуровими клітинами. Наприклад, псоріаз є хворобою, яка викликається гіперпроліферацією епітеліальних клітин шкіри і яку, подеколи, лікують цитотоксичними лікарськими засобами. Для лікування інших пошкоджень, які передують виникненню новоутворень, до яких залучена проліферація стовбурових клітин, також використовують ефективні кількості INPROL, які застосовують для пригнічення проліферації стовбурових клітин. У пацієнтів із синдромом набутого імунodefіциту спостерігається аномально висока швидкість мітотичної активності, наслідком чого є вичерпання стовбурових клітин; для цих пацієнтів також є корисним лікування ефективними кількостями INPROL для пригнічення мітотичного циклу клітин. З цією метою, у можливих випадках, застосовують композиції для локальної або черезшкірної доставки (наприклад, мазі, лосьйони, гелі або пластирі), до складу яких входить INPROL, як альтернативу парентеральному введенню.

У більшості випадків лейкозу клітинами-попередниками лейкозних клітин є популяції диференційованих клітин, які не піддаються впливу INPROL і які, таким чином, необхідно обробляти за способами використання INPROL, подібними тим, які було описано перед тим. У тих випадках, коли клітини-попередники лейкозних клітин є дуже примітивними і безпосередньо чутливими до пригнічення їх INPROL, проліферація лейкозних клітин послаблюється введенням ефективної кількості INPROL.

У іншому варіанті втілення цього винаходу, INPROL застосовують для лікування розладів, пов'язаних із гіпопроліферативними стовбуровими клітинами. Наприклад, мієлодиспластичні синдроми та апластична анемія є розладами, які спричинюються гіпопроліферацією стовбурових клітин кісткового мозку. Інші синдроми, до яких залучено гіпопроліферацію стовбурових клітин, лікуються введенням INPROL у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин.

Антитіла, моноклональні або поліклональні, до INPROL пептидів або поліпептидів, одержують за допомогою стандартних способів. Згадані антитіла або INPROL пептиди або поліпептиди мітять мітками, які піддаються виявленню, багато типів яких відомо у цій галузі. Мічені INPROL або анти-INPROL антитіла після цього використовують як маркери стовбурових клітин для ідентифікування та виділення стовбурових клітин шляхом їх введення пацієнту безпосередньо з діагностичною метою. У альтернативному варіанті ці мічені пептиди, поліпептиди або антитіла застосовують *ex*

віво для ідентифікування стовбурових клітин у гемопоетичних клітинних препаратах для забезпечення їх видалення перед десенсибілізуванням неопластичних клітин у кістковому мозку. Подібним чином, такі мічені пептиди, поліпептиди або антитіла використовують для виділення або ідентифікування епітеліальних або інших стовбурових клітин. На додаток, такі антитіла, мічені або немічені, використовують терапевтично шляхом нейтралізування активності INPROL або діагностично шляхом виявлення рівнів циркулюючого INPROL.

INPROL може бути клонованим з генних або кДНК бібліотек людини для експресування рекомбінантного INPROL людини за допомогою стандартних способів. Наприклад, у разі використання інформації відносно послідовності, одержаної з очищеного білка, конструюються олігонуклеотидні зонди, які можуть помічатись, наприклад, фосфором 32, та використовуватись для добору відповідної бібліотеки кДНК (наприклад, з кісткового мозку). У альтернативному варіанті, бібліотека послідовностей, які експресуються, з відповідного джерела (наприклад, кісткового мозку), перевіряється на кодування INPROL кДНК за допомогою антитіл або відповідної функціональної проби (наприклад, такої, опис якої наведено у Прикладі 2). Сам по собі гемоглобін, а також окремі альфа- та бета-ланцюги, було клоновано та експресовано за допомогою способів, відомих у цій галузі [див. П'анье (Pagnier) та інші, Rev. Fr. Transfus. Hemobiol. 35: 407-15, 1992; Лукер (Looker) та інші, Nature 356: 258-60, 1992; Methods in Enzymology, том 231, 1994].

Цей винахід включає послідовності ДНК, до яких належать: включення кодонів, "яким віддається перевага", для експресування окремими хазяями-не ссавцями; забезпечення сайтів розщеплення рестриктазами; та забезпечення додаткових початкових, кінцевих або проміжних послідовностей ДНК, які полегшують конструювання векторів, які легко експресуються, або продукування, або очищення альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- та/або дзета-ланцюга гемоглобіну.

Цей винахід також надає послідовності ДНК, які кодують поліпептидні аналоги або похідні альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- та/або дзета-ланцюгів гемоглобіну, які відрізняються від природних форм ідентичністю або місцезнаходженням одного або декількох амінокислотних залишків (наприклад, делеційні аналоги, до складу яких входять менше, ніж усі вказані залишки; субституційні аналоги, у яких один або декілька вказаних залишків заміщено іншими залишками; та додаткові аналоги, у яких один або декілька амінокислотних залишків додаються до кінцевої або середньої ділянки поліпептиду) та які поділяють деякі або усі властивості природних форм.

У варіанті втілення, якому віддається перевага, INPROL є продуктом експресії хазяїном-прокаріотом або еукаріотом (наприклад, клітинами бактерій, дріжджів, вищих рослин, комах або ссавців у культурі) послідовності екзогенної ДНК, одержаної клонуванням геному або кДНК, або синтезом генів. Тобто у варіанті втілення, якому віддається перевага, INPROL є "рекомбінантним

INPROL'ом". Продукт експресування типових дріжджів (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*) або прокаріотичних клітин-хазяїв (наприклад, *E. coli*) не має зв'язку з будь-якими білками ссавців. Продукти експресування клітин хребетних (наприклад, ссавців, за виключенням людини (наприклад, СОS (клітини яєчника мавп) або СНО (клітини яєчника китайських хом'ячків))) не мають зв'язку з будь-якими білками людини. У залежності від використання хазяїна, поліпептиди за цим винаходом можуть бути глікозильованими або можуть не бути глікозильованими. До складу поліпептидів за цим винаходом, факультативно, може входити також початковий метіоніновий амінокислотний залишок (у позиції -1).

Цей винахід охоплює також інші продукти, наприклад, поліпептидні аналоги альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- та/або дзета-ланцюга гемоглобіну. До складу таких аналогів входять фрагменти альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- та/або дзета-ланцюга гемоглобіну. У разі використання добре відомих способів, можна легко сконструювати та одержати гени, які кодують мікробну експресію поліпептидів, які мають первинні послідовності, які відрізняють їх від згаданих у цьому описі ідентичністю або місцезнаходженням одного або декількох залишків (наприклад, субституцій, кінцевих та проміжних додатків та делецій). У альтернативному варіанті, модифікація генів кДНК та геному може бути легко здійснена за допомогою добре відомих способів сайтспрямованого мутагенезу та застосована для одержання аналогів та похідних альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- або дзета-ланцюгів гемоглобіну. Такі продукти поділяють, щонайменше, одну з біологічних властивостей INPROL, але можуть відрізнятися за іншими. Як приклад, до продуктів за цим винаходом належать альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- або дзета-ланцюги, які піддаються попередньому скороченню, наприклад, делеціями; або більш стійкі до гідролізу (і які, як наслідок, можуть мати більш виявлений або більш тривалий ефект, аніж природні); або такі, які було піддано змінненню шляхом видалення або додання однієї або декількох потенційних ділянок для О-глікозилювання та/або N-глікозилювання, або які мають один або декілька цистеїнових залишків, які було видалено або заміщено, наприклад, аланіновими або сериновими залишками, і які легше виділяються у активній формі з мікробних систем; або які мають один або декілька тирозинових залишків, заміщених фенілаланіном, та зв'язуються з більшою або меншою легкістю з білками-мішенями або рецепторами на клітинах-мішенях. До цього винаходу входять також фрагменти пептидів або поліпептидів, які дублюють тільки частину безперервної амінокислотної послідовності або вторинні конформації з альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- або дзета-ланцюгами, причому згадані фрагменти можуть мати одну властивість INPROL (наприклад, зв'язування рецептора), і не мати іншої (наприклад, активності пригнічення стовбурових клітин). Слід занотувати, що активність будь-якого одного або декількох продуктів за цим винаходом не обов'язково повинна мати терапевтичну

придатність [див., Вейланд (Weiland) та інші, Blut 44: 173-5, 1982] або придатність у інших контекстах, наприклад, у пробах на антагонізм фактора пригнічення. Конкурентні антагоністи є придатними у випадках перепродукування інгібіторів стовбурових клітин або їх рецептора.

На додаток до цього, пептиди, які є похідними білкової послідовності, які зберігають біологічну активність, можуть бути хімічно синтезованими за допомогою стандартних способів. Цей винахід забезпечує також кодування послідовностей для пептидних аналогів або похідних альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- або дзета-ланцюгів гемоглобіну, які відрізняються від природних форм ідентичністю або місцезнаходженням одного або декількох амінокислотних залишків (наприклад, делеційні аналоги, до складу яких входять менше, ніж усі вказані залишки; субституційні аналоги, у яких один або декілька вказаних залишків заміщено іншими залишками, природними або іншими аналогами, відомими у цій галузі, наприклад D-амінокислотами; та додаткові аналоги, у яких один або декілька амінокислотних залишків піддаються хімічній модифікації для підвищення стабільності, розчинності та/або стійкості до протеолізу) та які поділяють деякі або усі властивості природних форм.

Пептидні послідовності, наприклад, такі, описаних наведено перед тим, можуть бути ідентифіковані різноманітними засобами. Шляхом порівняння об'ємних структур нативних гемоглобінових ланцюгів, активних у пробі (наприклад, альфа-ланцюга), зі структурно спорідненими білками, які позбавлені активності (наприклад, міоглобіном) можна ідентифікувати ділянки, які мають інші об'ємні конформації, і які, таким чином, є придатними ділянками для активних пептидів. У іншому підході застосовують вибіркового протеолізу, під час якого протеолітичні ферменти використовують для обмеженого розщеплення гемоглобінових ланцюгів, наслідком чого є пептиди, які можна відокремлювати, наприклад, засобами HPLC зі зворотною фазою, з подальшим випробування на пригнічення стовбурових клітин. Пептиди можна також одержувати хімічним синтезом (наприклад, твердофазним синтезом); таким чином можна легко одержати цілий ряд пептидів, які взаємно перекриваються (наприклад, 15-членних), до складу яких входить необхідна послідовність гемоглобінового ланцюга (наприклад, альфа-ланцюга) і які можна випробувати у пробах на стовбурових клітинах. Можна одержати комбінаторні бібліотеки, у яких здійснюють різнобічний хімічний синтез та у яких позиції окремих амінокислот робляться змінними, наслідком чого є одержання значної кількості пептидних аналогів для перевірки [наприклад, Дулі та інші, Peptide Research 8: 124-137, 1995]. У альтернативному варіанті, можна використовувати рекомбінантні способи. Для ідентифікування критичних залишків, необхідних для активності конкретного ланцюга гемоглобіну, може бути використано сайт-спрямований мутагенез. Ділянки ланцюга, який, як відомо, має активність, як інгібітор стовбурових клітин (наприклад, альфа-ланцюга), можуть заміщуватись ділянками спорідненого, але позбавле-

ного активності білка (наприклад, міоглобіну), та перевірятись у пробах на стовбурових клітинах, що дозволяє ідентифікувати ділянки, необхідні для активності. Такі ідентифіковані ділянки можуть експресуватись, як пептиди, і перевірятись на активність у пробах із мітотичним циклом клітин.

Гомологічні або аналогічні варіанти INPROL від інших видів використовують з різними цілями у ветеринарії, подібно терапевтичним варіантам втілення цього винаходу, опис яких наведено перед тим.

INPROL у кількостях, які забезпечують пригнічення стовбурових клітин, справляє свій вплив на клітини у стані мітотичної активності шляхом оборотного переведення їх до стану "покою", у якому вони не поділяються або поділяються повільно. Коли виникає необхідність стимулювання поділу клітин, які знаходяться у неактивному стані, наприклад, після лікування ракового пацієнта хімотерапевтичними засобами або піддання його променевої терапії, INPROL може бути застосований у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин. У альтернативному варіанті, або на додаток, суб'єкту можуть бути введені колонієстимулювальні фактори або інші гемопоетичні стимулятори. До прикладів таких стимуляторів належать, але ними не обмежуються: M-CSF (CSF-1), GM-CSF, G-CSF, Megakaryocyte-CSF (мегакаріоцитарний колонієстимулювальний фактор), тромбopoетин, фактор стовбурових клітин або інші цитокіни, наприклад, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 або еритропоетин.

INPROL поліпептиди або активні фрагменти, які мають активність пригнічення стовбурових клітин, очищають або синтезують традиційними хімічними способами у поєднанні з відповідними біопробами на активність пригнічення стовбурових клітин, як представлено прикладами у протоколах, опис яких буде наведено далі.

У одному варіанті втілення цього винаходу терапевтично ефективна кількість INPROL білка або його терапевтично ефективного фрагмента використовується у суміші з фармацевтично прийнятним носієм. Ця INPROL композиція, як правило, вводиться парентеральним впорскуванням або вливанням. Підшкірний, внутрішньовенний або внутрішньом'язовий шляхи впорскування вибирають відповідно до досягнутого терапевтичного ефекту.

У разі системного введення, терапевтична композиція для використання за цим винаходом має форму апірогенного парентерально прийнятного водного розчину. Виготовлення прийнятного стерильного білкового розчину з відповідними показниками pH, ізотонічності, стабільності, вмісту білків-носіїв може бути здійснено при сьогоdnішньому стані даної галузі.

Цим винаходом передбачаються також фармацевтичні композиції, до складу яких входять терапевтично ефективні кількості пептидного або поліпептидного продуктів за цим винаходом, разом із прийнятними розріджувачами, консервантами, розчинниками, емульгаторами, ад'ювантами та/або носіями, придатними для INPROL терапії. Вираз "терапевтично ефективна кількість", який

використано у цьому описі, означає кількість, яка забезпечує терапевтичний ефект для даного стану та запровадженого режиму лікування. Такі композиції є рідинами, гелями, мазями, ліофілізованими або висушеними іншими засобами лікарськими формами і до їх складу входять розріджувачі з різним вмістом буфера (наприклад, Трис-НСІ-буфер, ацетат, фосфат), рН та іонною силою, домішки, наприклад, альбумін або желатина для запобігання адсорбуванню на поверхнях, детергенти (наприклад, Твій 20, Твій 80, Плюронік F68, солі жовчних кислот), розчинники (наприклад, гліцерин, поліетиленгліколь), антиокисники (наприклад, аскорбінова кислота, метабісульфіт натрію), консерванти (наприклад, Тімеросал, бензиловий спирт, парабени), речовини для збільшення основної маси та модифікатори тону (наприклад, лактоза, маніт), ковалентного зв'язку полімерів, наприклад, поліетиленгліколя до білка, утворення комплексних сполук з іонами металів або включення матеріалу до або на подрібнені препарати полімерних сполук, наприклад, полімеру молочної кислоти, полігліколевої кислоти, гідрогелів і т.ін., або до ліпосом, ніосом, мікроемульсій, міцелл, одношарових або багатшарових везикул, мікрокапсул або мікросфер до впорскування, які піддаються біологічному розкладу, або білкових матриць, гемолізованих еритроцитів, сферопластів, шкірних пластирів або інших способів виділення або пакування фармацевтичних препаратів. Такі композиції будуть впливати на фізичний стан, розчинність, стабільність, швидкість виділення *in vivo* та швидкість виведення INPROL *in vivo*. До композицій з контрольованим або подовженим виділенням належать лікарські форми у ліпофільних депо (наприклад, жирних кислотах, смолах, маслах). До цього винаходу належать також подрібнені композиції, вкриті шаром полімерів (наприклад, поллоксамерів або поллоксамінів) та INPROL, поєднаний з антитілами, спрямованими проти тканинспецифічних рецепторів, лігандів або антигенів, або поєднаних з лігандами тканинспецифічних рецепторів. Інші варіанти композицій за цим винаходом включають подрібнені форми захисних покрив, факторів пригнічення протеази або підсилювачів проникнення для різних шляхів введення, у тому числі парентерального, легеневого, назального, локального (шкіра або слизова оболонка) та орального. За іншими варіантами втілення, композиція, до складу якої входить INPROL, вводиться локально або за допомогою черезшкірного пластиру.

За одним із варіантів втілення, композиції за цим винаходом розфасовано до стерильних флаконів або однодозових ампул.

Цей винахід включає також композиції, до складу яких входить один або декілька додаткових факторів, наприклад, хіміотерапевтичних речовин (таких як 5-фторурацил (5FU), цитозинарабінозид, циклофосфамід, цисплатин, карбоплатин, доксорубіцин, етопозид, таксол, алкілувальні агенти), противірусних речовин (наприклад, AZT (азидодезокситимідин), ацикловір), фактор некротизації пухлин, цитокіни (наприклад, інтерлейкіни), антипроліферативні лікарські засоби, антиметаболіти

та лікарські засоби, які втручаються в метаболізм ДНК.

Режим дозування, який передбачається для способу лікування суб'єкта, якому призначено введення згаданих цитотоксичних засобів або для обробки гіперпроліферативних стовбурових клітин, визначається лікарем з урахуванням різних факторів, які модифікують дію лікарських засобів; наприклад, стану, маси тіла, статі та раціону згаданого пацієнта, тяжкості будь-якої інфекції, часу введення та інших клінічних факторів.

Після піддання згаданого суб'єкта обробці цитотоксичним засобом або опроміненню, терапевтичним способом за цим винаходом факультативно передбачається введення суб'єкту INPROL у кількостях, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин, з факультативним включенням одного або декількох лімфокінів, колонієстимулювальних факторів або інших цитокінів, гемопоетинів, інтерлейкінів або факторів росту для загального стимулювання росту та поділу стовбурових клітин (або їх нащадків), пригнічених попередньою обробкою INPROL'ом. До таких терапевтичних засобів, які заохочують гемопоез, належать IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Meg-CSF, M-CSF (CSF-1), GM-CSF, G-CSF або еритропоетин. Дози цих засобів підбирають відповідно до даних, одержаних під час їх застосування у клінічних випробуваннях на ефективність підсилення відновлення гемопоетичної функції після хіміотерапії або трансплантування гемопоетичних стовбурових клітин. Ці дози повинні підбиратись з метою компенсації відхилень у фізичному стані пацієнта, кількості та типу хіміотерапевтичного засобу або дози опромінення, яким цього пацієнта було піддано. Розвиток реверсування пригнічення стовбурових клітин, спричиненого введенням INPROL пацієнту, який піддавався лікуванню, контролюють традиційними способами.

При лікуванні лейкозу, одночасно з введенням цитотоксичного лікарського засобу або під час опромінювання, рекомендовано вводити як INPROL для пригнічення нормального мітотичного циклу стовбурових клітин, так і стимулятор росту лейкозних клітин, наприклад, IL-3 або GM-CSF. Завдяки згаданому протоколу можна досягти максимальної різниці між статусом мітотичної активності та чутливістю нормальних та лейкозних клітин до лікарського засобу.

Приклад 1: Аналіз пригнічення проліферації стовбурових клітин *in vivo*

Для виявлення проліферації стовбурових клітин, кількість CFU-S у S-фазі мітотичного циклу визначали за допомогою методу "самовбивства" ³H-Тимідином [Бекер (Becker) та інші, Blood 26: 296-308, 1965].

Незрілі гемопоетичні клітини-попередники-Колонієтвірні Одиниці у селезінці (CFU-S)-можна виявляти *in vivo* шляхом утворення макроскопічних колоній у селезінці летально опромінених мишей через 8-12 днів після внутрішньовенного впорскування гемопоетичних клітин [Тілл (Till) та МакКаллох (McCulloch), 1961].

Для стандартного аналізу проліферації CFU-S, звичайно, застосовують метод "самовбивства" ³H-

Тимідином [Бекер та інші, 1965]. Згаданий метод засновано на включенні тимідину, попередника ДНК, міченого радіоактивним ізотопом, (^3H -Тимідину), до клітини під час синтезу ДНК. CFU-S, які знаходяться у фазі синтезу (S-фазі) мітотичного циклу під час проведення випробування, умирляються високим рівнем радіоактивності, внаслідок чого стають нездатними до утворення колоній у селезінці. Таким чином, різниця між кількістю CFU-S, утворених шляхом впорскування проби клітин, інкубованих без ^3H -Тимідину, і кількістю таких самих клітин, інкубованих з ^3H -Тимідином, демонструє відсоток проліферативних CFU-S у вихідному зразку.

Випробування інгібітора не може проводитись на популяції стовбурових клітин кісткового мозку нестимульованих тварин, оскільки інгібітор впливає лише на CFU-S у стані мітотичної активності, які становлять лише 7-10% від загальної популяції CFU-S у кістковому мозку нормальних мишей.

Для стимулювання проліферації CFU-S було використано фенілгідазин (PHZ) або застосовано сублетальне опромінення [Лорд (Lord), 1976].

Ми розробили спосіб використання тестостеронпропіонату (TSP), який засновано на стимулювальному впливі останнього на мітотичну активність CFU-S [Байрон (Byron) та інші, Nature 228: 1204, 1970], який спрощує випробування і не викликає будь-яких побічних ефектів. TSP-індуковане стимулювання проліферації CFU-S через 20-24 год. після впорскування, і його вплив можна спостерігати як мінімум впродовж 7 днів.

Процедура, застосована для скринінгу фракцій під час очищення інгібітора, виглядала таким чином:

Миші: Під час проведення усіх іспитів були використані миші лінії BDF₁ або CBF₁.

Мишам-донорам вводили 10мг/100г дозу TSP внутрішньоочеревинним впорскуванням з розрахунку 0,2мл/мишу з метою переведення 30-35% CFU-S до S-фази.

Через 24 год. зі стегнової кістки відбирали кістковий мозок для виготовлення клітинних суспензій. Після цього від п'яти до десяти мільйонів клітин на мл інкубували з різними контрольними та експериментальними фракціями впродовж 3,5 год. при 37°C на водяній бані з двома пробірками для кожної групи (одна для гарячої (радіоактивної) і одна для холодної (нерадіоактивної)).

Через 3,5 год. до кожної гарячої пробірки у об'ємі 200мкл на 1мл клітинної суспензії додавали ^3H -Тимідин (1мкКі/мл, питома активність 18-25Кі/ммоль); до холодних пробірок не додавали нічого. Інкубування додатково провадили впродовж 30хв. при 37°C.

Після 30-хвилинного інкубування реакцію умиртвіння було завершено шляхом додавання 10мл холодного (4°C) живильного середовища, до складу якого входило 400мкг/мл нерадіоактивного Тимідину. Клітини екстенсивно промивали (3 рази).

Клітини ресуспендували і розводили до необхідної концентрації для впорскувань, як правило, $2-4 \times 10^4$ клітин на мишу у 0,3-0,5мл.

Мишей-реципієнтів, 8-10 на групу, опромінують не пізніше, ніж за 6 год. до впорскування.

Селезінки мишей-реципієнтів збирають на 9-12 день і фіксують у розчині Теллесницького; підрахунок колоній здійснюють неозброєним оком. Відсоток клітин у S-фазі вираховують за допомогою наведеної далі формули:

$$\%S = \frac{a-b}{a} \times (100\%)$$

де a - кількість CFU-S без ^3H -Тимідину

де b - кількість CFU-S з ^3H -Тимідином

Експериментальні дані з INPROL, наведені у Таблиці 1, демонструють, що стовбурові клітини у стані мітотичної активності після обробки INPROL стають стійкими до дії ^3H -Тимідину. Для цього та усіх наступних прикладів, термін "pINPROL" означає очищений білок зі свинячого кісткового мозку. Такий самий захист спостерігається у разі цитотоксичних лікарських засобів, специфічних для S-фази, цитозинарабінозиду та гідроксисечовини (дані не наведено). У разі, якщо оброблені стовбурові клітини після цього промити холодним живильним середовищем, до складу якого входить не-радіоактивний Тимідин, стовбурові клітини, які вижили, проліферують у мишачих селезінках з нормальним утворенням колоній.

Таблиця 1

Пригнічувальний вплив pINPROL на проліферацію CFU-S впродовж чотиригодинного інкубування з клітинами кісткового мозку

Група	^3H -TdR (Тимідин)	^3H -TdR (Тимідин)	Відсоток CFU-S, за- битих ^3H - TdR
Без інкубування	22,2±2,0*	13,7±2,4*	38,3±1,7
4год. з живильним середовищем	18,7±3,0*	11,4±1,3*	43,1±1,4
4год. з pINPROL	21,2±2,3*	20,7±2,6*	2,1±0,08

*CFU-S на 2×10^4 клітин

Приклад 2: Аналіз пригнічення проліферації стовбурових клітин in vitro

Безпосередній ефект INPROL було продемонстровано за допомогою наведеної далі експериментальної системи [Лорд та інші, The Inhibitors of Hematopoiesis. стор.227-239, 1987]. Лінію стовбурових клітин, залежну від полівалентного фактора росту (IL-3), FDCP міх A4 (A4), підтримували на живильному середовищі Дульбекко, модифікованому за способом Іскова (IMDM), доповненому 20% конячої сироватки та 10% кондиціонованого живильного середовища WEHI-3 як джерела колонієстимулювального IL-3.

Для визначення проліферації було використано пробу на включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм: клітини A4 (5×10^4 у 100мкл живильного середовища з 20% конячої сироватки та 50% CM (кондиціонованого живильного середовища) WEHI-3) інкубували при 37°C у 5% CO₂ впродовж 16 год.

На початку додавали pINPROL або неочищений BME (екстракт кісткового мозку) (фракція IV). Після цього до кожної групи на додаткові 3 год.

інкубування додавали тимідин, мічений радіоактивним тритієм ($^3\text{H-TdR}$) 3,7кБк у 50мкл при 740ГБк/ммоль). Рівень проліферації вимірювали шляхом збору клітин та процент пригнічення обчислювали за допомогою наведеної далі формули:

% пригнічення =

$$= \frac{\text{cpm без INPROL} - \text{cpm з INPROL}}{\text{cpm без INPROL}} \times (100\%)$$

Включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм ($^3\text{H-TdR}$) клітинами FDCPmix-A4, які було вирощено у присутності певних доз екстракту нормального кісткового мозку або rINPROL, наведено на Фіг.6. Видно, що активність очищеної композиції rINPROL майже у 1000 разів перевищує активність вихідного матеріалу. Час експонування (16год.) є важливим фактором для ефективного пригнічення і демонструє ознаки безпосереднього впливу rINPROL на стовбурові клітини лінії клітин A4.

Приклад 3: Пригнічення проліферації CFU-S за допомогою впорскування INPROL *in vivo*. Дози та тривалість ефекту

Дослідження ефекту впорскування INPROL *in vivo* виявило, що INPROL може ефективно блокувати рекрутинг CFU-S до мітотичного циклу, і, тим самим, забезпечувати захист цих клітин від цитотоксичного впливу подальшої обробки, що демонструє його потенційну клінічну придатність.

Експериментальний протокол переслідував дві мети: перевірити ефект INPROL на CFU-S у разі впорскування *in vivo* та визначити ефективну тривалість активності INPROL відносно стовбурових клітин, які знаходяться у стані мітотичної активності.

Для стимулювання проліферації CFU-S вдавались до впорскування тестостеронпропіонату, виходячи з ефекту, згаданого перед тим у Прикладі 1.

Мишам лінії BDF₁ впорскували TSP (10мг/100г) у День 0; через 24год. мишам кожної експериментальної групи (4 миші на групу) внутрішньоочеревинно впорскували rINPROL у дозах 0мкг, 5мкг, 10мкг та 15мкг/мишу.

Через 24год. після впорскування rINPROL мишей умертвляли і відсоток CFU-S у стані мітотичної активності визначали пробою, опис якої наведено у Прикладі 1. Впорскування TSP індукувало перехід приблизно 50% CFU-S до стану мітотичної активності, у порівнянні з 7% у необроблених мишей. rINPROL у дозах, які становили всього 2мкг/мишу, був спроможним пригнітити TSP-індуковану проліферацію до нормального рівня.

З метою оцінки тривалості ефекту, одній групі мишей (21 миша на групу) впорскували тільки TSP, а іншій групі впорскували як TSP, так і rINPROL (через 24год. після TSP). Мітотичну активність CFU-S визначали кожні 24год. впродовж тижня шляхом відбору 3 донорів від кожної групи та вимірювання мітотичного статусу CFU-S у їх кістковому мозку за методом, опис якого було наведено перед тим (див. Приклад 1). Дані, зображені на Фіг.7, показують, що, у той час як тривалість ефекту TSP дорівнює як мінімум 7 дням, одноразове впорскування INPROL може перевести CFU-S до

неактивного стану і утримувати їх від переходу до стану мітотичної активності впродовж не більше ніж 48-72год. Оскільки період напіввиведення *in vivo* більшості хіміотерапевтичних засобів, які використовуються при раковій та лейкозній хіміотерапії, є відносно коротким, і становить, як правило, менше ніж 24год., тривалість ефекту INPROL, відповідно до одержаних даних, є довшою, аніж ефективний час, впродовж якого хіміотерапевтичні засоби, наприклад, цитозинарабінозид або підроксисечовина, зберігають свою активність *in vivo*. Більш важливим є те, що у разі хіміотерапії та променевої терапії, які мають більш тривалі інтервали (більше ніж 24год. і менше ніж 96год.) між першим (під час якого стовбурові клітини не пошкоджуються) та другим (який викликає пошкодження CFU-S) сеансами, одноразове впорскування INPROL під час інтервалів між двома застосуваннями хіміотерапевтичного засобу або опромінення повинно бути достатнім. Для декількох повторних циклів цитотоксичної або променевої терапії може застосовуватись та сама стратегія, виходячи з тривалості ефекту INPROL.

Приклад 4: Більшість первинних гемопоетичних стовбурових клітин, стимульованих до прискореного мітотичного циклу після обробки 5-FU, захищаються INPROL від другої обробки 5-FU

Лікарський засіб 5-фторурацил (5-FU) докорінно зменшує численність клітин у мієлоїдній та лімфоїдній лакунах. Цей лікарський засіб звичайно розглядають як мітотично специфічний і прицільно діючий на клітини у стані прискореної проліферації, оскільки наслідком включення нуклеотидного аналога до ДНК на S-фазі мітотичного циклу або перед ним є загибель клітини. Разова доза 5-FU не впливає на довгострокову виживаність та імуногемопоетичне відновлення кісткового мозку мишей; було, однак, продемонстровано [Гаррісон (Harrison) та інші, Blood 78: 1237-1240, 1991], що поліпотентні гемопоетичні стовбурові клітини (PHSC) стають вразливими до другої дози 5-FU на короткий період часу, приблизно 3-5 днів після початкової дози. Це може пояснюватись тим, що мітотичний цикл PHSC, як правило, є надто повільним для того, щоб разова доза 5-FU могла бути ефективною, і згадані клітини стимулюються до прискореного мітотичного циклу стимулами, які виникають внаслідок початкової обробки 5-FU. Ми гадаємо, що PHSC можна повернути до статусу повільної мітотичної активності за допомогою INPROL і, тим самим, захистити їх від другої обробки 5-FU.

Під час проведення цих експериментів було використано мишей-самців лінії BDF₁. Концентрований розчин 5-FU (компанія Sigma) було виготовлено у фізрозчині при концентрації 10мкг/мл. Кожній з оброблених мишей вводили 2мг 5-FU на 10г маси тіла через хвостову вену у День 0 експерименту; через 24год. мишам внутрішньоочеревинно було впорскувано rINPROL (10мкг/100г маси тіла), та у День 3 їм було впорскувано другу дозу 5-FU. Дослідження виживаності проводили шляхом контролювання загибелі мишей у експериментальній (введення rINPROL) та контрольній групах (кожна

з яких складалась з 30 мишей). Криві виживаності наведено на Фіг.8.

Приклад 5: Порівняння впливу попереднього інкубування з rINPROL та MIP-1α на клітини кісткового мозку

Метою цього експерименту було порівняння пригнічувальних ефектів попереднього інкубування з rINPROL та MIP-1α на клітини мишачого кісткового мозку *in vitro*.

Було використано таку процедуру:

in vivo: мишам лінії BDF₁ віком 6-15 тижнів впорскували 200мг/кг 5-FU внутрішньоочеревинно за 48год. до збору кісткового мозку зі стегнових кісток. *in vitro*: Підраховували одиночну збірну суспензію клітин і 5x10⁶ клітин інкубували в загальній кількості у 2мл з або без rINPROL або MIP-1α з 5% конячої сироватки, у живильному середовищі IMDM з доданням L-глутаміном, при 37°C та 5% CO₂ впродовж 4год. Після цього клітини двічі промивали і повторно підраховували. Згадані клітини висівали до метилцелюлози за таких кінцевих умов:

0,8% метилцелюлози
25% конячої сироватки
20нг/мл рекомбінантного мишачого IL-3
доданий L-глутамін
5x10⁵ клітин на мл
живильне середовище IMDM

Планшети інкубували впродовж 11 днів при 37°C та 5% CO₂ при 100% вологості. Підраховували колонії, які мали більше 50 клітин.

Таблиця 2

Групи	Кількість колоній	Відсоток контролю
Контроль	31,0	100%
rINPROL	21,25	68,5%
MIP-1α	35,25	114%

Приклад 6: INPROL пригнічує проліферацію HPP-CFC

Аналізом *in vitro* для визначення відновлюваних мишачих стовбурових клітин та ранніх клітин-попередників є аналіз колонієтвірних клітин із високим проліферативним потенціалом (HPP-PFC); інші споріднені типи аналізу, наприклад, CFU-A, CFU-GM, CFU-E та CFU-GEMM дозволяють виявити популяції клітин-попередників, чисельність яких прогресивно зменшується [M. Мур (M. Moore), Blood 177: 2122-2128, 1991]. Цей приклад показує, що попередня обробка клітин rINPROL пригнічує їх проліферацію, у той час як MIP-1α не викликає таких наслідків за тих самих експериментальних умов.

Мишей лінії BDF₁ обробляли 5-фторурацилом (200мг/кг внутрішньоочеревинно) перед проведенням аналізу на кількість HPP-CFC у їх кістковому мозку. Клітини промивали центрифугуванням та інкубували при густині від 10⁶ до 5x10⁶/мл у живильному середовищі без доданого засобу (Контроль), з доданням rINPROL (25нг/мл) або MIP-1α (200нг/мл) впродовж 4год. Після інкубування клітини промивали і висівали до агару (0,3%) з 30% FCS та комбінованим живильним середовищем від ліній клітин 5637 та WEHI-3B (7,5% кожного живи-

льного середовища, як рекомендовано Шарпом (Sharp) та іншими, 1991). Концентрація посіву становила 5x10⁴клітин/мл у 60мм чашках. Підрахунок колоній проводили на 14 день, одержані результати наведено далі.

Таблиця 3

Група	HPP-CFU	% контролю
Контроль	15,5±1,2	100%
rINPROL	8,3±0,7	53,5%
MIP-1α	15,8±0,9	101%

Відповідно до цих результатів, MIP-1α не пригнічував проліферацію більшості незрілих клітин-попередників у разі присутності тільки впродовж періоду попереднього інкубування. rINPROL ефективно пригнічував проліферацію за тих самих умов, що свідчить про фундаментальну різницю між rINPROL та MIP-1α з точки зору біологічної активності.

Приклад 7: Терапевтичний ефект INPROL на виздоровлення від радіаційно індукованої аплазії кісткового мозку

Аплазія кісткового мозку є головним обмежувальним токсичним фактором променевої терапії раку. Було показано, що деякі фактори росту (наприклад, G-CSF, GM-CSF, еритропоетин) можуть прискорювати виздоровлення від радіаційно індукованої аплазії кісткового мозку. Концепція захисту шляхом застосування інгібітора проліферації стовбурових клітин є іншим та доповнювальним підходом до проблеми боротьби з гематологічними ураженнями. Для того, щоб скористатися терапевтичною процедурою, яку було розроблено раніш (Приклади 3-4), розробили модель летального опромінення мишей. У цій галузі відомо, що миші, яких було опромінено 9Гр кобальту 60, починають вмирати через 10-14 днів; на 30 день рівень смертності становить приблизно 50%. Цю летальну дозу було застосовано у нашій моделі шляхом розподілу її на два послідовні сеанси по 4,5Гр кожний з інтервалом у 3 дні між дозами. Попередні дані показали, що крива виживаності у цій моделі була дуже близькою до кривої, відомої для одноразового опромінення 9Гр; більше того, аналіз проліферації CFU-S показав, що через 24год. після першого опромінення у 35-50% CFU-S індукується проліферація. Захист таких клітин може забезпечуватись інгібітором стовбурових клітин, введеним перед другою дозою.

З метою перевірки цієї можливості, мишей (50мишей/групу) у День 0 було опромінено дозою 4,5Гр. Через 24год. одній групі ввели rINPROL (2мкг/мишу внутрішньоочеревинно), а другій, контрольній групі, було впрорскуно фізрозчин. Другу дозу опромінення (4,5Гр) миші одержали на 3 день.

На Фіг.9 показано підвищення виживаності після однієї дози rINPROL. Умови згаданої моделі є клінічно придатними для лікування раку будь-якого типу, у тому числі тих, які характеризуються наявністю твердих пухлин; подібному лікуванню можна було б піддавати ракового хворого шляхом введення ефективної дози INPROL між двома послі-

довними дозами опромінення, що дозволило б застосувати підвищені дози опромінення для лікування раку. Цей спосіб впливу можливо було б поширити також на хіміотерапевтичні засоби.

Приклад 8: Застосування INPROL для трансплантування аутологічного кісткового мозку

Трансплантування кісткового мозку є єдиним відомим способом лікування лейкозів декількох типів (СМЛ (хронічний мієлолейкоз), АМЛ (гострий мієлобластний лейкоз) та інші). Кондиціонування аутологічного кісткового мозку *ex vivo* для трансплантування повинно забезпечити потенційні аутологічні джерела нормальних стовбурових клітин, вільних від лейкозного забруднення та здатних до повторного заселення гемопоетичної системи реципієнта для забезпечення агресивної та ефектivelyної терапії.

1. Культура декстерівського типу L1210, як модель лейкозу для дослідження ефекту INPROL зі збереженням нормального гемопоєзу під час десенсибілізації пухлинних клітин за допомогою AraC

Культури декстерівського типу (LTBMC) одержували за методикою, запропонованою Токсозом (Toksoz) та іншими [Blood 55: 931-936, 1980]; лінію лейкозних клітин L1210 було адаптовано до LTBMC шляхом сумісного культивування впродовж 2 тижнів. У цих комбінованих культурах LTBMC/L1210 відбувався одночасний ріст нормальних та лейкозних клітин-попередників, що нагадує ситуацію у кістковому мозку лейкозного пацієнта. Розрізнення між нормальними колонієтворними одиницями (CFU) та лейкозними CFU було можливим завдяки їх вирощуванню у вигляді колоній на агарі у присутності або у відсутності комбінованого живильного середовища від WEHI-3 (мишача лінія клітин-продуцентів IL-3). Нормальні клітини піддаються апоптозу у присутності IL-3, у той час як лейкозні клітини за його відсутності утворюють колонії. Суспендовані клітини композиції LTBMC-L1210 давали приблизно 150 колоній у присутності IL-3 (нормальні гемопоетичні клони) та 70 колоній у разі вирощування без IL-3 (лейкозні клони) (на 50000 висіяних клітин).

Процедура десенсибілізації пухлинних клітин виглядала таким чином: у День 0 усі суспендовані клітини та живильні середовища (10мл/пластикову пробірку) видаляли з пластикових пробірок з LTBMC-L1210 і заміняли 2мл живильних середовищ, до складу яких входило 200мкг цитозинарабінозиду (AraC) [Цирлова (Tsyrova) та інші, у Leukemia: Advances in Biology and Therapy, том 35, 1988]; після 20год. інкубування пластикових пробірок промивали, і до них на 4год. вносили по 2мл тільки свіжих живильних середовищ (контрольна група) або живильних середовищ, до складу яких входив rINPROL (25нг/мл). Після цього попереднього інкубування клітини знову інкубували з 100мкг/пластикову пробірку AraC впродовж 3год. при 37°C. Кожну групу складало 4 пластикових пробірки. Культури LTBMC-L1210L тричі промивали і заміняли свіжим живильним середовищем LTBC; їх підтримували, як і попередньо, для проведення досліджень відновлення впродовж 3-4 тижнів.

Дані подано на Фіг.10. У контрольних культурах, які було оброблено тільки AraC, ріст клітин не спостерігався, у той час як у пластикових пробірках, захищених INPROL, відновлення гемопоєзу відбувалось набагато швидше внаслідок проліферації клітин-попередників з адгезивного шару. Більше того, клітини з експериментальної групи, у разі висадження на агар, росли тільки у присутності IL-3 і давали приблизно 100 CFU на 50000 клітин; впродовж як мінімум 4 тижнів ніякого росту лейкозних клітин не спостерігалось. Таким чином, кістковий мозок, оброблений *ex vivo* ефективною дозою AraC у комбінації з INPROL може бути позбавленим ракових клітин, у той час як стовбурові клітини виявляються захищеними. Існує можливість розповсюдження цього способу впливу на інші форми хіміотерапії або променевої терапії.

2. Репопуляційна здатність кісткового мозку (MRA) та тридцятиденний радіаційний захист підвищуються завдяки обробці INPROL'ом *in vitro*

MRA, тобто здатність клітин до повторного заселення кісткового мозку летально опромінених мишей, разом зі здатністю забезпечувати радіаційний захист впродовж 30 днів, є безпосереднім визначенням *in vivo* потенціалу рятівання мієлосупресованих тварин [Bicer (Visser) та інші, Blood Cells 14: 369-384, 1988].

З метою проведення досліджень явища радіаційного захисту, мишей лінії BDF₁ опромінювали дозою 9,5Гр та лікували трансплантуванням кісткового мозку тестостеронстимульованих донорів. Одну групу реципієнтів було вибірено шляхом трансплантування клітин кісткового мозку, попередньо проінкубованих впродовж 4год. із живильним середовищем (контроль-група А) і іншу (групу В) - з 25нг/мл rINPROL. Клітини у обох групах промивали, і опроміненим тваринам було трансплантовано 30000 клітин/мишу. Надано дані по виживаності (Фіг.11). Відображено суму трьох експериментів; контролі нормалізовано до 100%. Інкубування з rINPROL підвищило виживаність мишей у контрольній групі з 36,5% до 61,8% на 30 день.

Підвищення MRA, індуковане попереднім інкубуванням з INPROL, може бути одним із механізмів поліпшення радіаційного захисту. З метою перевірки згаданої гіпотези, рівень MRA визначали за методикою, запропонованою Бісер та іншими (цитована робота). Стисло, мишей-донорів лінії BDF₁ попередньо обробляли тестостероном, їхній кістковий мозок попередньо інкубували з живильним середовищем або rINPROL впродовж 4год. та впорскували опроміненим тваринам. На 13 день клітини кісткового мозку зі стегнової кістки реципієнта висівали на агар з 3 різними концентраціями (0,01, 0,05, 0,1 еквівалента стегнової кістки) у присутності 20% конячої сироватки та 10% WEHI-3M. Кількість колоній на 7 день відображала MRA, оскільки колонієтворні клітини у кістковому мозку реципієнтів на той час були клітинами-попередниками незрілих стовбурових клітин донора.

Як показано на Фіг.12, MRA популяції клітин, попередньо проінкубованих з INPROL, є вищою, аніж у контрольній групі (В). Приклад 9: Антипер-

проліферативний ефект INPROL на стовбурові клітини може змінити аномалії, які спостерігаються серед них під час диференціювання

Гіперпроліферація CFU-S спостерігається не тільки під час відновлення після застосування цитотоксичних лікарських засобів або опромінення, але також як наслідок нормального старіння, і, як гадають, це є головною особливістю Мієлодиспластичного Синдрому (MDS). Він супроводжується порушенням диференціації, наприклад, перевагою на користь еритроїдної диференціації, у той час як диференціація по гранулоцитарному шляху зменшується.

Клітини кісткового мозку інкубували впродовж 4 год. при 37°C з 25нг/мл рІNPROL або живильних середовищ (Контроль), промивали, після чого висівали на агар з 20% конячої сироватки, 2Од/мл еритропоєтину та 10% WEHI-СМ. Кількість колоній BFU-E та GM-CFU підраховували на 7 день. У Таблиці 4 наведено дані, узагальнені для 3 експериментів - для кожної групи було взято 4 тварини на часову точку; засівали по 4 чашки.

Як впливає з Таблиці 4, інкубування нормального кісткового мозку (NBM) від інтактних молодих тварин (миші лінії BDF₁ віком 8-12 тижнів) з INPROL не змінило кількості або пропорції колоній різних типів. Миші-донори лінії BDF₁, попередньо

оброблені тестостеронпропіонатом (TSP), продемонстрували таке саме підвищення проліферації CFU-S, яке спостерігалось перед тим (Приклад 1, 3, 4), незначне підвищення кількості клітин-попередників еритроцитів (колонії BFU-E) та скорочення GM-CFU, що було повністю ліквідоване внаслідок інкубування з INPROL. На додаток до цього, аномально високий рівень проліферації CFU-S повернувся до 10% CFU-S на S-фазі мітичного циклу. Відомо, що гіперпроліферація CFU-S є особливістю деяких мишачих ліній, сприйнятливих до індукування вірусного лейкозу, наприклад, мишей лінії Balb/c (Таблиця 4), і може також спостерігатись у тварин старшого віку (Таблиця 4). Той самий перерозподіл детермінованих клітин-попередників, який спостерігався у мишей лінії BDF₁, оброблених TSP, спостерігається у мишей лінії Balb/c та у мишей лінії BDF₁ старшого віку (23-25 місяців), спільним для яких є аномально високий рівень проліферації CFU-S. Корекція як проліферації CFU-S, так і диференціації була індукована інкубуванням з INPROL. Ще більш важливе клінічне значення має те, що результати досліджень показали, що впорскування INPROL in vivo (2мкг/мишу) впливало як на проліферацію CFU-S, так і на співвідношення еритроїдних (BFU-E) та GM-колоній (Таблиця 4).

Таблиця 4

Ефект INPROL на диференціацію CFU-S на детерміновані клітини-попередники BFU-E та CFU-GM

Донори кісткового мозку	pINPROL	Відсоток CFU-S, за- битих ³ H-TdR	BFU-E	CFU-GM
Молоді миші лінії BDF ₁	-	12,0±0,3	28,33±1,91	46,22±3,44
	+	15,0±1,3	22,00±3,74	47,70±3,72
Старі миші лінії BDF ₁	-	47,1±1,9	43,75±1,54	24,0±1,33
	+	11,4±0,7	15,25±1,45	44,0±7,63
Миші лінії BDF ₁ , стимульовані TSP	-	53,2±1,6	32,67±2,44	15,71±2,28
	+	7,2±0,4	12,00±1,83	35,50±1,4
Balb/C	-	57,0±1,9	47,60±2,96	33,57±3,45
	+	23,0±2,4	24,86±2,53	70,60±4,96

Приклад 10: Імуностимуляторна активність INPROL

Спостерігали, що інкубування клітин кісткового мозку, які включають високу пропорцію проліферуючих CFU-S, з INPROL не тільки змінювало мітичний цикл CFU-S, але і їх диференціацію; переважно еритроїдна диференціація змінювалась на користь гранулоцитарних та лімфоїдних клітин-попередників. Ця властивість INPROL має значення внаслідок імуносупресорних побічних ефектів цитотоксичної хіміотерапії або променевої терапії, а також імуносупресії, яка супроводжує розлади, обумовлені гіперпроліферацією стовбурових клітин та старінням.

Цей приклад показує прямий вплив INPROL на диференціацію незрілих клітин-попередників довгоїснучих культур лімфоцитів (LLTC), які було одержано за методикою, запропонованою Уїтлоком (Wittlock) та Уїттом (Witte) [Ann. Rev. Immun. 3: 213-35, 1985], на клітини-попередники перед-B, який визначали за утворенням колоній у метилцелюлозі, до складу якої було включено IL-7.

LLTC одержували, як було описано перед тим, і підкормлювали свіжим живильним середовищем LLTC (компанія Terry Fox Labs., Ванкувер, Канада) двічі на тиждень. Неадгезивні клітини збирали один раз на тиждень, промивали від факторів та інкубували впродовж 4 год. з 25нг/мл рІNPROL або тільки з живильним середовищем для контролю. Після інкубування клітини промивали та висівали у концентрації 10⁵клітин/мл до метилцелюлози, до складу якої було включено 30% FCS та 10нг/мл IL-7. Дані 3 тижнів подано на Фіг.13. Кількість великих колоній перед-B у контролі була змінною. Вона підвищувалась з часом, але передінкубування з INPROL завжди стимулювало підвищення росту колоній у 4-8 разів над контрольним рівнем. Це демонструє імуностимуляторну властивість INPROL, яка може бути придатною при коректуванні імунодефіцитних станів та при підвищенні необхідних імунних реакцій, наприклад, на вакцинавання.

Приклад 11: INPROL поліпшує репопуляційну здатність стовбурових клітин -Клітини, які започат-

ковують довгоіснуючі культури клітин від пацієнта з CML

Хронічний мієлолейкоз (CML) є летальним злостью захворюванням гемопоетичних стовбурових клітин. Лікуванням CML у хронічній фазі шляхом застосування одного хімотерапевтичного засобу, комбінованої хімотерапії, спленектомії або опромінення селезінки можна контролювати клінічні ознаки та симптоми, однак це не забезпечує суттєвого подовження виживаності. В міру того як CML прогресує від хронічної до прискореної стадії, стандартна терапія втрачає свою ефективність. На сьогоднішній день трансплантування кісткового мозку (BMT) є єдиним відомим способом лікування CML. Терапевтичні заходи з BMT від неспорідненого донора ускладнюються внаслідок проблем із гістосумісністю. Менше 40% у всіх останніх відношеннях придатних пацієнтів з CML буде мати прийнятний спорідненого донора; внаслідок цього перевага віддається автотрансплантуванню. Кондиціювання автотрансплантату кісткового мозку для впливання разом зі здатністю до вибирання нелейкозних (Ph-негативних) мієлоїдних клітин-попередників від Ph-позитивних пацієнтів, які було вирощено у довгоіснуючих культурах (LTC), вказують на потенціал автологічних джерел нормальних стовбурових клітин щодо забезпечення агресивної та ефективною терапії CML.

У контексті BMT гемопоетична стовбурова клітина може визначатись як така, що має здатність до утворення зрілих клітин крові впродовж значних періодів часу. Нами було використано систему LTC людини, розроблену К. Івзом (C. Eaves) та А. Івзом (A. Eaves), як для кількісного визначення стовбурових клітин, так і як засіб маніпулювання ними для терапевтичного використання. Це включає висівання клітин на попередньо одержаний опромінений адгезивний шар клітин кісткового мозку людини; після цього ці культури підтримуються впродовж 5 тижнів. Кінцевою точкою є загальний вміст клоногенних клітин (адгезивні+неадгезивні) культур, зібраних у кінці цього часового періоду. Вихід клоногенних клітин за цих умов є лінійно зв'язаним із кількістю клітин-попередників (клітин, які започатковують довгоіснуючі культури клітин (LTC-IC)), які було додано на початку; середній вихід від окремих LTC-IC людини дорівнює 4 клоногенним клітинам-попередникам на LTC-IC. Раніше було показано, що у разі, коли клітини кісткового мозку пацієнтів із CML опиняються у подібних умовах, кількість лейкозних (Ph-позитивних) клоногенних клітин різко зменшується. Внаслідок кількісного визначення залишкових нормальних LTC-IC у пацієнтів із CML можливо відібрати ті з них, для яких виявиться корисною інтенсивна терапія, підсилена трансплантуванням культивованих автотрансплантатів [Filipic (Phillips) та інші, Bone Marrow Transplantation 8: 477-487, 1991].

Описану далі процедуру було використано для перевірки впливу INPROL на кількість клоногенних клітин (LTC-IC) серед трансплантатних клітин кісткового мозку, які було одержано з периферичної крові пацієнтів із CML.

Культури закладались, як довгоіснуючі на попередньо опромінєній стромі. Периферичну кров

здорового донора використовували, як контроль. Клітини периферичної крові пацієнтів із CML попередньо інкубували з або без rINPROL (25нг/мл) впродовж 4 год., промивали і вмішували до системи LTC-IC на 5 тижнів для визначення контрольної кількості LTC-IC. Для експериментів інші, паралельні культури підтримувались впродовж 10 днів. Суміш адгезивних та неадгезивних клітин із культур, які вирощувались впродовж 10 днів, попередньо інкубували з або без rINPROL і переносили на попередньо одержані фідери на 8 додаткових тижнів. Кількість LTC-IC з кожної експериментальної культури визначали шляхом висівання як адгезивних, так і неадгезивних клітин на метилцелюлозу з відповідними факторами росту (компанія Terry Fox Laboratories, Ванкувер, Канада) та підрахування загальної одержаної кількості колонієтворних клітин. Показники LTC-IC, одержані за допомогою цієї процедури, виводили з оцінки загального вмісту клоногенних клітин (CFC) за допомогою наведеної формули:

Кількість LTC-IC=кількості CFC/4

Дані, подані на Фіг.14, показують відсутність втрати LTC-IC впродовж перших 10 днів культивування, розпочатого з клітин кісткового мозку здорового донора, і приблизно 30% від початкової кількості LTC-IC було ще присутнім після 5 тижнів культивування. Кількість LTC-IC пацієнта з CML різко зменшилась (приблизно до 8%) впродовж 10-денного періоду і не відновлювалась під час додаткового інкубування, у той час як попереднє інкубування клітин з INPROL підвищило рівень LTC-IC до 30% від вихідної кількості, і цей рівень підтримувався впродовж 8 тижнів.

До важливих у клінічному відношенні застосувань INPROL, які прогнозувались наведеними попередніми даними, належить його використання у стратегіях вибіркового поліпшення вмісту нормальних стовбурових клітин свіжих або культивованих трансплантатів кісткового мозку, стратегіях підсилення рекрутингу залишкових нормальних стовбурових клітин *in vivo*, а також у протоколах переносу нового генетичного матеріалу до стовбурових клітин кісткового мозку людини для подальшого трансплантування пацієнтам.

Приклад 12A: Спосіб виділення імуноактивного інгібітора проліферації стовбурових клітин із препаратів кісткового мозку

Кістковий мозок виділяли з свинячих ребер. Ребра свинячих туш відокремлювали і очищали від м'язових волокон та жиру, розрізали на шматки і кістковий мозок екстрагували за допомогою гідравлічного преса, виготовленого компанією Biophyzpribor. Клітини кісткового мозку відокремлювали центрифугуванням на центрифугі K-70 при 2000об/хв. впродовж 20хв. Після цього супернатант екстракту з успіхом піддавали ультрафільтруванню через мембрани Amicon USA XM-100, PM30, PM-50. За даними електрофоретичного аналізу, головною складовою частиною згаданого продукту є альбумін (див. Фіг.1).

Біохімічне очищення

Екстракт кісткового мозку та білкові компоненти фракцій було аналізовано на кожному етапі очищення засобами гель-електрофорезу у 10%

поліакриламід, до складу якого входило 0,1% додецилсульфату натрію. Перед нанесенням на гель до зразків, які інкубували впродовж 5хв. при 70°C, додавали до 7% додецилсульфату натрію та до 0,5-1% меркаптоетанолу.

Електрофорез здійснювали на 20см блоці гелю впродовж 5год. Після цього гель фарбували 0,25% фарбника Кумасі СВВС 250 у суміші етанол:вода:оцтова кислота 5:5:1 впродовж 1год. при 20°C і промивали у декількох змінах 7% оцтової

кислоти. Активність одержаного продукту визначали за методом пригнічення проліферації гемопое-тичних стовбурових клітин (CFU-S). Докладний опис згаданого методу наведено далі.

Етап 1. Очищення шляхом осадження сульфатом амонію

Активний продукт очищали шляхом осадження сульфатом амонію при 25% із насиченням до 40-80%, які вибирали, виходячи з результатів, наведених у Таблиці 5.

Таблиця 5

Насичення (%)	0-40	40-60	60-80	80-100
Активність (%)	37,2-35,4=1,8%	37,2-1,8=35,4%	37,2-12,8=24,4%	37,2-26,1=11,1%

Кількість згаданого препарату, яку було використано для випробування після кожного етапу очищення, визначали у відповідності до рівня очищення та еквівалента дози 2×10^{-2} мг вихідного продукту. Активність визначали за формулою:

% зміни = %Sa - %Sb

де %Sa є %S у контролі

%Sb є %S після інкубування з експериментальною фракцією.

Згадану фракцію знесолювали для зменшення концентрації сульфату амонію у 20 разів перед кожним випробуванням активності та перед кожним подальшим етапом очищення.

Етап 2. Неочищений інгібітор з Етапу 1 застосовують після знесолювання та фракціонують за

допомогою іонообмінної хроматографії (у даному випадку, діетиламіноетилцелюлоза (DEAE 23)) з подальшим елююванням градієнтом натрійацетатного буфера (pH6,0).

Активні фракції інгібітора елюювались між 3-5мМ.

Об'єм колонки дорівнював 1мл; швидкість елюювання дорівнювала 4мл/год. Детектування здійснювали за допомогою хроматографа Millichrome на 230нм та 280нм. Фракцію 1 (див. Фіг.2), яка демонструвала найвищу активність, виділили та елюювали 5мМ натрійацетатним буфером (див. Таблицю 6).

Таблиця 6

Фракція	1	2	3	4	5
Активність	46,3-0=46,3%	46,3-14,1=32,2%	46,3-42,1=4,2%	46,3-19,6=26,7%	46,3-45,1=1,2%

Дані електрофорезу вказують на те, що головний білковий забруднювач - альбумін (див. Фіг.3) видаляється з цієї фракції, наслідком чого є додаткове чотирикратне очищення.

Етап 3. Частково очищений інгібітор з Етапу 2 вносять безпосередньо до колонки G-75 Sephadex.

Об'єм колонки дорівнює 20мл (20×1), швидкість елюювання дорівнює 2мл/год. Для елюювання застосовують буфер 50мМ NaCl, 10мМ Трис-HCl-буфер, pH7,5. Детектування здійснювали за допомогою хроматографа Millichrome на 230нм та 280нм. Було виділено фракцію 5, яка мала найвищу активність.

Таблиця 7

Фракція	1	2	3	4	5
Активність	42,2-19,1=23,1%	42,2-35,2=7,0%	42,2-21,5=20,7%	42,2-38,8=3,4%	42,2-0=42,2%

Етап 4. Хроматографування зі зворотною фазою (Pharmacia FPLC System) з використанням колонок Pro-REC здійснювали на матриці Ultrasfera. Білок елюювали за допомогою 0,1% трифтороцтової кислоти у градієнті ацетонітрилу.

За результатами аналізу електрофореграми (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) гомогенність продукту, при молекулярній масі 16-17кД, дорівнювала 90% (див. Фіг.6). Згаданий результат подано на Фіг.4. Активність визначається на фракції 5. Кінцевий вихід продукту становив 5%. Як наслідок, загальна кількість білка з молекулярною масою 16кД після очищення дорівнювала 650нг/мл вихідного продукту. Під час процесу очищення згаданий продукт було піддано тепловому інкубуванню при

70°C впродовж декількох хвилин, однак втрати біологічної активності виявлено не було.

Приклад 12В: Альтернативний спосіб виділення більших кількостей INPROL

Початкове виділення

Ребра свіжих свинячих туш очищали від м'язових волокон та жиру, розрізали на шматки і просочували фізрозчином, забуференим фосфатом у співвідношенні 1:1 (у відношенні маси до об'єму). Одержану суміш подрібнювали за допомогою гідравлічного преса для відокремлення кісткового мозку від твердого кісткового матеріалу.

Суспензію клітин кісткового мозку збирали і відфільтровували від твердих частинок через чотири шари марлі. Фільтрат інкубували при 56°C впродовж 40хв., після чого охолоджували на льо-

дній бані до 4°C. Одержаний осад видаляли центрифугуванням при 10000g впродовж 30хв. при 4°C і позбавлялись від нього.

Просвітлений супернатант додавали крапля за краплею впродовж 30хв. до 10 об'ємів перемішаного ацетону, який мав температуру таяння льоду, до складу якого входив 1% (об'єми.) концентрованої хлористоводневої кислоти. Одержану суміш витримували при 4°C впродовж 16год. для повного утворення осаду. Після цього згаданий осад гранулювали при 20000g впродовж 30хв. при 4°C. Цей гранулят промивали холодним ацетоном і висушували.

Очищення засобами вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC)

Згаданий гранулят розчиняли у буфері А HPLC для елюювання, до складу якого входило 5% ацетонітрилу (MeCN) та 0,1% трифтороцтової кислоти (TFA), до одержання кінцевої концентрації білка 8-10мг/мл. Цей розчин (0,5-0,6мл) вносили до хроматографувальної колонки (250×4,6мм), заповненої Polisiil ODS-300 (10мкм) і урівноважували за допомогою того самого буфера А.

Елюювання здійснювали градієнтом буфера В (90% MeCN, 0,1% TFA) у буфері А зі швидкістю 1мл/хв. за такою програмою:

Час, хв.	%В
0	0
4	0
5	25
25	90

Було введено додатковий етап (100% В впродовж 5хв.) для промивки колонки перед повторним врівноваженням. Після цього колонку знову урівноважували для повернення її до вихідного стану та для введення наступної порції білкового розчину. Типову хроматограму подано на Фіг.5.

Під час розподілу елюент колонки контролюється на 280нм для виявлення білкових піків. Фракції, до складу яких входить білковий матеріал, збирають, розподілені піки об'єднують та випарюють на роторному випарювачі при 30°C до сухості. Одержані залишки розчиняють у дистильованій воді, піддають випробуванню на біоактивність та SDS-PAGE (14% гель, відновлювальні умови). Пік, який вміщує активний матеріал, елюють між 70% та 80% буфера В; за даними SDS-PAGE, до його складу входить головна смуга білка 16кД та сліди білків, які переміщуються з більшою швидкістю.

Аналіз матеріалу, одержаного при збиранні тільки другого головного піка HPLC, подано на Фіг.15 (А та С). Матеріал, до складу якого входять обидва піки (наприклад, Фіг.5), позначається у цьому описі як pINPROL Препарат 1; матеріали, до складу яких входить лише другий пік, позначаються у цьому описі як pINPROL Препарат 2. 500мкг згаданого активного очищеного pINPROL Препарату 2 вносили до колонки зі зворотною фазою C4 (компанія Vydac) і елюювали за допомогою лінійного градієнта 595% ацетонітрилу у 0,1% трифтороцтової кислоти. Матеріал елюювався у вигляді окремого піка у 53% ацетонітрилу (Фіг.15А). У разі прогонки 250мкг MIP-1α (компанія R & D Systems) за ідентичних умов, він, однак, елюювався у 43,9% ацетонітрилу (Фіг.15В - зверніть увагу на те, що

піки, які попереджають 14% ацетонітрилу, є артефактами і обумовлені бульбашками повітря у детекторі). Таким чином, природний INPROL є значно гідрофобнішим, ніж MIP-1α за тих самих умов. Відомо, що TGFβ елюється при нижчих концентраціях, ніж ті, які спостерігаються у разі pINPROL за тих самих умов [Міазоно (Miyazono) та інші, J. Biol. Chem. 263: 6407-15, 1988].

Гель елююваного pINPROL матеріалу зображено на Фіг.15С. Смуга 1 - неочищений матеріал, Смуга 2 - маркери молекулярної маси та Смуга 3 - очищений матеріал. Існує дві головні смуги, одна приблизно на 14кД і ще одна приблизно на 35кД. Гадають, що смуга 35кД є полімерною формою смуги 14кД.

Приклад 13А. До складу активних препаратів INPROL входить бета-ланцюг гемоглобіну

PINPROL було одержано, як показано на Фіг.5 (тобто pINPROL Препарат 1 (див. Приклад 12В)). Матеріал піддавали SDS-PAGE і переносили до нітроцелюлози за стандартною методикою. Згаданий матеріал було піддано N-кінцевому секвенуванню за допомогою білкового секвенатора ABI477A з аналізатором 120A Online PTH-AA за стандартною методикою. Було одержано таку N-кінцеву послідовність:

VHLSAEEKEAVLGLWGKVNDEV.

За даними комп'ютерного пошуку білкових баз даних виявилось, що ця послідовність була ідентичною N-кінцевій послідовності бета-ланцюга свинячого гемоглобіну (порівняй Фіг.16С).

Приклад 13В. До складу активних препаратів INPROL входить бета-ланцюг гемоглобіну

Як показано на Фіг.15С, білок, очищений після збирання другого головного піка, який зображено на Фіг.5 (тобто pINPROL Препарат 2), дав дві головні смуги, які відповідають молекулярним масам приблизно 15кД та 30кД, а також декілька другорядних смуг. SDS-PAGE гелі було перенесено до нітроцелюлози за стандартною методикою; окремі смуги було вирізано та піддано N-кінцевому секвенуванню, як у Прикладі 13А. Для смуги 15кД було одержано таку N-кінцеву послідовність:

VLSAADKANVKAAGKVGQG.

Смугу 30кД було піддано обмеженому протеолітичному розщепленню; одержали таку внутрішню послідовність:

**FPHFNLSHGSDQVK

Перша послідовність є ідентичною N-кінцевій послідовності альфа-ланцюга свинячого гемоглобіну, у той час як друга послідовність є ідентичною залишкам 43-56 альфа-ланцюга свинячого гемоглобіну (див. Фіг.16С для порівняння послідовності альфа- та бета-ланцюгів чоловічого, мишачого та свинячого гемоглобіну). Повторне секвенування цих смуг, а також деяких із другорядних смуг, постійно давало ділянки послідовності альфа-ланцюга гемоглобіну. Таким чином, різні смуги, наведені на Фіг.15С, зображають фрагменти або агрегати альфа-ланцюга свинячого гемоглобіну.

Приклад 13С: Додаткове визначення характеристик свинячого INPROL

Для додаткового порівняння pINPROL зі свинячим гемоглобіном, від компанії Sigma Chemical Company одержали двічі кристалізований свиня-

чий гемоглобін та піддали його HPLC зі зворотною фазою, як описано у Прикладі 12В для Фіг.15. Як показано на Фіг.17, HPLC хроматограма інтактного гемоглобіну є подібною до хроматограми rINPROL Препарату 1. Додатково, у разі безпосереднього порівняння, хроматограма rINPROL Препарату 2, яку зображено на Фіг.17А (тобто той, що був одержаний з другого піка Фіг.5), перекривається з хроматограмою двох інших піків свинячого гемоглобіну (Фіг.17В), з часом утримання 52,51хв. та 52,25хв. для головних піків, відповідно. Слід звернути увагу на те, що гем сумісно мігрує з першим головним піком у гемоглобіні, у цьому випадку на 49,153хв.; таким чином, гем є складовою rINPROL Препарату 1, а не Препарату 2. Це підтверджується відсутністю поглинання цього rINPROL препарату на 575нм, тобто на довжині хвилі, яка є діагностичною для присутності гему.

Запрогнозовані молекулярні маси альфа- та бета-ланцюгів свинячого гемоглобіну дорівнюють 15038Да та 16034Да, відповідно. Як видно на SDS-PAGE хроматограмі на Фіг.18, перші два піки складаються з ланцюга більшої молекулярної маси, у той час як два других складаються з ланцюга меншої молекулярної маси. Таким чином, перші два піки зображають бета-ланцюг гемоглобіну, а два других піки зображають альфа-ланцюг гемоглобіну.

Було проведено додаткові розподіли свинячого гемоглобіну із застосуванням градієнта елювання широкого діапазону (Фіг.21). N-кінцевий аналіз цих піків продемонстрував, що перший пік є альфа-ланцюгом, а другий - бета-ланцюгом свинячого гемоглобіну. Результати біопробі підтверджують, що обидва ізольовані ланцюги гемоглобіну є біологічно активними (наприклад, Приклади 14 та 15).

З метою додаткового порівняння rINPROL Препарату 2 та бета-ланцюга гемоглобіну, було проведено двовимірний високовольтний електрофорез (Фіг.19). У першому вимірі, ізоелектричне фокусування здійснювали у скляних пробірках за допомогою 2% амфолінів, рН4-8, при 9600В-год. Тропоміозин (молекулярна маса 33кД, рІ 5,2) було використано як внутрішній стандарт; його позицію на кінцевому двовимірному блоці гелю позначено стрілкою. Гель у пробірках було урівноважено у буфері з подальшим перенесенням на концентруючий гель, після чого нанесено на блок 12,5% акриламідного гелю. Електрофорез у гелевому блоці у присутності додецилсульфату натрію проводили впродовж 4год. при 12,5мА/гель. Гелеві блоки забарвлювались сріблом та висушувались.

Під час порівняння двовимірних високовольтних електрофоретичних профілей було встановлено, що тільки одна або дві другорядні плями відрізнялись між бета-ланцюгом гемоглобіну, який було очищено засобами HPLC, та rINPROL Препаратом 2. Результати вестерн-блотингу із застосуванням антисвинячих гемоглобінових антитіл, та одновимірною або двовимірною високовольтною електрофорезу, підтвердили присутність бета-ланцюга гемоглобіну у препараті. Таким чином, активний rINPROL Препарат 2, який було одержано

відповідно до Прикладу 12В, являє собою по суті бета-ланцюг свинячого гемоглобіну.

Приклад 14: Альфа-ланцюг гемоглобіну, бета-ланцюг гемоглобіну або інтактний гемоглобін демонструють пригнічувальну активність відносно стовбурових клітин

З метою підтвердження того, що бета-ланцюг гемоглобіну має INPROL активність, було проведено пробу на самовбивство з використанням кісткового мозку мишей, оброблених тестостероном, за методикою, опис якої наведено у Прикладі 1 та із застосуванням матеріалу, очищеного, як описано у Прикладі 12В. Як показано у Таблиці 8, було умертвлено 15% нормальних клітин мишачого кісткового мозку, у протилежність 36% у тварин, оброблених тестостероном. Як і очікувалось, це вказує на те, що обробка тестостероном підвищує відсоток клітин у стані мітотичної активності (що, таким чином, робить їх більш сприйнятливими до умертвння - див., наприклад, Приклад 1). У гострому контрасті, клітини тварин, оброблених тестостероном, які було інкубовано з rINPROL або з бета-ланцюгом очищеного гемоглобіну (40нг/мл), продемонстрували різке зменшення відсотка клітин у стані мітотичної активності (від 36% до 0% та 7%, відповідно). Підвищена доза (200нг) була менш ефективною для обох білків. Як позитивний контроль, попередньо охарактеризований інгібітор стовбурових клітин MIP-1 α зменшував рівень мітотичної активності до 13%.

Подібну пробу можна здійснити *in vitro* з використанням статусу мітотичної активності CFU-MIX замість CFU-S. Пробу ставлять, як було описано вище для проби на CFU-S, за виключенням того, що цитозинарабінозид (AraC, 30мкг/мл) використовують як циклоспецифічний токсичний агент, замість високої дози тимідину, міченого радіоактивним тритієм [див. Б.1. Лорд (B.I. Lord), у Hemopoiesis-A Practical Approach. Н.Г. Теста (N.G. Testa) та Г. Муліно (G. Molineux) (Видавці), IRL Press 1993; Прагнел та інші, у Culture of Hematopoietic Cells. Р.І. Фрешні (R.I. Freshney), І.Б. Прагнел (I.B. Pragnell), М.Г. Фрешні (M.G. Freshney) (Видавці), Wiley Liss 1994] та лінію мишей з високим рівнем мітотичної активності (Balb/c) замість оброблених тестостероном мишей лінії BDF₁. Як показано у таблиці 9, активними у цій пробі є як високоочищений бета-ланцюг, так і високоочищений альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну. Необхідно звернути увагу на те, що у цій пробі рівні мітотичної активності клітин, оброблених rINPROL, подеколи мають від'ємні номери, які вказують на те, що пул, який було піддано обробці AraC, має навіть більше колоній, ніж пул, який обробці не піддавався.

Як описано у Прикладі 2, rINPROL пригнічує проліферацію лінії мишачих стовбурових клітин FDCEP-MIX у пробі на включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм. На Фіг.20 показано, що у цій пробі активними є як альфа-, так і бета-ланцюги очищеного гемоглобіну, причому пригнічення спостерігається при дозі <2нг/мл.

Вищезазначене свідчить про те, що бета-ланцюг свинячого гемоглобіну демонструє INPROL активність. Інші дані (див., наприклад, Таблицю 9,

Фіг.20) демонструють, що виділений альфа-ланцюг, а також інтактний гемоглобін, також є активними як інгібітори стовбурових клітин. До активних препаратів належать також суміші альфа- та бета-ланцюгів (див., наприклад, Фіг.5).

Спостереження відносно активності виділеного альфа-ланцюга гемоглобіну та/або виділеного бета-ланцюга гемоглобіну свідчать про те, що активні продукти, опис яких наведено, не потребують об'ємної інтактної структури гемоглобіну. Фрагменти альфа- та бета-ланцюга також є активними, як інгібітори та стимулятори стовбурових клітин.

Таблиця 8

Обробка	% умертвіння
NBM ¹	15
TPBM ²	36
pINPROL 200нг/мл	23
40нг/мл	0
Hbg ³ 200нг/мл	25
40нг/мл	7
MIP-1α 200нг/мл	13

¹NBM=нормальний кістковий мозок

²TPBM=кістковий мозок мишей, оброблених тестостероном

³Hbg=бета-ланцюг свинячого гемоглобіну, очищений засобами HPLC зі зворотною фазою C4 (одержаний з двічі кристалізованого свинячого гемоглобіну)

Таблиця 9

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	43
Альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну ²	-4
Бета-ланцюг свинячого гемоглобіну ²	-14

¹ Контроль - кістковий мозок мишей лінії Baib/c

²100нг/мл (Очищено, як на Фіг.21)

Приклад 15: Очищений INPROL, очищений альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну або очищений бета-ланцюг свинячого гемоглобіну є активними in vivo

З метою перевірки здатності ланцюгів очищеного свинячого гемоглобіну діяти in vivo, мишам лінії BDF₁ було впроркнuto тестостерону пропіонат, як описано у Прикладі 1. Через 24год. мишам внутрішньовенно було введено по 500нг pINPROL, альфа-ланцюга свинячого гемоглобіну (очищеного з еритроцитів периферичної крові, як на Фіг.21), бета-ланцюга свинячого гемоглобіну (очищеного з еритроцитів периферичної крові, як на Фіг.21) або еквівалентний об'єм носія. Через 48год. від кожної миші було зібрано кістковий мозок, і проведено пробу на CFU-MIX, як описано у Прикладі 14. Як показано у Таблиці 10, pINPROL, альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну та бета-ланцюг свинячого гемоглобіну були активними in vivo і забезпечували зниження відсотка CFU-MIX у стані мітотичної активності до базисних рівнів.

Таблиця 10

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	45
pINPROL ²	5
Альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну ²	5
Бета-ланцюг свинячого гемоглобіну ²	-5
Базисний ³	4

¹Контроль - кістковий мозок мишей лінії BDF₁, оброблених тестостероном

²100нг/мл

³Кістковий мозок мишей лінії BDF₁, які не оброблялись тестостероном

Приклад 16: Альфа-ланцюг очищеного гемоглобіну людини, біотинільований альфа-ланцюг гемоглобіну людини, біотинільований бета-ланцюг гемоглобіну людини, гамма-ланцюг гемоглобіну людини та дельта-ланцюг гемоглобіну людини демонструють пригнічувальну активність відносно стовбурових клітин in vitro

Гемоглобін людини було одержано від компанії Sigma Chemical Corporation або виділено стандартними способами з периферичної крові дорослої людини або з крові пупкового канатика. Окремі ланцюги було виділено засобами HPLC зі зворотною фазою подібним чином, як це описано вище для альфа- та бета-ланцюгів свинячого гемоглобіну [див. Б. Мазала (B. Masala) та Л. Манка (L. Manca), Methods in Enzymology, том 231, стор.21-44, 1994]. Було одержано очищені альфа-, бета-, гамма- та дельта-ланцюги. З метою одержання біотинільованих альфа- та бета-ланцюгів, 1мг гемоглобіну дорослої людини обробляли 37мкг біотину NHS LC (компанія Pierce), і згадані ланцюги відокремлювали засобами HPLC зі зворотною фазою, як описано перед тим.

Як показано у Таблицях 11, 12 та 13, альфа-ланцюг очищеного гемоглобіну людини, біотинільований альфа-ланцюг гемоглобіну людини, біотинільований бета-ланцюг гемоглобіну людини, гамма-ланцюг гемоглобіну людини та дельта-ланцюг гемоглобіну людини є активними у пробі на мітотичну активність CFU-MIX.

Таблиця 11

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	49
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини ²	-1
Бета-ланцюг гемоглобіну людини ²	41
Гамма-ланцюг гемоглобіну людини ²	-63

¹Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

²100нг/мл

Таблиця 12

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	47
Гамма-ланцюг гемоглобіну людини ²	12
Дельта-ланцюг гемоглобіну людини ²	-4

¹Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

²100нг/мл

Таблиця 13

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	68
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини ²	19
Біотинільований альфа-ланцюг гемоглобіну людини ²	7
Бета-ланцюг гемоглобіну людини ²	55
Біотинільований бета-ланцюг гемоглобіну людини ²	25

¹Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

²100нг/мл

Приклад 17: Альфа-ланцюг очищеного гемоглобіну людини, димер альфа-бета-ланцюгів або гемоглобін є активними in vivo

Альфа-ланцюг очищеного гемоглобіну людини, димер альфа-бета-ланцюгів або гемоглобін випробувались у пробі in vivo, як описано у Прикладі 15. Як показано у Таблиці 14, кожен з них був активним при концентрації 500нг/мишу.

Таблиця 14

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	49
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини	-22
Димер альфа-бета-ланцюгів гемоглобіну людини	14
Гемоглобін людини	-31

¹Контроль - кістковий мозок мишей лінії BDF₁, оброблених тестостероном

Приклад 18: Свинячий INPROL є активним відносно моноклеарних клітин людини або CP34⁺ клітин крові пупкового канатика in vitro

З метою дослідження здатності очищеного INPROL свинячого кісткового мозку впливати на мітотичний цикл клітин-попередників людини, були одержані клітини крові пупкового канатика. Було використано або загальну фракцію моноклеарних клітин, одержану після розподілу на колонці Ficoll, або CO34⁺ фракцію, яку було одержано після фракціонування на анти-СБ34 афінних колонках (компанія CellPro Inc.). Клітини було інкубовано впродовж 48 год. in vitro у присутності інтерлейкіну 3 (IL-3) та фактора стовбурових клітин (SCF) (100нг/мл кожного) для забезпечення мітотичної активності первинних стовбурових клітин. Після згаданого попереднього інкубування, проби на мітотичну активність було проведено, як описано у Прикладі 14 для мишей, за виключенням того, що на 18 день після висівання підраховували CFU-GEMM (замість CFU-MIX). Як показано у Таблиці 15, свинячий INPROL пригнічував мітотичну активність CFU-GEMM як об'ємних моноклеарних клітин, так і CO34⁺ фракції.

Таблиця 15

Обробка	% умертвіння
Моноклеарні клітини	93
Контроль pINPROL ¹	16
СБ34 ⁺ клітини	41
Контроль pINPROL ¹	21

¹100нг/мл

Приклад 19: Альфа-ланцюг очищеного гемоглобіну людини є активним відносно CFU-GEMM людини

Були одержані моноклеарні клітини крові пупкового канатика людини, які інкубували з IL-3 та SCF (фактор стовбурових клітин) і використали у пробі на мітотичну активність, як описано у Прикладі 18. Як показано у Таблиці 16, активними у цій пробі були як свинячий INPROL, який було очищено з кісткового мозку, так і альфа-ланцюг гемоглобіну людини, очищений з периферичної крові.

Таблиця 16

Обробка	% умертвіння
Контроль	100
pINPROL ¹	-6
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини ¹	-23

¹100нг/мл

Приклад 20: Активними є пептиди, одержані з альфа-ланцюга гемоглобіну людини та з послідовностей бета-ланцюга гемоглобіну людини

З метою ідентифікування активних пептидних послідовностей об'ємну структуру міоглобіну (який не має активності у цій пробі) накладали, за допомогою програми комп'ютерного моделювання, на об'ємну структуру нативного альфа-ланцюга, присутнього у гемоглобіні дорослої людини. Було ідентифіковано два пептиди (які представляють амінокислоти 43-55 та 64-82, які є ділянками, які структурно відрізняються від міоглобіну у об'ємному просторі), як такі, що мають активність у пробі на мітотичну активність CFU-MIX. Для більш тісного наближення до петлі, яку було знайдено у нативному альфа-ланцюзі, синтезували також циклічну похідну пептиду 43-55 (с43-55) (з використанням дисульфідного зв'язку), яка виявилась активною.

Послідовність цих пептидів виглядає таким чином:

43-55 Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val

("Пептид 43-55")

с(43-55) Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys

(де два Cys залишки мають дисульфідний зв'язок) ("Циклічний пептид 43-55") 64-82 Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala ("Пептид 64-82")

Випробували дві геморфінові послідовності, геморфін 10 (амінокислоти 32-41 послідовності

бета-ланцюга) та геморфін 7 (амінокислоти 33-40), які виявились активними.

Згадані послідовності виглядають таким чином:

Геморфін 10 Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe

Геморфін 7 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg

З метою перевірки активності цих послідовностей, пробу на мітотичну активність CFU-MIX було проведено, як описано у Прикладі 14. Як показано у Таблицях 17-19, усі згадані пептиди у цій пробі продемонстрували свою активність.

Таблиця 17

Обробка	% умертвіння
Контроль	47
pINPROL ¹	0
Пептид (43-55) 100нг/мл	2
10нг/мл	18
1нг/мл	11

¹100нг/мл

Таблиця 18

Обробка	% умертвіння
Контроль	43
Пептид (43-55) ¹	5
Пептид (64-82) ¹	9
Геморфін 10 ¹	1
Геморфін 7 ¹	0

¹Усі пептиди було випробувано у дозі 100нг/мл

Таблиця 19

Обробка	% умертвіння
Контроль	47
Циклічний пептид 43-55 ¹	0

¹Випробувано у дозі 100нг/мл

Приклад 21: Фрагмент пептиду, який було одержано з альфа-ланцюга гемоглобіну людини розщепленням за допомогою мурашиної кислоти, є активним

Альфа-ланцюг гемоглобіну людини має сайт розщеплення мурашиною кислотою між амінокислотними позиціями 94 та 95 (Asp-Pro). Розщеплення здійснювали шляхом інкубування альфа-ланцюга очищеного гемоглобіну людини (як у Прикладі 16) у концентрації 1мг/мл у 70% мурашиній кислоті впродовж 72год. при 37°C. Фрагмент 1-94 було очищено від нерозщепленого альфа-ланцюга та фрагмента 95-141 засобами HPLC зі зворотною фазою, як у Прикладі 16; фракції визначались за допомогою SDS-PAGE (як у Прикладі 22). Ідентичність очищеного білкового фрагмента 1-94 було підтверджено засобами електророзпорощувальної іонізаційної мас-спектрометрії.

З метою визначення пригнічувальної активності цього фрагмента відносно стовбурових клітин

було використано пробу на мітотичну активність CFU-MIX, як у Прикладі 14:

Таблиця 20

Обробка	% умертвіння
Контроль ¹	50
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини ²	12
Фрагмент 1-94 ³	0

¹Кістковий мозок мишей лінії Balb/c

²Альфа-ланцюг очищеного нерекомбінантного гемоглобіну людини, як у Прикладі 16 (100нг/мл)

³Очищений, розщеплений мурашиною кислотою білок, як у наведеному Прикладі (100нг/мл)

Приклад 22: Експресія альфа-ланцюга гемоглобіну людини, поліпептиду 1-141, поліпептиду 1-97, пептиду 43-55 та пептиду c(43-55) у E. coli як злитих білків убіквітину

Гени для пептидів 43-55 ("p13") та c43-55 ("p15") (як у Прикладі 20) було синтезовано шляхом ренатурації відповідних олігонуклеотидів, відповідно до оптимального використання кодону E. coli [Андерсен (Anderssen) та Карленд (Kurland), Micro. Reviews 54: 198-210, 1990]. Ген для альфа-ланцюга інтактного гемоглобіну людини ("p141") було одержано програмуванням набору олігонуклеотидів для ампліфікації за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) з пулу кДНК кісткового мозку людини (компанія Clontech, Пало Альто, Каліфорнія). Ген для фрагмента 1-97 ("p1-97") було одержано PCR ампліфікацією плазмиди, до складу якої входить ген p141, після відповідного субклонування.

Вищезгадані гени було експресовано як злиті білки убіквітину [див. патенти США № 5132213, №5196321 та №5391490 та PCT WO 91/17245]. Штам-хазяїн, E. coli DH5α F'IQ (компанія Life Technologies, Inc., Гейтерсбург, Мериленд), було трансформовано вектором експресії убіквітину, pDSUb, до складу якого входить відповідно синтезований ген (див. вище). pDSUb є похідним pDS78/RBSII, який експресує убіквітін людини (Фіг.22A) [(Гочалі (Hochuli) та інші, Biotechnology 6: 1321-5, 1988). Летчер (Loetscher) та інші (JBC 266: 11213-11220, 1991)] модифікували pDS78/RBSII вирізуванням послідовностей хлорамфеніколацетильтрансферази (CAT) з плазмиди Гочалі та повторним лігуванням згаданої плазмиди (Фіг.22B). Синтетичний ген убіквітину було сконструйовано парною ренатурацією синтетичних олігонуклеотидів, оброблених кіназою, які кодуєть убіквітін людини, із застосуванням кодону, оптимізованого для бактеріальної експресії. Після цього було сконструйовано pDSUb шляхом вставки синтетичного гена убіквітину, який складався із зібраних олігонуклеотидів, до дефосфорильованого гідролізату Bat HI-BglII Кленова дериватизованого pDS78/RBSII. Було показано, що утворена плазміда, pDSUb (Фіг.22C), експресувала убіквітін у E. coli на високому рівні.

Плазмиду, до складу якої входив p97, та плазмиду, до складу якої входив p141, було сконструйовано вставкою продуктів PCR, гідролізованих Afl

II-Pst I, які кодують білок p97 або білок p141 та ділянку з'єднання злиттям при прямому клонуванні, до rDSUb, яку було гідролізовано Afl II та Pst I. Подібним чином, плазмиду, до складу якої входив p13, та плазмиду, до складу якої входив p15, було сконструйовано вставкою оброблених кіназою та ренатурованих олігонуклеотидів, які несуть відповідні "липкі" кінці та кодують пептид та ділянку з'єднання злиттям, до rDSUb, гідролізованої Afl II-Pst I.

Трансформанти відбирали за допомогою 100мкг/мл ампіциліну, 5мкг/мл неоміцину; колонії з'являлись через два дні при 30°C. Трансформанти перевірялись за допомогою PCR на інсерційному сайті. Після цього колонії, які включали вставку відповідного розміру, відбирали для експресування злитого білка відповідного розміру засобами SDS-PAGE (див. далі). Злиття убіквітину надпродуковувалось доданням трансформувального фактора IPTG, який титрує репресор lac, шляхом видалення його з промотору rDSUb (до складу DH5 α F'IQ входить активований ген lacIq на факторі F', який вибирають за допомогою 10мкг/мл неоміцину).

З клонів, які демонстрували надпродукований індукований злитий білок убіквітину, було одержано плазмідну ДНК, яку секвенували за допомогою методу дидеоксидування із застосуванням набору Sequenase Version 2.0 kit (компанія United States Biochemical). Після цього позитивні клони заморожували і зберігали у гліцерині при -80°C. Позитивні клони підтримували на планшетах LB, які вміщували ампіцилін (100мкг/мл), неоміцин (10мкг/мл) та 1% глюкози, при температурі 30°C. Їх пересівали штрихом щотижнево (до 10 пасажів), після чого із замороженої маточної ампули для серійної культури відбирали свіжий штрих для забезпечення автентичності штаму.

З метою одержання білка для проведення проб, з окремих колоній інкубуванням впродовж ночі (16-20 год.) на живильному середовищі 2 \times YT з ампіциліном (100мкг/мл), неоміцином (10мкг/мл) та 1% глюкози у 250мл ролерних колбах вирощували 100мл стартерні культури. Культури у ролерних колбах підтримували при 30°C та 250об/хв. у ролерному термостаті компанії New Brunswick. Наступного ранку культуру за допомогою живильного середовища розводили до 1л. Клітини, доданням IPTG, були індуковані до 1мМ (кінцеве розведення) при оптичній густині OD₆₀₀=0,5, і їх збирали центрифугуванням при оптичній густині (OD₆₀₀=0,8. Зібрані клітини ресуспендували у гіпотонічному буфері для лізису (100мкл 50мМ Трис-буфера, pH10,0). Бактеріальні клітини було лізуювано шляхом піддання суспензії трьом циклам заморожування-відтаювання (баня з сухого льоду-етанолу для заморожування та 60°C для відтаювання). Після цього згадану суспензію піддавали обробці ультразвуком впродовж 10хв. та центрифугували при 12000g впродовж 10хв. Одержаний супернатант було позначено, як "S1". Дебріс було ресуспендовано у 50мМ Трис-буфері, pH10 та 2 \times SDS (додецилсульфат натрію) трициновому буфері насичення (компанія Novex, Сан-Дієго, Каліфорнія) (1:1). Після цього згадану суміш нагріва-

ли при 95°C впродовж 15хв. та центрифугували при 12000g впродовж 10хв. Частину осаду, придатну для повторного розчинення подібним чином, було позначено "P1". Частину осаду, яку було одержано з грануляту, що залишився, було позначено "P2". P2 ресуспендували у такому самому буфері насичення, що призначався і для P1. Проби S1, P1 та P2 аналізувались засобами SDS-PAGE.

SDS-PAGE гелі проганяли із застосуванням системи двох трицинових буферів на установці Minigel з 10-20% трициновими гелями (компанія Novex). Як анодний (нижній) буфер було використано 0,2М Трис-буфер, pH9,0. Катодний (верхній) буфер мав такий склад: 0,1М Трис-буфер, 0,1М Трицин, 0,1% SDS, pH8,25. Було використано промисловий маркер молекулярної маси "Multi-Mark" (компанія Novex). Убіквітин великої рогакої худоби, який було використано як стандарт, було закуплено від компанії Sigma. Гелі проганяли при постійному струмі 4мА доти, доки маркер-фарбник не досягав дна гелевого блока. Гелі фарбували 0,25% Кумасі синім R250 (компанія Sigma) у розчині оцтова кислота:метанол (10%:40%) та знебарвлювали у тому самому розчині без фарбника.

Більшу частину (>70%) інтактного p141-злитого білка убіквітину було знайдено у осаді (P1 та P2) після центрифугування бактеріального лізату. У гострому контрасті, більшу частину (>70%) p97-злитого білка убіквітину було знайдено у розчинній фракції (S1). Цим підтверджується, що наслідком видалення С-кінцевої гідрофобної ділянки є продукт із поліпшеними характеристиками розчинності. Подібним чином, пептиди p13 та p15 також знаходились у розчинній фракції.

Фермент UCH-L3 убіквінази [Рекштайнер М. (Recksteiner M.) (Видавець) Ubiquitin, Plenum Press (Нью-Йорк) 1988; Вілкінсон (Wilkinson) та інші, Science 246: 670-73, 1989] було експресовано у pRSET (компанія Invitrogen, Сан-Дієго, Каліфорнія), який було використано для трансформування штаму-хазяїну BL21/DE3. UCH-L3 є убіквітин-специфічною протеазою, яка розщеплює С-кінцевий подовжуючий сегмент убіквітину. Її було частково очищено з бактеріальних лізатів осаждженням за допомогою 35% (у відношенні маси до об'єму) сульфату амонію. Точний відсоток використаного сульфату амонію контролювали засобами SDS-PAGE за появою смуги 25,5кД. Супернатант діалізували проти 50мМ Трис-буфера, pH7,4 та випробували проти субстрату злитого білка убіквітину. Активний супернатант поділяли на аліквотні проби та заморожували при -20°C. До складу типової реакційної суміші входило 3мкл лізату, 1мкл 1М DTT (дитіотреїтол), 1мкл UCH-L3 (дивись вище) та 5мкл реакційного буфера (50мМ Трис-буфер, pH7,4). Реакцію проводили при кімнатній температурі впродовж 20хв. Для великомасштабного гідролізування 300мкл лізату змішували з 100мкл 1 М DTT, 20мкл UCH-L3 та 580мкл реакційного буфера.

Пептиди або білки, які входили до складу розчинної (S1) фракції, піддавали додатковому очищенню засобами HPLC зі зворотною фазою, як у Прикладі 16; фракції контролювали засобами SDS-PAGE, і їх ідентичність підтверджували засо-

бами мас-спектрометрії з іонізацією електророзпилюванням (див. нижче). Очищені пептиди або білки піддавали ферментативному розщепленню за допомогою UCH-L3, як вказувалось вище, внаслідок чого одержували кінцевий продукт, позбавлений убіхінону. Після цього цей розщеплений матеріал піддавали повторному очищенню засобами HPLC зі зворотною фазою. Після очищення здійснювали SDS-PAGE, і ідентичність кінцевого продукту підтверджували засобами мас-спектрометрії з іонізацією електророзпилюванням.

Альтернативою розщепленню *in vitro* за допомогою UCH-L3, як описано вище, є коекспресія ферменту, який розщеплює убіквітин, у тих самих бактеріях, у яких відбувається необхідне злиття убіквітину. З цієї метою було використано вектор (pJT184), який експресує убіквіназу UBP1 [Тобіас (Tobias) та Варшавський (Varshavsky), JBC 266: 12021-12028, 1991]. Бактерії, які сумісно експресують злитий білок убіквітину р97 та UBP1, демонстрували повне розщеплення злитого білка *in vivo*: бактерії, які коекспресують злитий білок убіквітину р141 та UBP1, демонстрували часткове (приблизно 70%) розщеплення злитого білка. Білок р97, розщеплений *in vivo*, очищали осадженням за допомогою сульфату амонію з подальшим підданням HPLC зі зворотною фазою, як описано перед тим.

З метою підтвердження ідентичності експресованих та очищених поліпептидів, вдавались до мас-спектрометрії з іонізацією електророзпилюванням за допомогою приладу VG Biotech BIO-Q з квадрупольним аналізатором. Для калібрування приладу було використано міоглобін. Головним компонентом, одержаним з очищеним р97, був окремий пік з молекулярною масою 10339 Да; це добре співпадає з обчисленою молекулярною масою 10347, що підтверджує ідентичність рекомбінантного фрагмента р97.

Приклад 23: Рекомбінант р1-97 зберігає пригнічувальну активність відносно стовбурових клітин

Для визначення біоактивності рекомбінанту р1-97 було застосовано пробу на мітотичну активність CFU-GEMM, як у Прикладі 18:

Таблиця 21

Обробка	% умиртвіння
Контроль ¹	62
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини ²	11
р97 ³	0

¹Мононуклеарні клітини кісткового мозку людини

²Альфа-ланцюг очищеного нереконбінантного гемоглобіну людини, як у Прикладі 16 (100нг/мл)

³Очищений рекомбінантний р97, як у Прикладі 22 (100нг/мл).

Приклад 24: Альфа-ланцюг гемоглобіну людини та пептид 43-55 пригнічують мітотичний цикл CFU-MIX *in vivo* у мишей, оброблених тестостероном або 5-фторурацилом C5FU)

З метою визначення пригнічувальної активності пептиду 43-55 *in vivo* відносно стовбурових клітин, мишей лінії B6D2F₁ попередньо обробляли пропіонатом тестостерону, як описано у Прикладі

1, або за допомогою 5FU. Зокрема, мишам у День 0 внутрідньоочеревино впорскували пропіонат тестостерону (100мг/кг маси тіла). У альтернативному варіанті, мишам у День 0 впорскували 5FU (200мг/кг маси тіла).

Через 24 години (День 1) внутрішньовенно впорскували різні дози пептиду 43-55 або носія. Кістковий мозок збирали у День 2, і пробу на мітотичну активність CFU-MIX здійснювали, як у Прикладі 14. Зокрема, мишей умертвляли, і з стегнових кісток готували суспензії окремих клітин кісткового мозку. Згадані клітини один раз промивали, і доводили їхню концентрацію у живильному середовищі Фішера до 5×10^6 клітин/мл. Для кожного варіанта експериментальних умов до кожної з двох поліпропіленових пробірок додавали 1мл клітин. Згадані пробірки інкубували при 37°C впродовж 3 год. без ("Контроль") або з ("Експериментальна") відповідною концентрацією експериментальної речовини. У кінці інкубування до половини пробірок було додано по 30мг/мл цитозинарабінозиду ("AraC") компанія Sigma), у той час як до інших пробірок була додана така сама кількість живильного середовища Фішера. Згадані пробірки додатково інкубували впродовж 1 год. при 37°C, після чого їх вкладали на лід та двічі промивали холодним живильним середовищем Фішера.

Концентрацію клітин доводили до 5×10^4 - 10^6 /мл у живильному середовищі Фішера, і 0,5мл клітинної суспензії додавали до 5мл метилцелюлозного живильного середовища Methocult M3430 (компанія Stem Cell Technologies, Ванкувер, Британська Колумбія). Згадану суміш енергійно перемішували за допомогою вихрової мішалки і вносили по 1мл до кожної з п'яти 35 мм чашок. Згадані 35мм чашки були, у свою чергу, розміщені у критій 150мм чашці з однією відкритою 35мм чашкою, у якій знаходилась стерильна вода. Колонії CFU-MIX підраховували за допомогою інвертованого фазо-контрастного мікроскопа після 7 днів інкубування при 37°C.

Різниця у кількості колоній між пробірками, які було оброблено живильним середовищем, та пробірками, які було оброблено AraC, являє собою відсоток клітин, які знаходяться у стані мітотичної активності за згаданих умов відповідно до формули:

$$\%S = \frac{a - b}{a} \times (100\%)$$

де а - кількість CFU-MIX із пробірки, яку було інкубовано лише з живильним середовищем

б - кількість CFU-MIX із пробірки, яку було інкубовано з AraC

Таблиця 22¹

Обробка	% умиртвіння
Контроль	35
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (500нг) ²	13
Пептид 43-55 (0,5нг) ²	0

¹Тварини, яких було піддано попередній обробці тестостероном

²Кількість, яку було впорскувано внутрішньовенно миші масою 20г

Таблиця 23¹

Обробка	% умертвіння
Контроль	62
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (500нг) ²	0
Пептид 43-55 (0,5нг) ²	3
Циклічний пептид 43-55 (0,5нг) ²	14

¹Тварини, яких було піддано попередній обробці 5FU

²Кількість, яку було впорскувано внутрішньовенно миші масою 20г

Приклад 25: Пептид 43-55 є активним як інгібітор стовбурових клітин у разі біотинілювання на N-кінцевому Phe (Phe₄₃) або йодування на Phe₄₃ або Phe₄₆

Пептид 43-55 було синтезовано за допомогою способу твердофазного синтезування пептидів (компанія American Peptide Co., Санта-Роса, Каліфорнія). Пептидні аналоги було синтезовано з йодом у пара-позиції Phe₄₃ або Phe₄₆. Біотинілюваний Пептид 43-55 було синтезовано шляхом зв'язування COOH бітину вуглецевим лінкером C₄ до N-кінцевого NH₂ Phe₄₃.

Таблиця 24

Обробка	% умертвіння
Контроль	31
Пептид 43-55 (1нг/мл)	8
Біотинілюваний пептид 43-55 (1нг/мл)	15

Приклад 26: Морфін пригнічує мітотичну активність мишачих CFU-MIX in vitro

Морфін випробували у пробі на мітотичну активність CFU-MIX із застосуванням кісткового мозку мишей лінії Balb/c, як у Прикладі 24:

Таблиця 25

Обробка	% умертвіння
Контроль	44
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Морфін (10 ⁻⁷ М)	10
(10 ⁻⁹ М)	15
(10 ⁻¹¹ М)	32

Приклад 27: Опіатні пептиди DAMGO та DALDA пригнічують мітотичну активність мишачих CFU-MIX in vitro

DAMGO та DALDA випробували у пробі на мітотичну активність CFU-MIX із застосуванням кісткового мозку мишей лінії Balb/c, як у Прикладі 24:

Таблиця 26

Обробка	% умертвіння
Контроль	33
DAMGO 10 ⁻⁵ М)	15
(10 ⁻⁷ М)	0
(10 ⁻⁹ М)	38
DALDA (10 ⁻⁵ М)	47
(10 ⁻⁷ М)	0
(10 ⁻⁹ М)	34

Приклад 28: Ноціцептин пригнічує мітотичну активність мишачих CFU-MIX in vitro

Ноціцептин випробували у пробі на мітотичну активність CFU-MIX із застосуванням кісткового мозку мишей лінії Balb/c, як у Прикладі 24:

Таблиця 27

Обробка	% умертвіння
Контроль	31
Пептид 43-55 (1нг/мл)	8
Ноціцептин (10 ⁻⁷ М)	6
(10 ⁻⁹ М)	0

Приклад 29: Налоксон антагонізує пригнічувальну активність альфа- та дельта-ланцюгів гемоглобіну людини, геморфіну 10 та пептиду 43-55

Пробу на мітотичну активність CFU-MIX було проведено, як у Прикладі 24. Експериментальні речовини випробували самі по собі або у присутності налоксону (10⁻⁵-10⁻⁷М). Налоксон сам по собі у згаданих концентраціях не впливав на результати проби.

Таблиця 28

Обробка	% умертвіння
Контроль	38
Налоксон ¹	36
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини+налоксон ¹	52
Пептид 43-55 (10нг/мл)	6
Пептид 43-55+налоксон ¹	50
Геморфін 10 (100нг/мл)	0
Геморфін+налоксон ¹	36

¹Застосовано з кінцевою концентрацією 10⁻⁵М

Таблиця 29

Обробка	% умертвіння
Контроль	32
Дельта-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	10
Дельта-ланцюг гемоглобіну людини+налоксон ¹	31

¹Застосовано з кінцевою концентрацією 10⁻⁷М

Приклад 30: Налоксон у низьких концентраціях пригнічує мітотичний цикл мишачих CFU-MIX

Пробу на мітотичну активність CFU-MIX було проведено, як у Прикладі 24.

Таблиця 30

Обробка	% умертвіння
Контроль	38
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Налоксон (10 ⁻¹⁰ М)	0

Приклад 31: Антагоніст STOP опіатного мю-рецептора антагонізує пригнічувальну активність альфа-ланцюга гемоглобіну людини, пептиду 43-55 та пептиду 64-82

STOP (H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ з дисульфідним зв'язком між Cys₂ та Pen₇) є аналогом соматостатину, який є специфічним антагоністом опіатного мю-рецептора. Експериментальні речовини випробувались самі по собі або у присутності STOP (10⁻⁷M). STOP сам по собі у згаданій концентрації не впливав на результати проби, однак антагонізував пригнічення мітотичного циклу клітин, обумовлене альфа-ланцюгом гемоглобіну або пептидом 43-55.

Таблиця 31

Обробка	% умертвіння
Контроль	42
STOP ¹	36
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини+STOP ¹	20
Пептид 43-55 (10нг/мл)	8
Пептид 43-55+STOP ¹	21

¹Застосовано з кінцевою концентрацією 10⁻⁷M.

Приклад 32: Попередня обробка альфа-ланцюгом гемоглобіну людини підвищує кількість пізніх групотвірних клітин

Пробу на утворення груп клітин було проведено, як описано Племахером та колегами [Племахер (Ploemacher) та інші, Blood 74: 2755-63, 1989; ван дер Сліж (van der Sluys) та інші, Exp. Hematol. 18: 893-6, 1990; Племахер та інші, Blood 78: 2527-33, 1991; Племахер та інші, J. Tiss. Cul. Meth. 13: 63-68, 1991; Даун (Down) та Племахер, Exp. Hematol. 21: 213-21, 1993]. За допомогою проби на утворення груп клітин визначають появу груп клітин у моношарі клітин стромы. Первинні стовбурові клітини не утворюють колоній у м'якому агарі, однак утворюють групи клітин у присутності моношару стромы. Клітини, які утворюють групи клітин, називають "групотвірними клітинами" (CAFC). Більш диференційовані (наприклад, GM-CFC) клітини-попередники утворюють тимчасові групи клітин, які з'являються і потім зникають впродовж декількох перших тижнів культивування, у той час як первинні стовбурові клітини (наприклад, довгоіснуючі репопуляційні клітини) утворюють групи клітин, які з'являються лише після 4-5 тижнів культивування. Таким чином, CAFC, утворені на 7-14 день культивування є збагаченими CFU-GM, CAFC, утворені на 28-35 день культивування є збагаченими CFU-MIX та CAFC, утворені на 28-35 день культивування є збагаченими довгоіснуючими репопуляційними клітинами.

Мишей лінії B6D2F₁ обробляли пропіонатом тестостерону, як у прикладі 24. Наступного дня видаляли кістковий мозок та інкубували впродовж

4год. з або без альфа-ланцюга гемоглобіну людини (100нг/10⁶ клітин), після чого згадані клітини кісткового мозку висівали з метою використання у пробі на утворення груп клітин. Застосована проба являє собою обмежене розведення культур декстерівського типу (LTBMC) у 96-лункових планшетах. Культури готували вирощуванням лінії клітин мишачої стромы FBMD-1 [Брімз (Breems) та інші, Leukemia 11: 142-50, 1977] до злиття; 96-лункові планшети зі злитими моношарами зберігали при 33°C до постановки проби. Клітини мишачого кісткового мозку готували у вигляді суспензії окремих клітин, і подальші розведення клітин висівали у лунки на 0,2мл живильного середовища LTBMC (компанія Stem Cell Technologies, Ванкувер): 27000; 9000; 3000; 1000; 333. Двадцять лунк було засіяно кожним розведенням для кожного варіанта умов та розподілено на два планшети.

Частоту групотвірних клітин (CAFC) вираховували, як описувалось перед тим [Племахер та інші, Blood 78: 2527-33, 1991; Племахер та інші, J. Tiss. Cult. Meth. 13:63-68, 1991; Брімз та інші, Leukemia 8: 1095-104, 1994]. Результати подано на Фіг.23. Попереднє інкубування клітин у стані мітотичної активності з альфа-ланцюгом гемоглобіну людини підвищує пропорцію пізніх CAFC приблизно у 5 разів. Обробка клітин, які не знаходяться у стані мітотичної активності альфа-ланцюгом гемоглобіну людини ефекту не має.

Приклад 33: Альфа-ланцюг гемоглобіну людини та пептид 43-55, циклічний пептид 43-55 та пептид 64-82 пригнічують мітотичний цикл CFU-GEMM крові пупкового канатика людини

Пробу на мітотичну активність CFU-GEMM крові пупкового канатика людини було проведено, як у Прикладі 19. Зокрема, мононуклеарні клітини було виділено з клітин крові пупкового канатика людини та доведено до концентрації 2-4×10⁴клітин/мл у живильному середовищі IMDM (живильне середовище Дульбекко, модифіковане за способом Іскова) для культур тканин, доповненому 10% FBS, 100нг/мл ліганду з набору та 100нг/мл IL-3 людини. Згадані клітини було інкубовано впродовж 48год. при 37°C.

Після інкубування клітини промивали та ресуспендували у вільному від сироватки IMDM при концентрації 10⁶клітин/мл. Один мл клітин додавали до кожної з двох поліпропіленових пробірок на кожний варіант умов та пробу на мітотичну активність проводили, як у Прикладі 24 для мишачого кісткового мозку. Після інкубування з AraC клітини промивали холодним IMDM і доводили концентрацію до 10000-20000 клітин на 0,5мл IMDM та змішували з 5мл Methocult H4433 (компанія Stem Cell Technologies). У альтернативному варіанті, використовували метилцелюлозне живильне середовище Methocult H 4435 (Stem Cell Technologies). У цьому випадку концентрацію клітин доводили до 2500-5000 клітин на 0,5мл IMDM. Згадані клітини висівали, як у Прикладі 24, і колонії CFU-GEMM підраховували на 14-18 день.

Таблиця 32

Обробка	% умертвіння
Контроль	52
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Пептид 43-55 (1нг/мл)	20
(10нг)	12
(100нг)	5
Циклічний пептид 43-55 (1нг/мл)	32
(10нг)	0
(100нг)	11
Пептид 64-82 (1нг/мл)	21
(10нг)	20
(100нг)	39

Приклад 34: Альфа-ланцюг гемоглобіну людини та пептид 43-55 пригнічують мітотичну активність CFU-GEMM кісткового мозку дорослої людини

CO34⁺ стовбурові клітини було одержано від компанії Poietic Technologies (Гейтерсбург, Мериленд) після очищення від клітинного мозку людини за допомогою колонки CellPro. Клітини інкубували впродовж 48 год. з лігандом з набору та IL-3 та використовували у пробі на мітотичну активність CFU-GEMM, як у Прикладі 26.

Таблиця 33

Обробка	% умертвіння
Контроль	47
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (нг/мл)	0
Пептид 43-55 (нг/мл)	0

Приклад 35: CFU-GEMM в мобілізованій периферичній крові людини знаходяться у активному мітотичному стані і піддаються пригніченню альфа-ланцюгом гемоглобіну людини, пептидом 43-55, DAMGO або морфіном

Периферичну кров було одержано від пацієнтів з раком грудної залози, яких було піддано мобілізації периферичних стовбурових клітин за допомогою циклофосфаміду та G-CSF за стандартними протоколами. Еритроцити видаляли за допомогою Ficoll Nyraque (клітини, за допомогою IMDM, розводили 1:1, 20мл об'ємом нашарували на 16мл Ficoll та центрифугували при 800g впродовж 30хв.; мононуклеарні клітини видаляли у інтерфазі та двічі промивали IMDM). У одному випадку мононуклеарні клітини до постановки проби зберігали замороженими у рідкому азоті. Мононуклеарні клітини висівали для проби на мітотичну активність CFU-GEMM, як у Прикладі 26, за виключенням того, що їх висівали у концентрації $2,5 \times 10^5$ клітин на чашку.

Таблиця 34

Обробка	% умертвіння
Контроль (пацієнт №1)	48
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0

Таблиця 35

Обробка	% умертвіння
Контроль (пацієнт №2) ¹	67
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (нг/мл)	2
Пептид 43-55 (10нг/мл)	0
Морфін (10^{-7} M)	24
Морфін (10^{-9} M)	0
DAMGO (10^{-7} M)	15
DAMGO (10^{-9} M)	0

Таблиця 36

Обробка	% умертвіння
Контроль (пацієнт №3) ¹	29
Пептид 43-55 (0,1нг/мл)	23
Пептид 43-55 (1,0нг/мл)	0
Пептид 43-55 (10нг/мл)	15

¹3 клітин, які зберігались у замороженому стані перед постановкою проби

Приклад 36: Високі дози альфа- або бета-ланцюга гемоглобіну людини, міоглобіну, пептиду 1-97, пептиду 43-55, пептиду 64-82, ноціцептину або DALDA стимулюють мітотичну активність мишачих стовбурових клітин, які знаходяться у стані покою

Для стимулювання стовбурових клітин у стані покою застосовували ланцюги гемоглобіну, міоглобін та пептиди у дозах мікрограм на мілілітр. Клітини кісткового мозку було одержано від мишей лінії B6D2F₁, які не піддавались обробці, та випробувано у пробі на мітотичну активність CFU-MIX, як у Прикладі 24. Стовбурові клітини, виділені з мишей лінії B6D2F₁, які не піддавались обробці, як правило, знаходяться у стані незначної мітотичної активності, у разі, якщо вона не була стимульована (наприклад, за допомогою пропінату тестостерону (порівняй Приклад 1) або за допомогою хімотерапевтичного засобу, наприклад, 5FU (порівняй Приклад 4)).

Таблиця 37

Обробка	% умертвіння
Контроль	3
α-ланцюг гемоглобіну людини (1мкг/мл)	0
(10мкг/мл)	24
(100мкг/мл)	40

Таблиця 38

Обробка	% умертвіння
Контроль	9
β-ланцюг гемоглобіну людини (мкг/мл)	55
Міоглобін людини (мкг/мл)	30

Таблиця 39

Обробка	% умиртвіння
Контроль	3
α -ланцюг гемоглобіну людини (100мкг/мл)	41
DALDA (10^{-5} M)	24
(10^{-3} M)	41
DADLE (10^{-5} M)	0
(10^{-3} M)	0

Таблиця 40

Обробка	% умиртвіння
Контроль	0
α -ланцюг гемоглобіну людини (100мкг/мл)	30
Пептид 43-55 (10мкг/мл)	26

Таблиця 41

Обробка	% умиртвіння
Контроль	16
Пептид 1-97 (10мкг/мл)	62
(10мкг/мл)	41

Таблиця 42

Обробка	% умиртвіння
Контроль	4
Пептид 64-82 (1мкг/мл)	25
Ноціцептин (10^{-5} M)	36

Приклад 37: Внутрішньовенне введення високих доз альфа-ланцюга гемоглобіну людини стимулює мітотичну активність мишачих стовбурових клітин, які знаходяться у неактивному стані

Альфа-ланцюг гемоглобіну людини впорскували внутрішньовенно мишам лінії B6D2F₁, які не

піддавались обробці. Через 24 год. мишей умертвляли, збирали кістковий мозок зі стегнових кісток, і проводили пробу на мітотичну активність CFU-MIX, як у Прикладі 24.

Таблиця 43

Обробка	% умиртвіння
Контроль (обробці не піддався)	0
Середовище (контроль впорскування)	0
α -ланцюг гемоглобіну людини (150мкг/мишу)	48

Приклад 38: Налоксон антагонізує стимульовану активність високої дози альфа-ланцюга гемоглобіну людини, пептиду 43-55 відносно стовбурових клітин

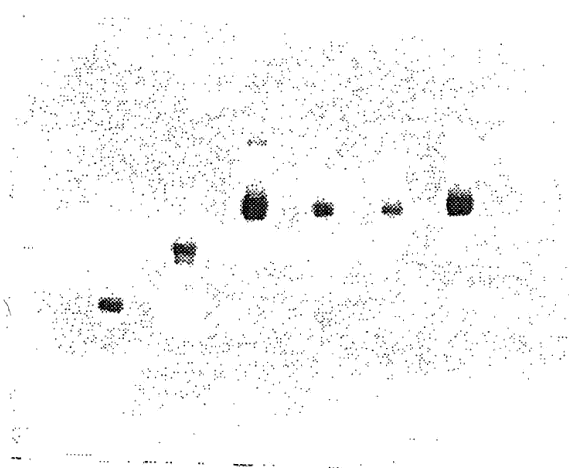
Таблиця 44

Обробка	% умиртвіння
Контроль	6
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	48
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)+налоксон ¹	0

¹Застосовано з кінцевою концентрацією 10^{-7} M

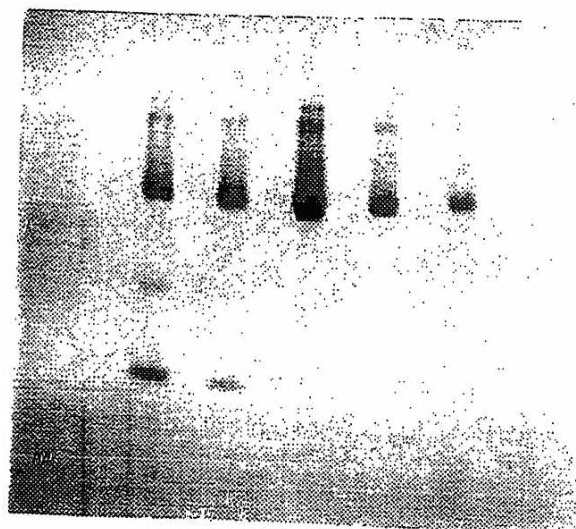
Незважаючи на те, що цей винахід було описано на прикладах варіантів втілення, яким віддається перевага, слід розуміти, що фахівцям у цій галузі будуть очевидними варіанти та модифікації цього винаходу. Внаслідок цього, передбачається, що пункти формули винаходу охоплюють усі еквівалентні варіанти, які входять в обсяг цього винаходу, який ними заявляється.

1 2 3 4 5 6

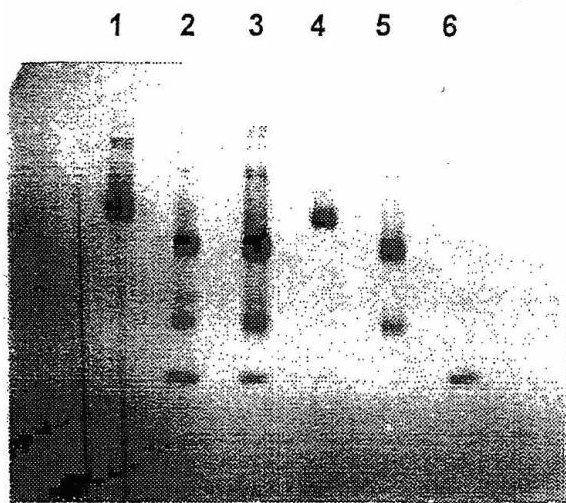


ФІГ. 1

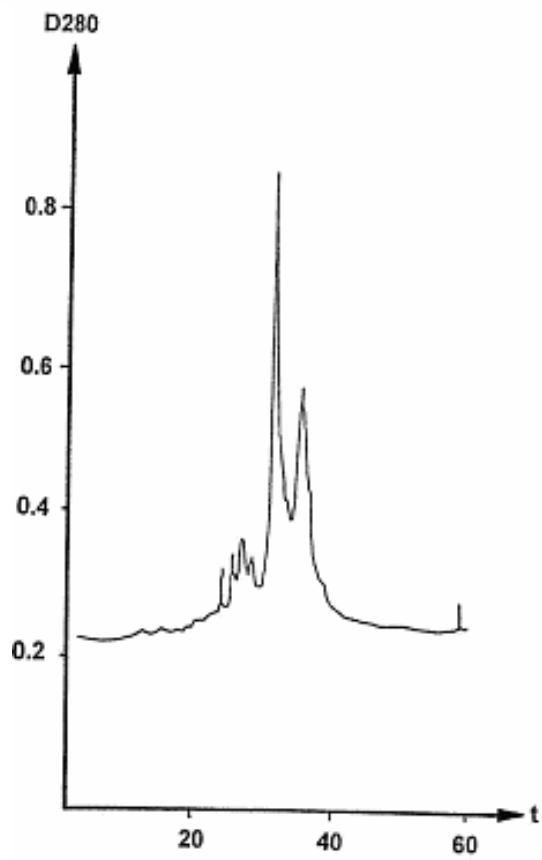
1 2 3 4 5



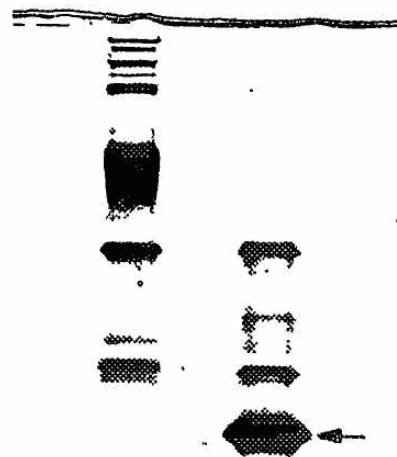
ФІГ. 2



ΦΙΓ. 3

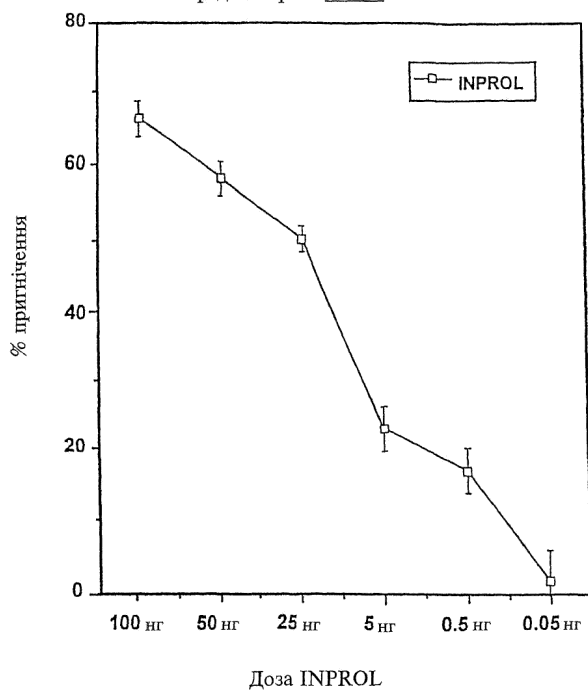


ΦΙΓ. 5

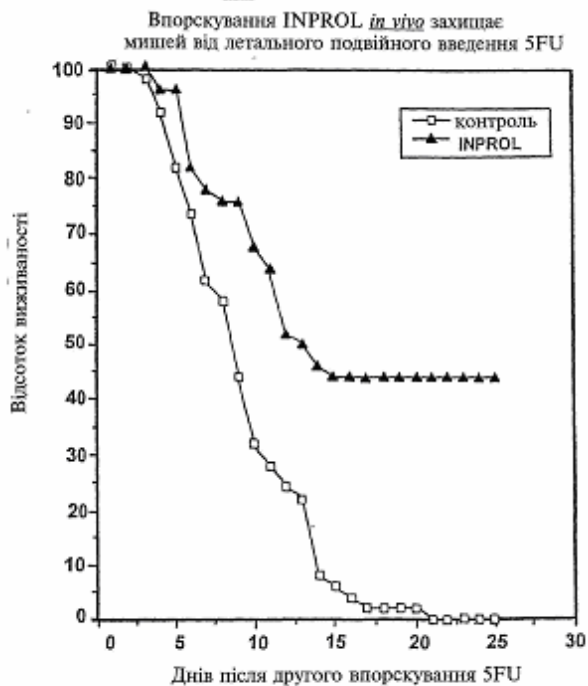


ΦΙΓ. 4

Пригнічення проліферації FDCPmix INPROL'ом:
безпосередній ефект *in vitro*

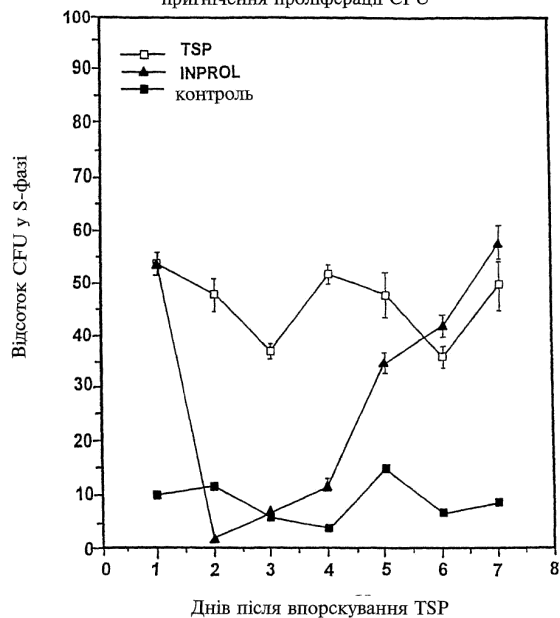


ФІГ. 6



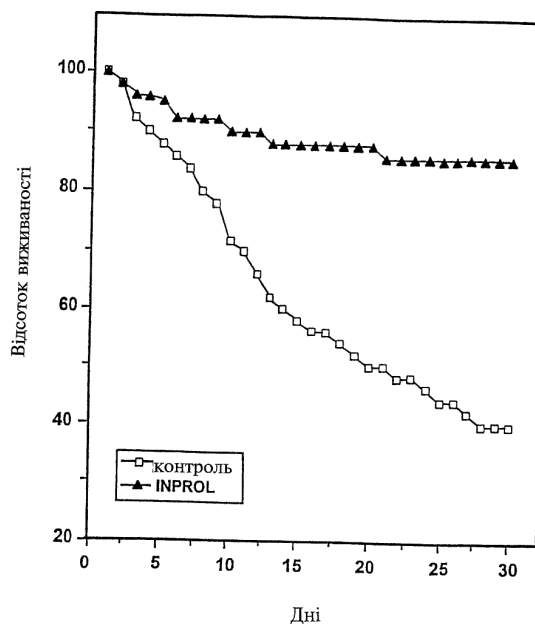
ФІГ. 8

Вплив INPROL на динаміку
пригнічення проліферації CFU



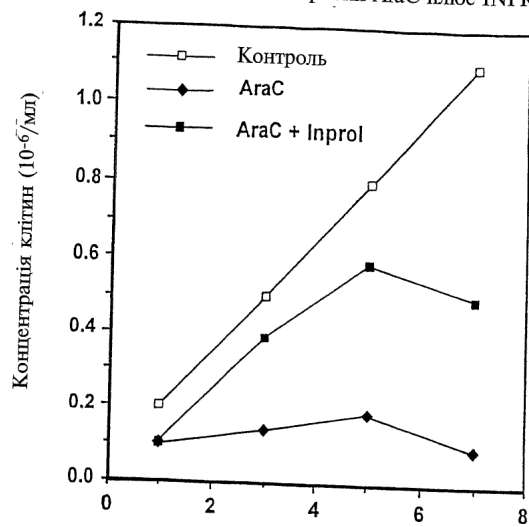
ФІГ. 7

Вживаність летально опромінених
мишей після обробки INPROL'ом



ФІГ. 9

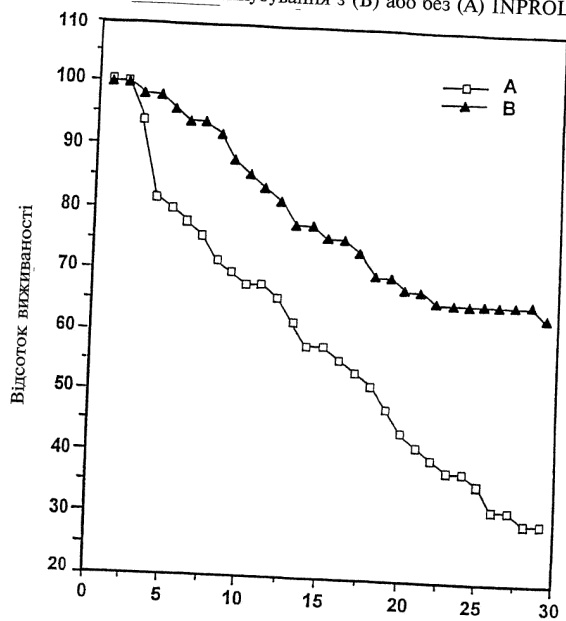
Відновлення клітин у культурах BMLTC-L1210 після комбінованої обробки AraC плюс INPROL



Днів першого тижня після обробки

ФІГ. 10А

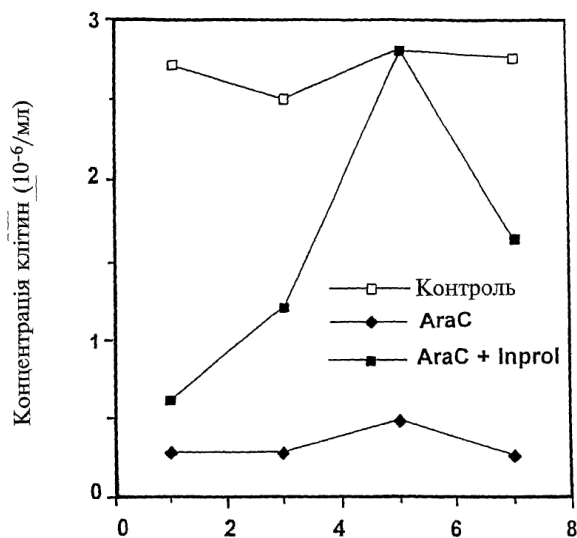
30-денний радіозахист клітин кісткового мозку після попереднього інкубування з (В) або без (А) INPROL



Днів після трансплантування кісткового мозку

ФІГ. 11

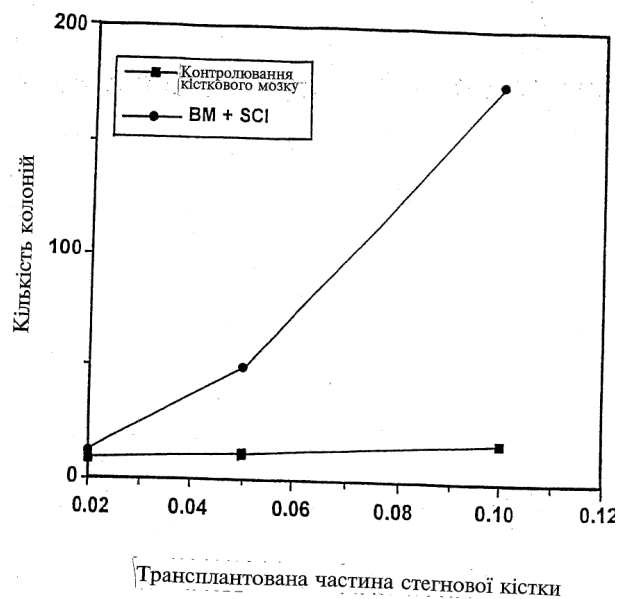
Відновлення клітин у культурах BMLTC-L1210 після комбінованої обробки AraC плюс INPROL



Днів третього тижня після обробки

ФІГ. 10В

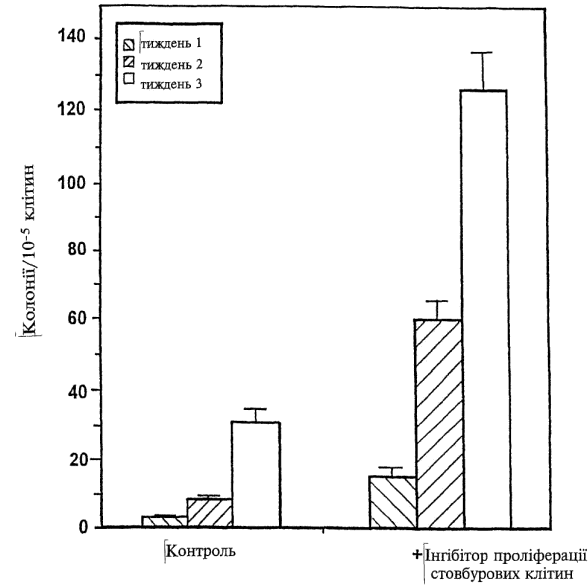
Здатність до повторного заселення кісткового мозку мишачих клітин BDF1 після інкубування з SCP1



Трансплантована частина стегнової кістки

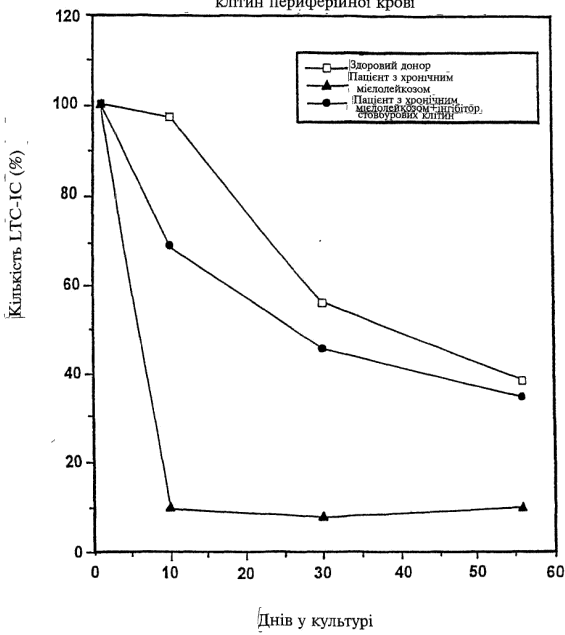
ФІГ. 12

Кількість клітин-попередників перед-В у довгоіснуючій культурі лімфоцитів після попереднього інкубування з або без INPROL

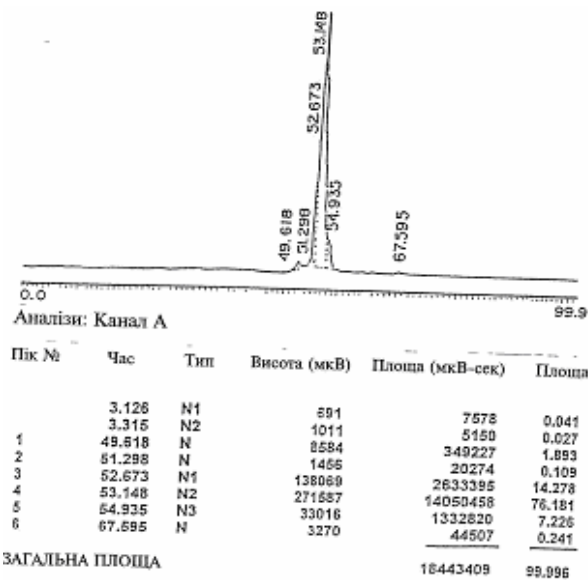


ФІГ. 13

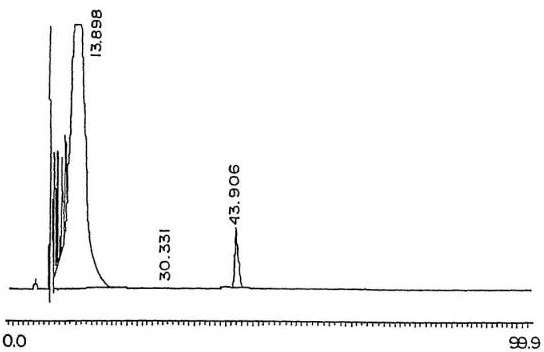
INPROL поліпшує репопуляційну здатність (кількість LTC-IC (клітин, які започатковують довгоіснуючі культури клітин)) лейкозних клітин периферійної крові



ФІГ. 14



ФІГ. 15A



ФІГ. 15B

FIG. 15C

ΦΙΓ. 16Α

[illegible]

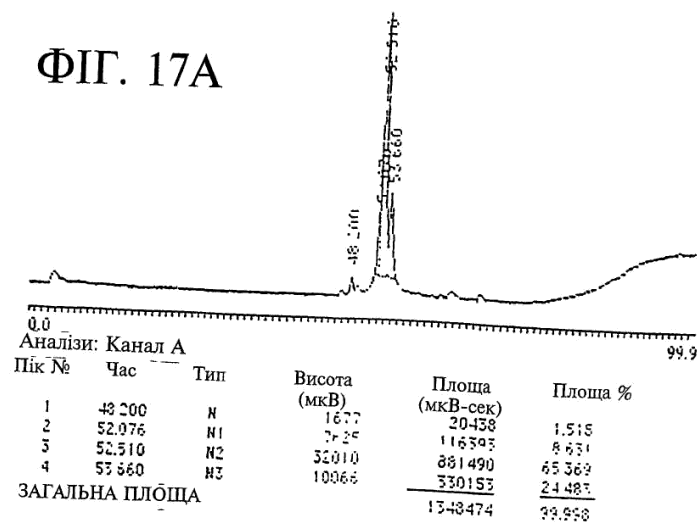
ΦΙΓ. 16B

[illegible]

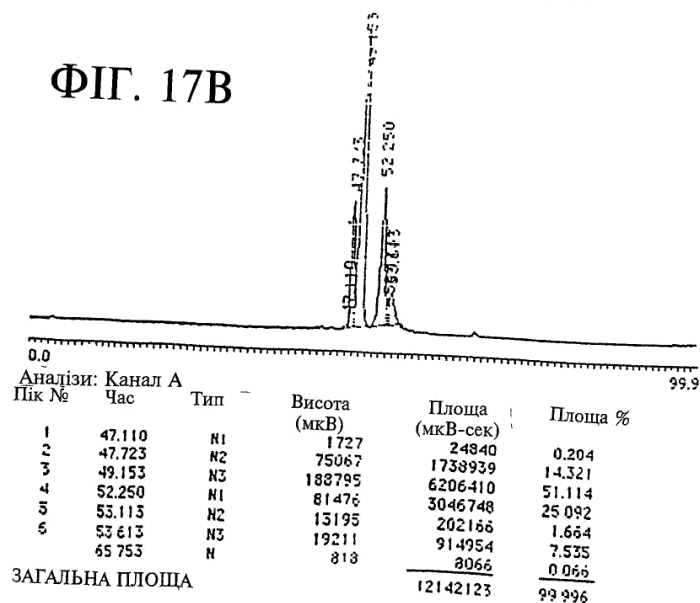
		10	20	30	40	50	
hHemA.per	1	V-LSPADKIN	VKAAMGRVGA	HA-GEVGEA	LE-RMFLSFF	PIKTWFFPHF	50
hHemB.per	1	VHITPEERCA	VTAANGKV	-NVDVCGEA	LG-RLLNVVF	WIORFFESFG	50
mHemA.per	1	V-LSEEDASN	IAAAYGNIGG	HG-AEYGEA	LE-RMFASF	PIKTWFFPHF	50
mHemB.per	1	VHITDAEKAA	VSCLAGKVAS	E---EVGGEA	L-GRLLNVVF	WIORFFDSFG	50
pHemA.per	1	V-LSRADKAN	VKAAMGRVGG	QA-CAHGEA	LE-RMELGF	PIKTWFFPHF	50
pHemB.per	1	VHLSAEKCA	VGLNGKVVV	E---EVGGEA	L-GRLLNVVF	WIORFFESFG	50
		60	70	80	90	100	
hHemA.per	51	DLSE-----G	SAOVKGHGKK	VADALIN---	AVRHVDMPN	ALS--ALSDL	100
hHemB.per	51	DLSTPDAVMG	NPKVKAHGKK	VIGA---ESP	GLAHLDNLKG	TFA--TLSEL	100
mHemA.per	51	DVSE-----G	SAOVKGHGKK	VADALAS---	SAGHLDDELG	ALS--ALSDL	100
mHemB.per	51	DLSSASATGG	NPKVKAHGKK	V---YPAFND	GENHLDLKG	TFASTL--SEL	100
pHemA.per	51	NLSE-----G	SDQVKARGQK	VADALIK---	AVGHLDDELG	ALS--ALSDL	100
pHemB.per	51	DLSNADAVAG	NPKVKAHGKK	V---LOSSES	GLKHLANLKG	TFAKL--SEL	100
		110	120	130	140	150	
hHemA.per	101	HAHKLKVDFV	NFKLLSHCLL	VTLAAHLPAC	ETPAVHASAL	-KFLASVSTV	150
hHemB.per	101	ECQKLHVDFE	NFRLLGNLVV	CVLAHHPGKE	ETTFVQAARQ	-KRWAGVANA	150
mHemA.per	101	HAHKLKVDFV	NFKLLSHCLL	VTLASHHPAD	ETPAVHASAL	-KFLASVSTV	150
mHemB.per	101	ECQKLHVDFE	NFRLLGNLVV	IVLSHILGKD	ETPAVQAARF	-QRWAGVATA	150
pHemA.per	101	HAHKLKVDFV	NFKLLSHCLL	VTLAAHHPDC	ETPSVHASAL	-KFLANVSTV	150
pHemB.per	101	ECQKLHVDFE	NFRLLGNLVV	VTLARRLGHD	ETPDVQAARF	-QRWAGVANA	150
		160	170	180	190	200	
hHemA.per	151	LISKVF					200
hHemB.per	151	LAHKVF					200
mHemA.per	151	LISKVF					200
mHemB.per	151	LAHKVF					200
pHemA.per	151	LISKVF					200
pHemB.per	151	LAHKVF					200

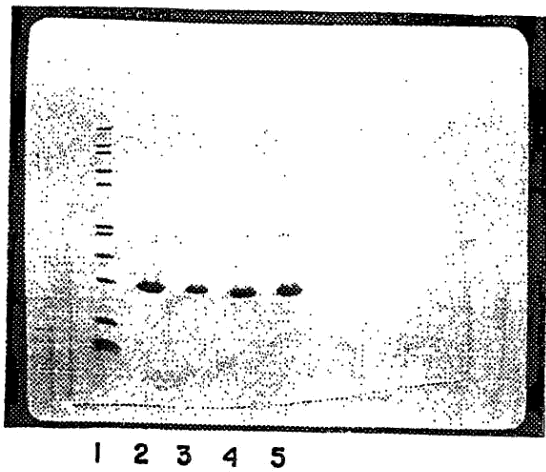
ФІГ. 16С

ФІГ. 17А

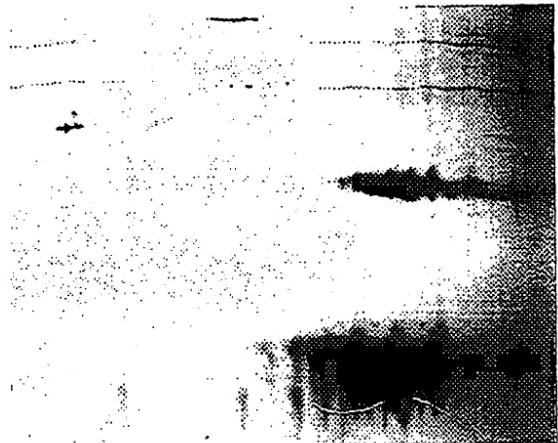


ФІГ. 17В





ФІГ. 18



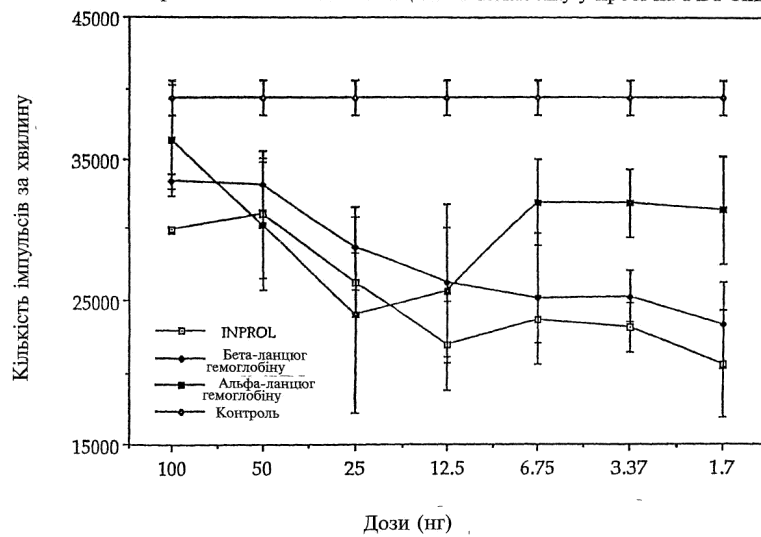
ФІГ. 19A



ФІГ. 19B

ФІГ. 20

Порівняння INPROL та ланцюгів гемоглобіну у пробі на FDPSCmix



ФІГ. 21

