

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 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 агенту, 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 представляють 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 бурстутворювальна одиниця (БЮЕ)) та CFU-E (колонієутворювальна одиниця еритроцитів (КЮЕ)), які забезпечують утворення лише еритроцитів або CFU-GM (гранулоцитарна-макрофагальна колонієутворювальна одиниця (КЮ-ГМ)), які забезпечують утворення гранулоцитів та макрофагів), у той час, як стовбурові клітини (наприклад, CFU-MIX (колонієутворювальна одиниця змішаної культури клітин (КЮ-ЗК)) та CFU-GEMM (колонієутворювальна одиниця гранулоцитів-еритроцитів макрофагів-мегакаріоцитів (КЮ-ГЕММ)) 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.

Продуктування 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 K.C. 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 регенованих 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 сього часу з екстрактів кісткового мозку, одержаних, як описано Лордом та іншими (оглядові статті, послання 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 (колонієутворювальна 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 $\alpha$ ). Було клоновано рецептори для MIP-1 $\alpha$ ; подібно іншим хемокінетичним рецепторам, згадані рецептори MIP-1 $\alpha$  є рецепторами сьомого трансмембранного домену (або "G-пов'язаними" рецепторами), з'єднаними з білками, які зв'язують гуаніновий нуклеотид (GTP), Спригнічувального підкласу ("Gi") (огляд наведено у Мурфі [Murphy), Cytokine & Growth Factor Rev., 7: 47-64, 1996]. Позначення "пригнічувальний" відносно підкласу G $\beta$  вказує на його пригнічувальний вплив на аденілатциклазу.

MIP-1 $\alpha$  було виділено з лінії клітин, а не з первинного матеріалу. У той час, як Грехем та інші спостерігали, що антитіла до MIP-1 $\alpha$  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 $\beta$  (трансформувальний фактор росту), а не MIP-1 $\alpha$ . Додатково, Івз та інші [PNAS, 90: 12015-19, 1993] висловили припущення щодо того, що як MIP-1 $\alpha$ , так і TGF $\beta$ , 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 $\alpha$  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 $\alpha$ , як фізіологічного регулятора мітотичної активності стовбурових клітин за нормальних гомеостатичних умов. Подібним же чином, незважаючи на те, що трансформувальний фактор росту бета (TGF $\beta$ ) 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 ендogenous фактором, присутнім у екстрактах кісткового мозку; додатково, нейтралізуючі антитіла до TGF $\beta$  не ліквідують активності SCI у супернатантах кісткового мозку [Гемпсон (Hampson) та інші, Exp. Hemat. 19: 245-249, 1991].

Інші дослідники описують додаткові інгібуючі фактори стовбурових клітин. Фріндел (Frindel) та співробітники виділили тетрапептид з кісткового мозку зародку 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 Прагнелл 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 (Tsyrova) та інші, авторське свідоцтво СРСР №1561261, розкриває процес очищення інгібітору проліферації стовбурових клітин.

У міжнародних заявках WO 94/22915 та WO 96/10634, які знаходяться у спільному посіданні, розкривається інгібитор проліферації стовбурових клітин, і, завдяки цьому, їх у повному обсязі включено до цього опису посиланням.

До сього 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 інгібитор стовбурових клітин забезпечить захист цих клітин та дозволить оптимізувати згадані схеми лікування. Подібно тому, як існує підтверджена потреба у різноманітних стимулювальних цитокінах (наприклад, таких цитокінах, як IL(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, еритропоєтин, тромбопоєтин, 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 інгібітору. Попередні дослідження Лорда та інших (оглядові роботи, посилання на які було зроблено перед тим) продемонстрували, що інгібіторна активність може бути реверсована шляхом додавання 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 інгібітору.

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; Шеддинг (Scheding) та інші, Stem Cells 12 (додаток 1): 203-11, 1994; Манген (Mangan), Sern. 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; Зірепт (Siegeert) 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, 64 000 Дальтон. Він складається з двох альфа- та двох бета-ланцюгів. Кожен зі згаданих ланцюгів зв'язує одну молекулу гему (феропротопорфірину IX) залізовміщувальної простетичної групи. Альфа- та бета-ланцюги хребетних, можливо, були утворені з одного предкового гену, який подвоївся з наступною 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 альфоподібні ланцюги: дзета, тета та декілька нетранскрибованих псевдогенів (див. Фіг.16В: кДНК та амінокислотні послідовності альфа-ланцюгу людини). Бета-ланцюговий кластер на хромосомі 11 складається з одного бета-ланцюгового гену 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 ланцюгу людини).

Експресія цих генів змінюється впродовж розвитку. Під час гемопоезу у людини, який було екстенсивно охарактеризовано, еритробласти зародку 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 представляє 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-ланцюгу (Hb A<sub>2</sub>).

Для експресування рекомбінантних гемоглобінових ланцюгів у E.coli та дріжджів використовують декілька

методів [наприклад, Джессен (Jessen) та інші, *Methods Enz.*, 231: 347-364, 1994; Лукер (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-ланцюгу 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 з частиною бета-ланцюгу та сайтом розпізнавання фактору Ха [(Hagaï (Nagai) та Торгерсен (Thorgersen), *Methods Enz.*, 231: 347-364, 1994], за цих умов він експресується, як нерозчинне тіло включення.

До складу як бета-ланцюгу, так і альфа-ланцюгу 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.З. (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 Атасці (Atassi), *Biochem. J.* 197: 507-510, 1981; Маккомік (McComick) та Атасці, *J. Prot. Chem.* 9: 735-742, 1990].

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

Креглер (Kregler) та інші [Ехр. *Hemat.* 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 колонієутворювальна 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-етилmaleїдом, що дало змогу Креглеру та іншим припустити необхідність сульфідрильних 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 гемоглобін 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<sup>h</sup>/W<sup>v</sup>. 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. Саєса (S. Sassa) *Seminars Hemat.* 25: 312-20, 1980 та Н. Абрахама (N. Abraham) та інших, *Int. J. Cell Cloning*, 9: 185-210, 1991]. Гем є необхідним для визрівання еритробластів; гемін (хлорфєропропорфїрин 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 культурі хедкстерівського 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 та їх синтетичними похідними. Ендогенні опіатні пептиди продукуються *in vivo* з більших попередників -перед-проенкефаліну А у разі Met- та Leu-енкефалінів, перед-проопіомеланокортину у разі  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$  ендорфінів, та перед-продіорфіну у разі діорфінів А та В,  $\alpha$ -неоендорфіну та  $\beta$ -неоендорфіну. На додаток до цього, пептиди з опіатною активністю можуть бути одержаними з неklasичних джерел, наприклад, внаслідок протеолізу або гідролізу білків, наприклад,  $\alpha$  або  $\beta$  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 (Quirion) 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 (Teschmacher), *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 Тур-MIF (фактор гальмування міграції)-1, також мають опіатну активність [Рід (Reed) та інші, *Neurosci. J. Biobehav. Rev.* 18: 519-25, 1994].

Опіати здійснюють свій вплив шляхом зв'язування ендогенних опіатних рецепторів трьох головних фармакологічних класів -  $\mu$ ,  $\delta$  та  $\kappa$ . Рецептори, які представляють кожний фармакологічний клас, було клоновано і показано, що це є G-зв'язані рецептори, які відносяться до G<sub>i</sub> [огляд у Різін (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 (Satoh) та Мінамі (Minami), *Pharm. Ther.* 68: 343-64, 1995; Кіфєр (Kieffer), *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 615-635, 1995; Різін, *Neuropharm.* 34: 463-472, 1995; Закі (Zaki) та інші, *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 36: 379-401, 1996].

Специфічні агоністи та антагоністи є доступними для рецептору кожного типу, наприклад, для  $\mu$  рецепторів (які вибірково активізуються DAMGO та DALDA і вибірково антагонізуються CTOP 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.

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/I та 104/II, 1993, видавництво Springer Verlag, Берлін; Карелін 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 рецептору (наприклад, героїн, кодеїн, гідроморфон, оксиморфон, леворфанол, леваллорфан, гідрокодон, оксикодон, налорфін, налоксон, налтрексон, бупренорфін, бутанорфанол та налбуфін); на додаток до цього, невеликі молекули, які структурно не пов'язані з морфіном, також можуть діяти на опіатні рецептори (наприклад, меперідин 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].

Ендогенні 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; Гланта та інші, *BBRC* 184: 1060-6, 1992].

Нещодавно було клоновано сирітський рецептор ("ORL1") внаслідок спорідненості його послідовності з опіатними рецепторами мю, 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 рецептору, який називають по-різному-ноціцептинсін або сирітським FQ (у подальшому він буде називатись "ноціцептин"). Було показано, що він є гептадекапептидом, який було одержано з більшого попереднику [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 мю, каппа або дельта. Подібним же чином, у опіатного антагоністу 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 гемопоез кісткового мозку. Ці ефекти були опосередковані, як гадають Гольдберг та інші, внаслідок впливу на рівні глюкокортикоїдів та міграцію Т-лімфоцитів. Крізанак-Бенгез (Krizanac-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 налоксонном 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 Крізанак-Бенгезом та іншими була віднесена на рахунок циркадних ритмів та А-клітин.

Нещодавно було продемонстровано, що миші, мю-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 мю-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 мю-рецептору у цих тварин [Брокмейер (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 і т.ін.). 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, автоімунних та злоякісних захворювань. У лікувальних методах, які застосовуються на цей час, використовують гемопоетичні клітини, одержані з крові пупкового канатику, печінки зародку 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 сортеру зі збудженням флуоресценції з використанням таких маркерів, як CD34, CD38 або родамін). 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 гемопоєзу; (2) вичерпання Т-лімфоцитів, які індукують реакцію "трансплантат проти хазяїна" та (3) відсутності залишкових злоякісних клітин. Ця процедура може бути оптимізована шляхом включення інгібітору(-ів) стовбурових клітин та/або стимулятору(-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 викликає 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, фактору 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. Стимулятор 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 гену 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 гену: (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 інгібітору 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:

(а) Питома активність (IC<sub>50</sub>), яка є меншою ніж або дорівнює 20нг/мл у пробі на колонієутворювальні

одиниці селезінки (CFU-S) мишачих (див. Приклад 4),

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

(c) Активний продукт, чутливий до розщеплення трипсином,

(d) Більш гідрофобний, ніж MIP-1 $\alpha$  або TGF $\beta$  та відокремлюється від обох за допомогою хроматографії з оберненою фазою (див. Приклад 12),

(e) Біологічна активність зберігається після нагрівання впродовж однієї години 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 $\alpha$ , TGF $\beta$  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'єкту, якому призначено введення засобу, здатного вбити або пошкодити стовбурові клітини, шляхом введення згаданому суб'єктові ефективної кількості композиції, яка пригнічує стовбурозі клітини. Стівбуровими клітинами, які захищаються цим способом, можуть бути гемопоетичні стовбурові клітини, які звичайно є присутніми та діляться у кістковому мозку, крові пупкового канатика, печінці зародку або мобілізуються до периферичної крові. У той час, як більшість мобілізованих стовбурових клітин, за результатами аналізу за допомогою клітинного сортеру зі збудженням флуоресценції (FACS), знаходяться у неактивному стані, поліпотентні стовбурозі 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 переважному варіанті, 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'єкту 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 зародку 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 пацієнту, якого було піддано хіміотерапії, який включає введення згаданому пацієнтові ефективної кількості INPROL, яка забезпечує пригнічення стовбурових клітин та/або стимулює одужання після хіміотерапії або променевої терапії шляхом введення ефективної кількості INPROL, яка забезпечує стимулювання стовбурових клітин.

За додатковим аспектом, цей винахід залучає спосіб допоміжного лікування раку будь-якого типу, у тому числі такого, який відрізняється твердими пухлинами (наприклад, грудної залози, товстої кишки, легень, тестикулярного, яєчника, печінки, нирки, 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 одужання після хіміотерапії або променевої терапії шляхом введення певних кількостей INPROL, які забезпечують стимулювання стовбурових клітин.

За ще іншим аспектом, цей винахід залучає 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 наступною обробкою кісткового мозку іншими засобами, які стимулюють його проліферацію; наприклад, колонієстимулювальними факторами та/або INPROL у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини. За одним з 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'єкту, який має будь-який розлад, спричинений проліферацією стовбурових клітин. Такі розлади, наприклад, псоріаз, мієлодисплазія, деякі автоімунні захворювання, імунодепресія 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 залучає 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 залучає введення суб'єкту, якому призначена обробка таким засобом, 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):

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

(b) Теплова обробка при 56°C впродовж 40 хвилин з наступним охолодженням на льодяній бані,

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

(d) Кислотне осадження шляхом додавання супернатанту до 10 об'ємів перемішаного ацетону, який має температуру таяння льоду, до складу якого входить 1 об'ємний % концентрованої хлористоводневої кислоти, та інкубування при 4°C впродовж 16 годин,

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

(f) Виділення хроматографуванням з оберненою 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 опромінювання. 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 стимулювання 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 анальгезію.

Цей винахід також надає:

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

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

Цей винахід включає також фармацевтичну композицію, до складу якої входить (a) поліпептид, який вибрано з групи, до складу якої входить 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-ланцюгу гемоглобіну людини ("пептид 1-97") та

поліпептид, до складу якого входять амінокислоти 1-94 альфа-ланцюгу гемоглобіну людини ("пептид 1-94") та (b) фармацевтично прийнятний носій. Такі фармацевтичні композиції можуть складатись з одного поліпептиду, який обирають зі згаданої групи, суміші поліпептидів, які обирають 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 вулцевим містком,

Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-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 Fig.16A.

До цього винаходу включено також білкові та пептидні послідовності, до складу яких входять модифіковані варіанти альфа-ланцюгу 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, карбоксиметилування, 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 заміщеними 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 об'ємі або на цій ділянці тим же самим чином може бути видалена одна або декілька амінокислот ("видалений делецією" C-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, однак, підтримка пригнічувальної активності відносно стовбурових клітин ("заміщений" C-кінцевий домен зв'язування гаптоглобіну).

Іншими варіантами втілення цього винаходу передбачаються відповідні модифікації бета-ланцюгу гемоглобіну (на C-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 переважному варіанті, 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 атипичні опіатні пептиди та невеликі молекули [Зудру та інші, JBC 254: 2446-9, 1979; Кіп'он 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 Гепірі, Med. Res. Rev. 9: 343-401, 1989; Шіллер, 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. "Опіатоподобні рецептори", як використано у цьому описі, визначаються за їх здатністю до зв'язування опіатів, INPROL, геморфінів, екзорфінів, ноціцептину, членів сімейства Tyr-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 рецептору(-ів) та лігандів, який включає застосування INPROL. (у переважному варіанті, 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 рецептору(-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 активізації GTP-зв'язувальних білків, у переважному варіанті, білків  $G_{\text{пригнічувального}}$  підтипу.

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

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe,  
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-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 атипових опіатних пептидів, наприклад, опіатних пептидів сімейства Tyr-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, обраним з 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-Try-Gly-NH<sub>2</sub>,  
Tyr-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>,  
Tyr-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, та  
Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>.

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

(O-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Cly-ол<sup>5</sup>)-Енкефалш (DAMGO),  
(O-Arg<sup>2</sup>,Lys<sup>4</sup>)-Дерморфін-(1-4)-амід (DALDA),  
(Phe<sup>4</sup>)-Дерморфін-(1-4)-амід,  
Ac-Arg-Phe-Met-Trp-Met-Arg-NH<sub>2</sub>,  
Ac-Arg-Phe-Met-Trp-Met-Lys-NH<sub>2</sub>, та  
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-NH<sub>2</sub>.

Цей винахід включає також спосіб пригнічення або стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин зі сполукою опіатного антагоністу, який обирають з групи, до складу якої входить морфін, кодеїн, метадон, героїн, меперідин, альфапродин, дифеноксилат, фентаніл, суфентаніл, альфентаніл, леворфанол, гідрокодон, дигідрокодеїн, оксикодон, гідроморфон, пропоксифен, бупренорфін, еторфін, оксиморфону декстпропоксифен та мептазинол. Зокрема, включено морфін у пригнічувальних кількостях, які складають менше 10<sup>-7</sup> моль.

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

Цей винахід включає також спосіб стимулювання проліферації стовбурових клітин, який включає контактування гемопоетичних клітин з кількістю білку або пептиду, яка стимулює стовбурові клітини, який обирають з групи, до складу якої входить INPROL, міоглобін, DAMGO та DALDA.

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

а) видалення гемопоетичних клітин зі згаданого ссавця,

- b) обробку згаданих гемопоетичних клітин *ex vivo* кількістю INPROL, яка стимулює стовбурові клітини, та/або опіатною сполукою,
- c) трансфектування або інфікування згаданих гемопоетичних клітин попередньо визначеним геном,
- d) контактування згаданих трансфектованих гемопоетичних клітин *ex vivo* з кількістю INPROL, яка пригнічує стовбурові клітини, та/або опіатною сполукою,
- e) трансплантування згаданому ссавцеві гемопоетичних клітин етапу d,
- f) 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 цитокином. INPROL контактує зі згаданими гемопоетичними клітинами перед, під час та/або після контактування з стимулювальним цитокином. Розмноження стовбурових клітин *ex vivo* надає змогу одержання достатніх кількостей стовбурових клітин з обмежених джерел, наприклад, крові пупкового канатика, печінки зародку, аутологічного кісткового мозку після хіміотерапії і. т.п. або після очищення (наприклад, за допомогою клітинного сортеру 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 пацієнту.

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 цитокином(-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 стимулюють 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 вводитись пацієнту.

Цей винахід включає також фармацевтичну композицію, до складу якої входить (a) INPROL та (b) щонайменше одна пригнічувальна сполука, яку обирають з групи, до складу якої входить MIP-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  (фактор некротизації пухлин), INF $\alpha$  (інтерферон), INF $\beta$ , INF $\gamma$ , 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 входить (a) INPROL та (b) щонайменше один стимулювальний цитокін, який обирають з групи, до складу якої входить IL(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), еритропоєтин, тромбопоєтин, фактор стовбурових клітин, дельтаподібний білок та ліганд flk2/flt3,

Цей винахід описує інгібітор стовбурових клітин (INPROL), який відрізняється від відомих у цій галузі техніки, наприклад, MIP-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ , тетрапептиду Фріндела (Frindel) та співробітників або пентапептиду Пауковіца (Paikovits) та співробітників [порівняй, Райт (Wright) & Прагнелл (Pragnell), 1992 (цитовано перед тим)]. Природний нативний INPROL має молекулярну масу, яка перевищує 10000 Дальтон (визначено ультрафільтрацією), що відрізняє його від тетрапептиду, а також від пентапептиду. Він є більш гідрофобним, аніж MIP-1 $\alpha$  або TGF $\beta$  (хроматографічні системи з оберненою фазою), що відрізняє його від згаданих цитокинів. Додатково, його спосіб дії відрізняється від способу дії будь-якого попередньо описаного інгібітору тим, що він є активним у пробі *in vitro* тільки у разі використання впродовж передінкубаційного періоду. MIP-1 $\alpha$ , наприклад, втрачає ефективність у разі його використання тільки впродовж передінкубаційного періоду (Приклад 5). Додатково, природний INPROL є активним у пробі на визначення "колонієутворювальних клітин з високим проліферативним потенціалом" (HPP-PFC), у той час, як MIP-1 $\alpha$  подібної активності не має (Приклад 6). INPROL відрізняється від стимуляторів, відомих у цій галузі техніки, 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, еритропоєтину, тромбопоєтину, фактору 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 представлено хроматограму кінцевого очищення (високоєфективна рідинна хроматографія (HPLC) з оберненою фазою).

На Фіг.6 представлено включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм (срт=кількість імпульсів за хвилину) до клітин лінії FDCP-mix без (Контроль=0% пригнічення) та з різними кількостями INPROL, очищеного

з свинячого кісткового мозку (pINPROL). Дані нормалізовано проти контрольного значення.

На Фіг.7 представлено відсоток клітин у S-фазі мітотичного 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 представлено виживаність мишей, оброблених двома дозами 5-FU (фторурацил) з або без обробки pINPROL. Кожна група складається з 30 тварин.

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

На Фіг.10A та 10B представлено 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 представлено виживаність мишей (75 на групу) після летального опромінення та трансплантації  $3 \times 10^4$  клітин кісткового мозку після попереднього інкубування з живильним середовищем (Контроль) або pINPROL (25нг/мл) впродовж 4 годин. Виживаність контролювали впродовж 30 днів.

На Фіг.12 представлено 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 годин.

На Фіг.13 представлено 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 годин.

На Фіг.14 представлено репопуляційну здатність лейкозних клітин периферійної 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 представлено хроматограму з оберненою фазою C4 очищеного pINPROL, елюйованого 53% ацетонітрилу. Смуга 1 - неочищений матеріал, Смуга 2 - маркери молекулярної маси та Смуга 3 - очищений матеріал.

На Фіг.15B представлено хроматограму з оберненою фазою C4 MIP-1 $\alpha$ , елюйованого 43,9% ацетонітрилу.

На Фіг.15C представлено хроматограму SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію) неочищеного препарату pINPROL та очищеного препарату після оберненої фази.

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

На Фіг.17 представлено порівняння слідових кількостей (визначених за допомогою HPLC з оберненою фазою C4) pINPROL (Фіг.17A) та кристалізованого свинячого гемоглобіну (Фіг.17B).

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

На Фіг.19 представлено порівняння результатів двомірного високовольтного електрофорезу pINPROL (Фіг.19A) та очищеного свинячого бета-гемоглобіну (Фіг.19B).

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

На Фіг.21 представлено результати відокремлення свинячого гемоглобіну засобами HPLC з оберненою фазою за допомогою градієнту елюювання широкого діапазону.

На Фіг.22A представлено плазмиду Гочалі (Hochuli) та інших (1988);

на Фіг.22B представлено плазмиду Летшера (Loetscher) та інших (1991); на Фіг.22C представлено плазмиду pDSUb.

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

Для повнішого розуміння описаного винаходу далі наведено докладний опис. Цей опис, взірцевий для цього винаходу, не повинен розглядатись як такий, що конкретно обмежує цей винахід та такі варіанти, які стануть зрозумілими фахівцю у цій галузі техніки і повинні розглядатись, як такі, що входять до обсягу цього винаходу.

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, трансплантації стовбурових клітин або здійснення протоколів генної терапії. Таким чином, спосіб за цим винаходом може бути застосовано для полегшення 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 вірусінфікованих 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 антагонізуються STOP та налоксоназіном), для каппа рецепторів (які вибірково активізуються фумаратом GR 89696 та U-69593 і вибірково антагонізуються пог-біналторфіміку 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 інтравенозного впорскування або вливання у стандартній дозованій формі, наприклад, від 0,01 до 100мг/кг, у переважному варіанті, від 0,1 до 1,0мг/кг, наприклад, за 4-60 годин до стандартної хіміотерапевтичної або променевої терапії у разі, коли виникає необхідність у пригніченні мітотичного циклу клітини.

У ситуаціях, коли необхідним є стимулювання мітотичного циклу клітини, наприклад, для прискорення одужання після хіміотерапії або опромінення, INPROL застосовують у кількостях, які стимулюють стовбурові клітини. Такі дози, звичайно, дорівнюють 1-500мг/кг, у переважному варіанті, 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 же чином, постхіміотерапевтична або постопроміньовальна 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 хіміотерапевтичних 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 з варіантів втілення цього винаходу, INPROL (від 0,1мг до 6г/кг маси тіла, у переважному варіанті, від 1,0 до 60мг/кг) вводиться, приблизно, через 24 години-10 днів після введення початкової дози хіміотерапевтичного засобу. Ще через 4-60 годин, у переважному варіанті, через 24-48 годин, вводиться наступна доза хіміотерапевтичного засобу. Цей цикл переміжного 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/10<sup>6</sup>клітин/мл, у переважному варіанті, 2-50нг/10<sup>6</sup> клітин/мл. У разі, коли виникає необхідність у стимулюванні стовбурових клітин, INPROL застосовують у дозі від 10нг до 100мкг/10<sup>6</sup>клітин/мл, у переважному варіанті, 1-100 мкг/10<sup>6</sup>клітин/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 видаляють шляхом введення до культур кісткового мозку ефективною кількістю хіміотерапевтичного засобу або ефективною дози опромінення. Перевага надається хіміотерапевтичним засобам, специфічним для клітин у стані мітотичної активності. Оброблений подібним чином кістковий мозок повторно впрорскують 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 забезпечує 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, яю 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 цитокином(-ами) для стимулювання поділу стовбурових клітин, після чого трансфектують (у переважному варіанті, інфікують за допомогою, наприклад, вектору на основі ретровірусів) необхідним геном (генами). Після завершення трансфектування, 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 впрорскують 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 же чином, у іншому варіанті втілення цього винаходу, для лікування пацієнтів з 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 пацієнту вірусінфікованих клітин, клітини кісткового мозку, оброблені INPROL, знову повертаються згаданому пацієнту.

У іншому варіанті втілення цього винаходу, INPROL застосовують для лікування розладів, пов'язаних з 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 з 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 ефективною кількості INPROL.

У іншому варіанті втілення цього винаходу, INPROL застосовують для лікування розладів, пов'язаних з 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 техніки. 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 vivo* для ідентифікування стовбурових клітин у гемопоетичних клітинних препаратах для забезпечення їх видалення перед десенсибілізуванням неопластичних клітин у кістковому мозку. Подібним же 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 білку, 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 техніки [див. Паньє (Pagnier) та інші, Rev. Fr. Transms. 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 надається 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-ланцюгу гемоглобіну.

Цей винахід також надає послідовності ДНК, які кодують поліпептиди 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 серединної ділянки поліпептиду) та які поділяють деякі або усі властивості природних форм.

У переважному варіанті втілення, 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 переважному варіанті втілення, INPROL є "рекомбінантним INPROL'ом". Продукта 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, COS (клітини яєчника мавп) або CHO (клітини яєчника китайських хом'ячків))) не мають зв'язку з будь-якими білками людини. У залежності від використаного 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-ланцюгу гемоглобіну. До складу таких аналогів входять фрагменти альфа-, бета-, гамма-, дельта-, епсилон- та/або дзета-ланцюгу 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 сайспрямованого 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 відрізнятись 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 рецептору), 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 фактору пригнічення. Конкурентні антагоністи є придатними у випадках перепродукування інгібіторів стовбурових клітин або їх рецептору.

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 техніки, 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, опис яких наведено перед тим, можуть бути ідентифіковані різноманітними засобами. Шляхом порівняння об'ємних структур нативних гемоглобінових ланцюгів, активних у пробі (наприклад, альфа-ланцюгу), з 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 з оберненою фазою, з наступним випробуванням 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 ланцюгу (наприклад, альфа-ланцюгу) 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 роблять 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 ланцюгу гемоглобіну, може бути використано сайтспрямований мутагенез. Ділянки ланцюгу, який, як відомо, має активність, як інгібітор стовбурових клітин (наприклад, альфа-ланцюгу), можуть заміщуватись ділянками спорідненого, але позбавленого активності білку (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 з 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 їми не обмежуються: M-CSF (CSF-1), GM-CSF, G-CSF, Megakaryocyte-CSF (мегакаріоцитарний колонієстимулювальний фактор), тромбопоетин, 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 білку або його терапевтично ефективного фрагменту використовується у суміші з фармацевтично прийнятним носієм. Ця INPROL композиція, як правило, вводиться парентеральним впорскуванням або вливанням. Підшкірний, інтравенозний 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 сьогодинішньому стані даної галузі техніки.

Цим винаходом передбачаються також фармацевтичні композиції, до складу яких входять терапевтично ефективні кількості пептидного або поліпептидного продуктів за цим винаходом, разом з 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 буферу (наприклад, Трис-HCl-буфер, ацетат, фосфат), pH та іонною силою, добавки, наприклад, альбумін або желатина для запобігання адсорбуванню на поверхнях, детергенти (наприклад, Твін 20, Твін 80, Плуронік F68, солі жовчних кислот), розчинники (наприклад, гліцерин, поліетиленгліколь), антиокисники (наприклад, аскорбінова кислота, метабісульфіт натрію), консерванти (наприклад, Тімеросал, бензилловий спирт, парабени), речовини для збільшення основної маси та модифікатори тону (наприклад, лактоза, маніт), ковалентного зв'язку полімерів, наприклад, поліетиленгліколя до білку, 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 тканиноспецифічних рецепторів, лігандів або антигенів, або поєднаних з лігандами тканиноспецифічних рецепторів. Інші варіанти композицій за цим винаходом включають подрібнені форми захисних покриттів, 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 з варіантів втілення, композиції за цим винаходом розфасовано до стерильних флаконів або ампул у стандартній дозованій формі.

Цей винахід включає також композиції, до складу яких входить один або декілька додаткових факторів, наприклад, хіміотерапевтичних речовин (наприклад, 5-фторурацил (5FU), цитозинарабінозид, циклофосфамід, цисплатин, карбоплатин, доксирубіцин, етопозид, таксол, алкілюючі 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, колоніестимулювальних 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 компенсування відхилень у фізичному стані пацієнту, 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"  $^3\text{H}$ -Тимідином [Бекер (Becker) та інші, Blood 26: 296-308, 1965].

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

Для стандартного аналізу проліферації CFU-S, звичайно, застосовують метод "самовбивства"  $^3\text{H}$ -Тимідином (Бекер та інші, 1965). Згаданий метод засновано на включенні тимідину, попередника ДНК, міченого радіоактивним ізотопом, ( $^3\text{H}$ -Тимідину), до клітини під час синтезу ДНК. CFU-S, які знаходяться у фазі синтезу (S-фазі) мітотичного циклу під час проведення випробування, забиваються 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  $^3\text{H}$ -Тимідину, і кількістю таких же самих клітин, інкубованих з  $^3\text{H}$ -Тимідином, демонструє відсоток проліферативних CFU-S у вихідному зразку.

Випробування інгібітору не може проводитись на популяції стовбурових клітин кісткового мозку нестимульованих тварин, оскільки інгібітор впливає лише на CFU-S у стані мітотичної активності, які складають 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 години після впорскування і його вплив можна спостерігати, як мінімум, впродовж 7 днів.

Процедура, застосована для скринінгу фракцій під час очищення інгібітору, виглядала наступним чином:

Миші: Під час проведення усіх іспитів були використані миші ліній BDF<sub>1</sub> або CBF<sub>1</sub>.

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

Через двадцять чотири години 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 годин при 37°C на водяній бані з двома пробірками для кожної групи (одна для гарячої (радіоактивної) і одна для холодної (нерадіоактивної)).



Через 3,5 години до кожної гарячої пробірки у об'ємі 200мкл на 1мл клітинної суспензії додавали <sup>3</sup>H-Тимідин (1мікроКюрі/мл, питома активність 18-25Кюрі/ммоль); до холодних пробірок не додавали нічого. Інкубування додатково провадили впродовж 30 хвилин при 37°C.

Після 30-хвилинного інкубування реакцію забиття було завершено шляхом додання 10 мл 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, 2-4×10<sup>4</sup>клітин на мишу у 0,3-0,5мл.

Мишей-реципієнтів, 8-10 на групу, опромінюють не пізніше, ніж за 6 годин 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 <sup>3</sup>H-Тимідину

де b - кількість CFU-S з <sup>3</sup>H-Тимідином

Експериментальні дані з INPROL, наведені у Таблиці 1, демонструють, що стовбурові клітини у стані мітотичної активності після обробки INPROL стають стійкими до дії <sup>3</sup>H-Тимідину. Для цього та усіх наступних прикладів, термін "pINPROL" означає очищений білок з свинячого кісткового мозку. Такий же 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 нерадіоактивний Тимідин, стовбурові клітини, які вижили, проліферують у мишачих селезінках з нормальним утворенням колоній.

Таблиця 1

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

Група	<sup>3</sup> H-TdR (Тимідин)	<sup>3</sup> H-TdR (Тимідин)	Відсоток CFU-S, забитих <sup>3</sup> H-TdR
Без інкубування	22,2±2,0*	13,7±2,4*	38,3±1,7
4 години з живильним середовищем	18,7±3,0*	11,4±1,3*	43,1±1,4
4 години з pINPROL	21,2±2,3*	20,7±2,6*	2,1±0,08

\*CFU-S на 2×10<sup>4</sup>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 фактору росту (IL-3), FDCP mix A4 (A4), підтримували на живильному середовищі Дульбекко, модифікованому за способом Іскоза (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<sup>4</sup> у 100мкл живильного середовища з 20% конячої сироватки та 50% CM (кондиціонованого живильного середовища) WEHI-3) інкубували при 37°C у 5% CO<sub>2</sub> впродовж 16 годин.

На початку додавали pINPROL або неочищений ВМЕ (екстракт кісткового мозку) (фракція IV). Після цього до кожної групи на 3 додаткових години інкубування додавали тимідин, мічений радіоактивним тритієм (<sup>3</sup>H-TdR) 3,7КБк у 50мкл при 740ГБк/ммоль). Рівень проліферації вимірювали шляхом збору клітин та % пригнічення вираховували за допомогою наведеної далі формули:

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

Включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм (<sup>3</sup>H-TdR) клітинами FDCPmix-A4, які було вирощено у присутності певних доз екстракту нормального кісткового мозку або pINPROL, представлено на Фіг.6. Видно, що активність очищеної композиції pINPROL майже у 1000 разів перевищує активність вихідного матеріалу. Час експонування (16 годин) є важливим фактором для ефективного пригнічення і демонструє ознаки безпосереднього впливу pINPROL 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 наступної 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 BDF<sub>1</sub> впорскували TSP (10мг/100г) у День 0; через 24 години мишам кожної експериментальної групи (4 миші на групу) внутрішньоочеревино впорскували pINPROL у дозах 0мкг, 5мкг,

10мкг та 15мкг/мишу.

Через 24 години після впорскування pINPROL мишей забивали і відсоток CFU-S у стані мітотичної активності визначали пробую, 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. pINPROL у дозах, які складали 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 pINPROL (через 24 години після TSP). Мітотичну активність CFU-S визначали кожні 24 години 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, представлені 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 48-72 години. Оскільки період напіввиведення in vivo більшості хіміотерапевтичних засобів, які використовуються при раковій та лейкозній хіміотерапії, є відносно коротким, і складає, як правило, менше, ніж 24 години, тривалість ефекту INPROL, відповідно до одержаних даних, є довшою, аніж ефективний час, впродовж якого хіміотерапевтичні засоби, наприклад, цитозинарабінозид або гідроксисечовина, зберігають свою активність in vivo. Більш важливим є те, що у разі хіміотерапії та променевої терапії, які мають більш тривалі інтервали (більше 24 годин і менше 96 годин) 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 ж 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 розглядають, звичайно, як мітотично специфічний і прицільно діючий на клітини у стані прискореної проліферації, оскільки наслідком включення нуклеотидного аналогу до ДНК на S-фазі мітотичного циклу або перед ним є загибель клітини. Одноразова 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 одноразова 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 BDF<sub>1</sub>. 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 24 години мишам внутрішньоочеревинно було впорскувано pINPROL (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 pINPROL) та контрольній групах (кожна з яких складалась з 30 мишей). Криві виживаності представлено на Фіг.8.

Приклад 5: Порівняння впливу попереднього інкубування з INPROL та MIP-1α на клітини кісткового мозку  
Метою цього експерименту було порівняння пригнічувальних ефектів попереднього інкубування з pINPROL та MIP-1α на клітини мишачого кісткового мозку in vitro.

Було використано наступну процедуру:

in vivo: мишам лінії BDF<sub>1</sub> віком 6-15 тижнів впорскували 200мг/кг 5-FU внутрішньоочеревинно за 48 годин до збору кісткового мозку зі стегнових кісток.

in vitro: Підраховували одиночну збірну суспензію клітин і 5×10<sup>6</sup> клітин інкубували, загалом, у 2мл з або без pINPROL або MIP-1α з 5% конячої сироватки, у живильному середовищі IMDM з доданим L-глутаміном, при 37°C та 5% CO<sub>2</sub> впродовж 4 годин. Після цього клітини двічі промивали і повторно підраховували. Згадані клітини висівали до метилцелюлози за наступних наведених далі кінцевих умов:

0,8% метилцелюлози

25% конячої сироватки

20нг/мл рекомбінантного мишачого IL-3

доданий L-глутамін

5×10<sup>5</sup> клітин на мл

живильне середовище IMDM

Планшети інкубували впродовж 11 днів при 37°C та 5% CO<sub>2</sub> при 100% вологості. Підраховували колонії, які мали більше 50 клітин.

Таблиця 2

Групи	Кількість колоній	Відсоток контролю
Контроль	31,0	100%
pINPROL	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 колонієутворювальних клітин з 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-1 $\alpha$  не викликає таких наслідків за тих же самих експериментальних умов.

Мишей лінії BDF<sub>1</sub> обробляли 5-фторурацилом (200мг/кг внутрішньоочеревино) перед проведенням аналізу на кількість HPP-CFC у їх кістковому мозку. Клітини промивали центрифугуванням та інкубували при густині від 10<sup>6</sup> до 5×10<sup>6</sup>/мл у живильному середовищі без доданого засобу (Контроль), з доданим rINPROL (25нг/мл) або MIP-1 $\alpha$  (200нг/мл) впродовж 4 годин. 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 живильного середовища, як рекомендовано Шарпом (Sharp) та іншими, 1991). Концентрація посіву складала 5×10<sup>4</sup>клітин/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-1 $\alpha$	15,8±0,9	101%

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

#### Приклад 7: Терапевтичний ефект INPROL на одужання 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 одужання від радіаційно індукованої аплазії кісткового мозку. Концепція захисту шляхом застосування інгібітору 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 техніки відомо, що миші, яких було опромінено 9Гр кобальту 60, починають вмирати через 10-14 днів; на 30 день рівень смертності складає, 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 24 години 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 24 години одній групі ввели rINPROL (2мкг/мишу внутрішньоочеревино), 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 введенням ефективної дози INPROL між двома послідовними 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 ефективної терапії.

1. Культура декстерівського типу L1210. як модель лейкозу для дослідження ефекту INPROL зі збереженням нормального гемопоєзу під час десенсибілізування 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 пацієнту. Розрізнення між нормальними колонієутворювальними 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 десенсибілізування пухлинних клітин виглядала наступним чином: у День 0 усі суспендовані клітини та живильні середовища (10мл/матрас) видаляли з матрасів з LTBMC-L1210 і заміняли 2мл живильних середовищ, до складу яких входило 200мкг цитозинарабінозиду (AraC) [Цирлова (Tsyrlova) та інші, у Leukemia:

Advances in Biolog. and Therapy, том 35, 1988]; після 20 годин інкубування матраси промивали і до них на 4 години 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/матрас AraC впродовж 3 годин при 37°C. Кожну групу складало 4 матраси. Культури LTBMCL-1210L тричі промивали і заміняли свіжим живильним середовищем LTBC; їх підтримували, як і попередньо, для проведення досліджень відновлення впродовж 3-4 тижнів.

Дані представлено на Фіг.10. У контрольних культурах, які було оброблено тільки AraC, ріст клітин не спостерігався, у той час, як у матрасах, 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 рятування мієлосупресованих тварин [Bicer (Visser) та інші, Blood Cells 14: 369-384, 1988].

З метою проведення досліджень явища радіаційного захисту, мишей лінії BDF<sub>1</sub> опромінювали дозою 9,5Гр та лікували трансплантуванням кісткового мозку тестостеронстимульованих донорів. Одну групу реципієнтів було виліковано шляхом трансплантування клітин кісткового мозку, попередньо проінкубованих впродовж 4 годин з живильним середовищем (контроль-група А) і іншу (групу В) - з 25нг/мл rINPROL. Клітини у обох групах промивали і опроміненими тваринам було трансплантовано 30000клітин/мишу. Надано дані по виживаності (Фіг.11). Відображено суму 3 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 з механізмів поліпшення радіаційного захисту. З метою перевірки згаданої гіпотези, рівень MRA визначали за методикою, запропонованою Вісер та іншими (цитована робота). Стисло, мишей-донорів лінії BDF<sub>1</sub> попередньо обробляли тестостероном, їх кістковий мозок попередньо інкубували з живильним середовищем або rINPROL впродовж 4 годин та впорскували опроміненим тваринам. На 13 день клітини кісткового мозку з стегової кістки реципієнту висівали на агар з 3 різними концентраціями (0,01, 0,05, 0,1 еквіваленту стегової кістки) у присутності 20% конячої сироватки та 10% WEHI-CM. Кількість колоній на 7 день відображала MRA, оскільки колонієутворювальні 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: Антигіперпроліферативний 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 годин при 37°C з 25нг/мл rINPROL або живильних середовищ (Контроль), промивали, після чого висівали на агар з 20% конячої сироватки, 20д./мл еритропоєтину та 10% WEHI-CM. 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 випливає з Таблиці 4, інкубування нормального кісткового мозку (NBM) від інтактних молодих тварин (миші лінії BDF<sub>1</sub> віком 8-12 тижнів) з INPROL не змінило кількості або пропорції колоній різних типів. Миші-донори лінії BDF<sub>1</sub>, попередньо оброблені тестостеронпропіонатом (TSP), продемонстрували таке ж 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 мітотичного 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 же самий перерозподіл детермінованих клітин-попередників, який спостерігався у мишей лінії BDF<sub>1</sub>, оброблених TSP, спостерігається у мишей лінії Balb/c та у мишей лінії BDF<sub>1</sub> 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, забитих $^3\text{H-TdR}$	BFU-E	CFU-GM
Молоді миші лінії BDF <sub>1</sub>	-	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 <sub>1</sub>	-	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 <sub>1</sub> 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 мітотичний 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 довгоіснуючих 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 підкармлювали 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 годин з 25нг/мл pINPROL або тільки з живильним середовищем для контролю. Після інкубування клітини промивали та висівали у концентрації  $10^5$  клітин/мл до метилцелюлози, до складу якої було включено 30% FCS та 10нг/мл IL-7. Дані 3 тижнів представлено 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 вакцинування.

Приклад 11: INPROL поліпшує репопуляційну здатність стовбурових клітин, які започатковують довгоіснуючі культури клітин від пацієнту з CML.

Хронічний мієлолейкоз (GML) є летальним злостьюм захворюванням гемопоетичних стовбурових клітин. Лікування CML у хронічній фазі шляхом застосування одного хіміотерапевтичного засобу, комбінованої хіміотерапії, спленектомії або опроміненням 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 з гістосумісністю. Менше 40% у всіх останніх відношеннях придатних пацієнтів з CML буде мати прийнятний спорідненого донора; внаслідок цього перевага надається автотрансплантуванню. Кондиціювання автотрансплантату кісткового мозку для вливання разом зі здатністю до обирання нелейкозних (Ph-негативних) мієлоїдних клітин-попередників від Ph-позитивних пацієнтів, які було вирощено у довгоіснуючих культурах (LTC), вказують на потенціал аутологічних джерел нормальних стовбурових клітин щодо забезпечення агресивної та ефективної терапії CML.

У контексті BMT гемопоетична стовбура 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 залучає 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 з 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 з CML опиняються у подібних умовах, кількість лейкозних (Ph-позитивних) клоногенних клітин різко зменшується. Внаслідок кількісного визначення залишкових нормальних LTC-IC у пацієнтів з CML можливо відібрати ті з них, для яких виявиться корисною інтенсивна терапія, підсилена трансплантуванням культивованих автотрансплантатів [Філіпс (Phillips) та інші, Bone Marrow Transplantation 8: 477-487, 1991].

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

Культури закладались, як довгоіснуючі на попередньо опроміненій стромі. Периферійну кров здорового донору використовували, як контроль. Клітини периферійної крові пацієнтів з CML попередньо інкубували з або без pINPROL (25нг/мл) впродовж 4 годин, промивали і висівали 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 з культур, які вирощувались впродовж 10 днів, попередньо інкубували з або без pINPROL 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 підрахуванням загальної одержаної кількості колонієутворювальних 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, представлені на Фіг.14, показують відсутність втрати LTC-IC впродовж перших 10 днів культивування, розпочато з клітин кісткового мозку здорового донору і, приблизно, 30% від початкової кількості LTC-IC було ще присутнім після 5 тижнів культивування. Кількість LTC-IC пацієнту 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 12А: Спосіб виділення імуоактивного інгібітору проліферації стовбурових клітин з 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 гідралічного пресу, виготовленого компанією Biorhythrobog. Клітини кісткового мозку відокремлювали центрифугуванням на центрифугі K-70 при 2000об/хв впродовж 20 хвилин. 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% поліакриламіді, до складу якого входило 0,1% додецилсульфату натрію. Перед нанесенням на гель до зразків, які інкубували впродовж 5 хвилин при 70°C, додавали до 1% додецилсульфату натрію та до 0,5-1% меркаптоетанолу.

Електрофорез здійснювали на 20см блоці гелю впродовж 5 годин. Після цього гель фарбували 0,25% фарбнику Кумасі СВВС 250 у суміші етанол:вода:оцтова кислота 5:5:1 впродовж однієї години при 20°C і промивали у декількох змінах 7% оцтової кислоти. Активність одержаного продукту визначали за методом пригнічення проліферації гемопоетичних 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% з насиченням до 40-80%, які обирали, 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 іспитів після кожного етапу очищення, визначали у відповідності до рівня очищення та еквіваленту дози  $2 \times 10^{-2}$  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 наступним 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 наступним елююванням градієнтом натрійацетатного буферу (pH6,0).

Активні фракції інгібітору елюювались між 3-5ММ.

Об'єм колонки дорівнював 1мл; швидкість елюювання дорівнювала 4мл/годину. Детектування здійснювали за допомогою хроматографу Millichrome на 230 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 (20x1), швидкість елюювання дорівнює 2мл/годину. Для елюювання застосовують буфер 50ММ NaCl, 10ММ Трис-HCl-буфер, pH7,5. Детектування здійснювали за допомогою хроматографу Millichrome на 230 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 з оберненою 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 представлено на Фіг.4. Активність визначається на фракції 5. Кінцевий вихід продукту складав 5%. Як наслідок, загальна кількість білку 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 пресу 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 40 хвилин, після чого охолоджували на льодяній бані до 4°C. Одержаний осад видаляли центрифугуванням при 10000g впродовж 30 хвилин при 4°C і позбавлялись від нього.

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

Очищення засобами високоефективної рідинної хроматографії (HPLC)

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

Елювання здійснювали градієнтом буферу В (90% MeCN, 0,1% TFA) у буфері А зі швидкістю 1мл/хвилину за наступною програмою:

Час, хвилини	%В
0	0
4	0
5	25
25	90

Було введено додатковий етап (100% В впродовж 5 хвилин) 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 представлено 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% буферу В; за даними SDS-PAGE, до його складу входить головна смуга білку 16КД та сліди білків, які переміщуються з більшою швидкістю.

Аналіз матеріалу, одержаного при збиранні тільки другого головного піку HPLC, представлено 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 з оберненою фазою C4 (компанія Vydac) і елюювали за допомогою лінійного градієнту 595% ацетонітрилу у 0,1% трифтороцтової кислоти. Матеріал елюювався у вигляді окремого піку 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 пузирями повітря у детекторі). Таким чином, природний INPROL є значно гідрофобнішим, ніж MIP-1α за тих же самих умов. Відомо, що TGFr елюється при нижчих концентраціях, ніж ті, які спостерігаються у разі pINPROL за тих же самих умов [Міазоно (Miyazono) та інші, J. Biol. Chem. 263: 6407-15, 1988].

Гель елююваного pINPROL матеріалу представлено на Фігурі 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 секвенатору ABI477A з аналізатором 120A Online PTH-AA за стандартною методикою. Було одержано наступну N-кінцеву послідовність:

VHLSAEEKEAVLGKLVNDEV.

За даними комп'ютерного пошуку білкових баз даних виявилось, що ця послідовність була ідентичною N-кінцевій послідовності бета-ланцюгу 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 піку, який представлено на Фіг.5 (тобто, rINPROL 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 наступну N-кінцеву послідовність:

VLSAADKAN YKAAWGKVGGQ.

Смугу 30КД було піддано обмеженому протеолітичному розщепленню; одержали наступну внутрішню послідовність: \*\*FPHFNLSHGSDQVK

Перша послідовність є ідентичною N-кінцевій послідовності альфа-ланцюгу свинячого гемоглобіну, у той час, як друга послідовність є ідентичною залишкам 43-56 альфа-ланцюгу свинячого гемоглобіну (див. Фіг.16С для порівняння послідовності альфа- та бета-ланцюгів чоловічого, мишачого та свинячого гемоглобіну). Повторне секвенування цих смуг, а також деяких з другорядних смуг, постійно давало ділянки послідовності альфа-ланцюгу гемоглобіну. Таким чином, різні смуги, наведені на Фіг.15С, представляють фрагменти або агрегати альфа-ланцюгу свинячого гемоглобіну. Приклад 13С: Додаткове визначення характеристик свинячого INPROL.

Для додаткового порівняння rINPROL з свинячим гемоглобіном, від компанії Sigma Chemical Company одержали двічі кристалізований свинячий гемоглобін та піддали його HPLC з оберненою фазою, як описано у Прикладі 12В для Фіг.15. Як показано на Фіг.17, HPLC хроматографа інтактного гемоглобіну є подібною до хроматограми rINPROL Препарату 1. Додатково, у разі безпосереднього порівняння, хроматограма rINPROL Препарату 2, яку представлено на Фіг.17А (тобто, який було одержано з другого піку Фіг.5), перекривається з хроматограмою двох інших піків свинячого гемоглобіну (Фіг.17В), з часом утримання 52,51 та 52,25 хвилин для головних піків, відповідно. Слід звернути увагу на те, що гем сумісно мігрує з першим головним піком у гемоглобіні, у цьому випадку на 49,153 хвилини; 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 15038 Дальтон та 16034 Дальтон, відповідно. Як видно на SDS-PAGE хроматограмі на Фіг.18, перші два піки складаються з ланцюгу більшої молекулярної маси, у той час, як два других складаються з ланцюгу меншої молекулярної маси. Таким чином, перші два піки представляють бета-ланцюг гемоглобіну, а два других піки представляють альфа-ланцюг гемоглобіну.

Було проведено додаткові розподіли свинячого гемоглобіну з застосуванням градієнту 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-ланцюгу гемоглобіну, було проведено двомірний високовольтний електрофорез (Фіг.19). У першому вимірі, ізоелектричне фокусування здійснювали у скляних пробірках за допомогою 2% амфолінів, рН4-8, при 9600 вольт-годинах. Тропоміозин (молекулярна маса 33КД, рІ 5,2) було використано, як внутрішній стандарт; його позицію на кінцевому двомірному блоці гелю позначено стрілкою. Гель у пробірках було урівноважено у буфері з наступним перенесенням на концентруючий гель, після чого нанесено на блок 12,5% акриламідного гелю. Електрофорез у гелевому блоці у присутності додецилсульфату натрію проводили впродовж 4 годин при 12,5мА/гель. Гелеві блоки забарвлювались сріблом та висушувались.

Під час порівняння двомірних 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 з застосуванням анτισвинячих гемоглобінових антитіл, та одномірною або двомірною високовольтною електрофорезу, підтвердили присутність бета-ланцюгу гемоглобіну у препараті. Таким чином, активний rINPROL Препарат 2, який було одержано відповідно до Прикладу 12В, представляє 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 з застосуванням матеріалу, очищеного, як описано у Прикладі 12В. Як показано у Таблиці 8, було забито 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 забиття - 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 відсотку 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 $\alpha$  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 перед тим для проби на CFU-S, за виключенням того, що цитозинарабінозид (AraC, 30мікрограм/мл) використовують, як циклоспецифічний токсичний агент, замість високої дози тимідину, міченого радіоактивним тритієм [див. B.I. Лорд (B.I. Lord), у Haematopoiesis-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. P.I. Фрешні (R.I. Freshney), I.B. 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 BDF<sub>1</sub>. 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 pINPROL, 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, pINPROL пригнічує проліферацію лінії мишачих стовбурових клітин FDCP-MIX у пробі на включення тимідину, міченого радіоактивним тритієм. На Фігурі 20 показано, що у цій пробі активними є як альфа-, так і бета-ланцюги очищеного гемоглобіну, причому пригнічення спостерігається при дозі <2 нг/мл.

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

Таблиця 8

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

<sup>1</sup>NBM= нормальний кістковий мозок

<sup>2</sup>TPBM= кістковий мозок мишей, оброблених тестостероном

<sup>3</sup>Hbg= бета-ланцюг свинячого гемоглобіну, очищений засобами HPLC з оберненою фазою C4 (одержаний з дві кристалізованого свинячого гемоглобіну)

Таблиця 9

Обробка	% загибтя
Контроль <sup>1</sup>	43
Альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну <sup>2</sup>	-4
Бета-ланцюг свинячого гемоглобіну <sup>2</sup>	-14

<sup>1</sup>Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

<sup>2</sup>100нг/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 BDF<sub>1</sub> було впрорскуно тестостерону пропіонат, як описано у Прикладі 1. Через двадцять чотири години мишам інтравенозно було введено по 500нг pINPROL, альфа-ланцюгу свинячого гемоглобіну (очищеного з еритроцитів периферичної крові, як на Фіг.21), бета-ланцюгу свинячого гемоглобіну (очищеного з еритроцитів периферичної крові, як на Фіг.21) або еквівалентний об'єм носія. Через сорок вісім годин 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 відсотку CFU-MIX у стані мітотичної активності до базисних рівнів.

Таблиця 10

Обробка	% загибтя
Контроль <sup>1</sup>	45
pINPROL <sup>2</sup>	5
Альфа-ланцюг свинячого гемоглобіну <sup>2</sup>	5
Бета-ланцюг свинячого гемоглобіну <sup>2</sup>	-5
Базисний <sup>3</sup>	4

<sup>1</sup> Контроль - кістковий мозок мишей лінії BDF<sub>1</sub>, оброблених тестостероном

<sup>2</sup> 100нг/мл

<sup>3</sup> Кістковий мозок мишей лінії BDF<sub>1</sub>, 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 канатику. Окремі ланцюги було виділено засобами HPLC з оберненою фазою подібним же чином, як це описано перед тим 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, 1 мг гемоглобіну дорослої людини обробляли 37мкг біотину NHS LC (компанія Pierce) і згадані ланцюги відокремлювали засобами HPLC з оберненою 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	% забиття
Контроль <sup>1</sup>	49
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	-1
Бета-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	41
Гамма-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	-63

<sup>1</sup> Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

<sup>2</sup> 100нг/мл

Таблиця 12

Обробка	% забиття
Контроль <sup>1</sup>	47
Гамма-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	12
Дельта-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	-4

<sup>1</sup> Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

<sup>2</sup> 100нг/мл

Таблиця 13

Обробка	% забиття
Контроль <sup>1</sup>	68
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	19
Біотинільований альфа-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	7
Бета-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	55
Біотинільований бета-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	25

<sup>1</sup> Контроль - кістковий мозок мишей лінії Balb/c

<sup>2</sup> 100нг/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	% забиття
Контроль <sup>1</sup>	49
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини	-22
Димер альфа-бета-ланцюгів гемоглобіну людини	14
Гемоглобін людини	-31

<sup>1</sup> Контроль - кістковий мозок мишей лінії BDF<sub>1</sub>, оброблених тестостероном

Приклад 18: Свинячий INPROL є активним відносно мононуклеарних клітин людини або CD34<sup>+</sup> клітин крові пупкового канатику *in vitro*

З метою дослідження здатності очищеного INPROL свинячого кісткового мозку впливати на мітотичний цикл клітин-попередників людини, були одержані клітини крові пупкового канатику. Було використано або загальну фракцію мононуклеарних клітин, одержану після розподілу на колонці Ficoll, або CD34<sup>+</sup> фракцію, яку було одержано після фракціонування на анти-CD34 афінних колонках (компанія CellPro Inc.). Клітини було інкубовано впродовж 48 годин *in vitro* у присутності інтерлейкіну 3 (IL-3) та фактору 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 мононуклеарних клітин, так і CD34<sup>+</sup> фракції.

Таблиця 15

	Обробка	% загибтя
Мононуклеарні клітини	Контроль	93
	pINPROL <sup>1</sup>	16
CD34 <sup>+</sup> клітини	Контроль	41
	pINPROL <sup>1</sup>	21

<sup>1</sup>100нг/мл

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

Були одержані мононуклеарні клітини крові пупкового канатику 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	% загибтя
Контроль	Контроль	100
	pINPROL <sup>1</sup>	-6
	Альфа-ланцюг гемоглобіну людини <sup>1</sup>	-23

<sup>1</sup>100нг/мл

Приклад 20: Активними є пептиди, одержані з альфа-ланцюгу гемоглобіну людини та з послідовностей бета-ланцюгу 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-ланцюгу, 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 наступним 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-ланцюгу) та геморфін 7 (амінокислоти 33-40), які виявились активними.

Згадані послідовності виглядають наступним 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	% загибтя
Контроль	Контроль	47
	pINPROL <sup>1</sup>	0
	Пептид (43-55)	

100нг/мл	2
10нг/мл	18
1нг/мл	11

<sup>1</sup>100нг/мл

Таблиця 18

Обробка	% забиття
Контроль	43
Пептид (43-55) <sup>1</sup>	5
Пептид (64-82) <sup>1</sup>	9
Геморфін 10 <sup>1</sup>	1
Геморфін 7 <sup>1</sup>	0

<sup>1</sup>Усі пептиди було випробовано у дозі 100нг/мл

Таблиця 19

Обробка	% забиття
Контроль	47
Циклічний пептид 43-55 <sup>1</sup>	0

<sup>1</sup>Випробовано у дозі 100нг/мл

Приклад 21: Фрагмент пептиду, який було одержано з альфа-ланцюгу 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-ланцюгу очищеного гемоглобіну людини (як у Прикладі 16) у концентрації 1мг/мл у 70% мурашиній кислоті впродовж 72 годин при 37°С. Фрагмент 1-94 було очищено від нерозщепленого альфа-ланцюгу та фрагменту 95-141 засобами HPLC з оберненою фазою, як у Прикладі 16; фракції визначались за допомогою SDS-PAGE (як у Прикладі 22). Ідентичність очищеного білкового фрагменту 1-94 було підтверджено засобами електророзпорощувальної іонізаційної мас-спектрометрії.

З метою визначення пригнічувальної активності цього фрагменту відносно стовбурових клітин було використано пробу на мітотичну активність CFU-MIX, як у Прикладі 14:

Таблиця 20

Обробка	% забиття
Контроль <sup>1</sup>	50
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	12
Фрагмент 1-94 <sup>3</sup>	0

<sup>1</sup> Кістковий мозок мишей лінії Balb/c

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

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

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

Гени для пептидів 43-55 ("p13") та с43-55 ("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-ланцюгу 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 фрагменту 1-97 ("p1-97") було одержано PCR ампліфікацією плазміди, 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 DH5αF'IQ (компанія Life Technologies, Inc., Гейтерсбург, Мериленд), було трансформовано вектором експресії убіквітину, pDSUb, до складу якого входить відповідно синтезований ген (див. перед тим). pDSUb є похідним pDS78/RBSK, який експресує убіквітин людини (Fig.22A) [Гочалі (Hochuli) та інші, Biotechnology 6: 1321-5, 1988]. Летчер (Loetscher) та інші [JBC 266: 11213-11220, 1991] модифікували pDS78/RBSII вирізуванням послідовностей хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT) з плазміди Гочалі та повторним лігуванням згаданої плазміди (Fig.22B). Синтетичний ген убіквітину було сконструйовано парною ренатурацією синтетичних олігонуклеотидів, оброблених кіназою, які кодуєть убіквітин людини, з застосуванням кодону, оптимізованого для бактеріальної експресії. Після цього було сконструйовано pDSUb шляхом вставки синтетичного гену убіквітину, який складався з зібраних олігонуклеотидів, до

дефосфорильованого гідролізату Ват HI-BgIII Кленова дериватизованого pDS78/RBSII. Було показано, що утворена плазмідна, pDSUb (Fig.22C), експресувала убіквітин у *E.coli* на високому рівні.

Плазміді, до складу якої входив p97, та плазміді, 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 pDSUb, яку було гідролізовано Afl II та Pst I. Подібним же чином, плазміді, до складу якої входив p13, та плазміді, 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 pDSUb, 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 білку відповідного розміру засобами SDS-PAGE (див. далі). Злиття убіквітину надпродукувалось додаванням трансформувального фактору IPTG, який титрує репресор lac, шляхом видалення його з промотору pDSUb (до складу DH5α 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 з 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 з замороженої маточної ампули для серійної культури відбирали свіжий штрих для забезпечення автентичності штаму.

З метою одержання білку для проведення проб, з окремих колоній інкубуванням впродовж ночі (16-20 годин) на живильному середовищі 2xYT 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. Наступним ранком культуру за допомогою живильного середовища розводили до 1л. Клітини, додаванням IPTG, були індуковані до 1мМ (кінцеве розведення) при оптичній густині OD<sub>600</sub>=0,5 і їх збирали центрифугуванням при оптичній густині OD<sub>600</sub>=0,8. Зібрані клітини ресуспендували у гіпотонічному буфері для лізису (100мкл 50мМ Трис-буферу, pH10,0). Бактеріальні клітини було лізовано 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 10 хвилин та центрифугували при 12000g впродовж 10 хвилин. Одержаний супернатант було позначено, як "S1". Дебрис було ресуспендовано у 50мМ Трис-буфері, pH10 та 2xSDS (додатковий сульфат натрію) трициновому буфері насичення (компанія Novex, Сан Дієго, Каліфорнія) (1:1). Після цього згадану суміш нагрівали при 95°C впродовж 15 хвилин та центрифугували при 12000g впродовж 10 хвилин. 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 ж самому буфері насичення, що призначався і для P1. Проби S1, P1 та P2 аналізувались засобами SDS-PAGE.

SDS-PAGE гелі проганяли з 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 наступний 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 рогатої 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 блоку. Гелі фарбували 0,25% Кумасі синім R250 (компанія Sigma) у розчині оцтова кислота:метанол (10%:40%) та знебарвлювали у тому ж розчині без фарбника.

Більшу частину (>70%) інтактного p141-злитого білку убіквітину було знайдено у осаді (P1 та P2) після центрифугування бактеріального лізату. У гострому контрасті, більшу частину (>70%) p97-злитого білку убіквітину було знайдено у розчинній фракції (S1). Цим підтверджується, що наслідком видалення С-кінцевої гідрофобної ділянки є продукт з поліпшеними характеристиками розчинності. Подібним же 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 осадженням 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-буферу, pH7,4 та випробували проти субстрату злитого білку 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 перед тим) та 5мкл реакційного буферу (50мМ Трис-буфер, pH7,4). Реакцію проводили при кімнатній температурі впродовж 20 хвилин. Для великомасштабного гідролізування, 300мкл лізату змішували з 100мкл 1М DTT, 20мкл UCH-L3 та 580мкл реакційного буферу.

Пептиди або білки, які входили до складу розчинної (S1) фракції, піддавали додатковому очищенню засобами HPLC з оберненою фазою, як у Прикладі 16; фракції контролювали засобами SDS-PAGE і їх ідентичність підтверджували засобами електророзпорошувальної іонізаційної мас-спектрометрії (див. далі). Очищені пептиди або білки піддавались ферментативному розщепленню за допомогою UCH-L3, як вказувалось перед тим, внаслідок чого одержували кінцевий продукт, позбавлений убіхінону. Після цього цей розщеплений матеріал піддавали повторному очищенню засобами HPLC з оберненою фазою. Після очищення здійснювали SDS-PAGE і ідентичність кінцевого продукту підтверджували засобами

електророзпорошувальної іонізаційної мас-спектрометрії.

Альтернативою розщепленню *in vitro* за допомогою UCH-L3, як описано перед тим, є коекспресія ферменту, який розщеплює убіквітин, у тих же 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 p97 та UBP1, демонстрували повне розщеплення злитого білку *in vivo*: бактерії, які коекспресують злитий білок убіквітину p141 та UBP1, демонстрували часткове (приблизно, 70%) розщеплення злитого білку. Білок p97, розщеплений *in vivo*, очищали осадженням за допомогою сульфату амонію з наступним підданням HPLC з оберненою фазою, як описано перед тим.

З метою підтвердження ідентичності експресованих та очищених поліпептидів, вдавались до електророзпорошувальної іонізаційної мас-спектрометрії за допомогою приладу VG Biotech BIO-Q з квадрупольним аналізатором. Для калібрування приладу було використано міоглобін. Головним компонентом, одержаним з очищеним p97, був окремий пік з молекулярною масою 10339 Дальтон; це добре співпадає з вирахованою молекулярною масою 10347, що підтверджує ідентичність рекомбінантного фрагменту p97.

Приклад 23: Рекомбінант p1-97 зберігає пригнічувальну активність відносно стовбурових клітин

Для визначення біоактивності рекомбінанту p1-97 було застосовано пробу на мітотичну активність CFU-GEMM, як у Прикладі 18:

Таблиця 21

Обробка	% загибтя
Контроль <sup>1</sup>	62
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини <sup>2</sup>	11
p973	0

<sup>1</sup>Мононуклеарні клітини кісткового мозку людини

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

<sup>3</sup>Очищений рекомбінантний p97, 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 (5FU)

З метою визначення пригнічувальної активності пептиду 43-55 *in vivo* відносно стовбурових клітин, мишей лінії B6D2F<sub>1</sub> попередньо обробляли пропіонатом тестостерону, як описано у Прикладі 1, або за допомогою 5FU. Зокрема, мишам у День 0 внутрішньоочеревинно 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) інтравенозно 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 забивали і з стегнових кісток готували суспензії окремих клітин кісткового мозку. Згадані клітини один раз промивали і доводили їх концентрацію у живильному середовищі Фішера до 5×10<sup>6</sup>клітин/мл. Для кожного варіанту експериментальних умов до кожної з двох поліпропіленових пробірок додавали один мілілітр клітин. Згадані пробірки інкубували при 37°C впродовж 3 годин без ("Контроль") або з ("Експериментальна") відповідною концентрацією експериментальної речовини. У кінці інкубування до половини пробірок було додано по 30мкг/мл цитозинарабінозиду ("AraC") компанія Sigma), у той час, як до інших пробірок була додана така ж кількість живильного середовища Фішера. Згадані пробірки додатково інкубували впродовж 1 години при 37°C, після чого їх вкладали на лід та двічі промивали холодним живильним середовищем Фішера.

Концентрацію клітин доводили до 5×10<sup>6</sup>/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 35мм 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, представляє 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 з пробірки, яку було інкубовано лише з живильним середовищем

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

Таблиця 22<sup>1</sup>

Обробка	% загибтя
Контроль	35
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (500нг) <sup>2</sup>	13
Пептид 43-55 (0,5нг) <sup>2</sup>	0

<sup>1</sup>Тварини, яких було піддано попередній обробці тестостероном

<sup>2</sup>Кількість, яку було впорскуно інтравенозно миші масою 20 грам

Таблиця 23<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Тварини, яких було піддано попередній обробці 5FU

<sup>2</sup>Кількість, яку було впорскуно інтравенозно миші масою 20 грам

Приклад 25: Пептид 43-55 є активним, як інгібітор стовбурових клітин у разі біотинілювання на N-кінцевому Phe (Phe<sub>43</sub>) або йодування на Phe<sub>43</sub> або Phe<sub>46</sub>

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 Phe<sub>43</sub> або Phe<sub>46</sub>. Біотинілований Пептид 43-55 було синтезовано шляхом зв'язування COOH біотину вуглецевим лінкером C<sub>4</sub> до N-кінцевого NH<sub>2</sub> Phe<sub>43</sub>.

Таблиця 24

Обробка	% загибтя
Контроль	31
Пептид 43-55 (1нг/мл)	8
Біотинілований 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 з застосуванням кісткового мозку мишей лінії Balb/c, як у Прикладі 24:

Таблиця 25

Обробка	% загибтя
Контроль	44
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Морфін (10 <sup>-7</sup> M)	10
(10 <sup>-9</sup> M)	15
(10 <sup>-11</sup> M)	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 з застосуванням кісткового мозку мишей лінії Balb/c, як у Прикладі 24:

Таблиця 26

Обробка	% загибтя
Контроль	33
DAMGO (10 <sup>-5</sup> M)	15
(10 <sup>-7</sup> M)	0
(10 <sup>-9</sup> M)	38
DALDA (10 <sup>-5</sup> M)	47
(10 <sup>-7</sup> M)	0
(10 <sup>-9</sup> M)	34

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

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

Таблиця 27

Обробка	% загибтя
Контроль	31
Пептид 43-55 (1нг/мл)	8
Ноціцептин (10 <sup>-7</sup> M)	6
(10 <sup>-9</sup> M)	0

Приклад 29: Налоксон антагонізує пригнічувальну активність альфа- та дельта-ланцюгів гемоглобіну людини, геморфін 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 ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$ M). Налоксон сам по собі у згаданих концентраціях не впливав на результати проби.

Таблиця 28

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

<sup>1</sup>Застосовано з кінцевою концентрацією  $10^{-5}$ M

Таблиця 29

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

<sup>1</sup>Застосовано з кінцевою концентрацією  $10^{-7}$ M

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	% загибтя
Контроль	38
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Налоксон ( $10^{-10}$ M)	0

Приклад 31: Антагоніст СТОР опіатного мю-рецептору антагонізує пригнічувальну активність альфа-ланцюгу гемоглобіну людини, пептиду 43-55 та пептиду 64-82

СТОР (H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub> з дисульфідним зв'язком між Cys<sub>2</sub> та Pen<sub>7</sub>) є аналогом соматостатину, який є специфічним антагоністом опіатного мю-рецептору. Експериментальні речовини випробували самі по собі або у присутності СТОР ( $10^{-7}$ M). СТОР 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	% загибтя
Контроль	42
СТОР <sup>1</sup>	36
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	0
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини+СТОР <sup>1</sup>	20
Пептид 43-55 (10нг/мл)	8
Пептид 43-55+СТОР <sup>1</sup>	21

<sup>1</sup>Застосовано з кінцевою концентрацією  $10^{-7}$ M

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

Пробу на утворення груп клітин було проведено, як описано Плевакером та колегами [Плевакер (Ploemacher) та інші, Blood 74: 2755-63, 1989; ван дер Сліж (van der Sluijs) та інші, Exp. Hematol. 18: 893-6, 1990; Плевакер та інші, Blood 78: 2527-33, 1991; Плевакер та інші, J. Tiss. Cul. Meth. 13: 63-68, 1991; Даун (Down) та Плевакер, Exp. Hematol. 21: 213-21, 1993]. За допомогою проби на утворення груп клітин



визначають появу груп клітин у моношарі клітин строми. Первинні стовбурові клітини не утворюють колоній у м'якому агарі, однак утворюють групи клітин у присутності моношару строми. Клітини, які утворюють групи клітин, називають "групоутворювальними 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 B6D2F<sub>1</sub> обробляли пропіонатом тестостерону, як у прикладі 24. Наступного дня видаляли кістковий мозок та інкубували впродовж 4 годин з або без альфа-ланцюгу гемоглобіну людини (100нг/10<sup>6</sup>клітин), після чого згадані клітини кісткового мозку висівали з метою використання у пробі на утворення груп клітин. Застосована проба представляє собою обмежене розведення культур декстерівського типу (LTBMC) у 96-лункових планшетах. Культури готували вирощуванням лінії клітин мишачої строми 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 наступні розведення клітин висівали у лунки на 0,2мл живильного середовища LTBMC (компанія Stem Cell Technologies, Ванкувер): 27000; 9000; 3000; 1000; 333. Двадцять лунок було засіяно кожним розведенням для кожного варіанту умов та розподілено на два планшети.

Частоту групоутворювальних 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 представлено 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 2-4×10<sup>4</sup>клітин/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 48 годин при 37°C.

Після інкубування клітини промивали та ресуспендували у вільному від сироватки IMDM при концентрації 10<sup>6</sup>клітин/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	% загибтя
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

CD34<sup>+</sup> стовбурові клітини було одержано від компанії Poietic Technologies (Гейтерсбург, Мериленд) після очищення від клітинного мозку людини за допомогою колонки CellPro. Клітини інкубували впродовж 48 годин з лігандом з набору та IL-3 та використовували у пробі на мітотичну активність CFU-GEMM, як у Прикладі 26.

Таблиця 33

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

Приклад 35: CFU-GEMM у мобілізованій периферичній крові людини знаходяться в 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

периферійних стовбурових клітин за допомогою циклофосфаміду та G-CSF за стандартними протоколами. Еритроцити видаляли за допомогою Ficoll Нураque (клітини, за допомогою IMDM, розводили 1:1, 20мл об'ємом нашаровували на 16мл Ficoll та центрифугували при 800g впродовж 30 хвилин; моноклеарні клітини видаляли у інтерфазі та двічі промивали IMDM). У одному випадку моноклеарні клітини до постановки проби зберігали замороженими у рідкому азоті. Моноклеарні клітини висівали для проби на мітотичну активність CFU-GEMM, як у Прикладі 26, за виключенням того, що їх висівали у концентрації  $2,5-5 \times 10^5$  клітин на чашку.

Таблиця 34

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

Таблиця 35

Обробка	% загибтя
Контроль (пацієнт № 2) <sup>x</sup>	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	% загибтя
Контроль (пацієнт № 3) <sup>1</sup>	29
Пептид 43-55 (0,1нг/мл)	23
Пептид 43-55 (1,0нг/мл)	0
Пептид 43-55 (10нг/мл)	15

<sup>1</sup>3 клітин, які зберігались у замороженому стані перед постановкою проби

Приклад 36: Високі дози альфа- або бета-ланцюгу 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 B6D2F<sub>1</sub>, які не піддавались обробці, та випробувано у пробі на мітотичну активність CFU-MIX, як у Прикладі 24. Стовбурові клітини, виділені з мишей лінії B6D2F<sub>1</sub>, які не піддавались обробці, як правило, знаходяться у стані незначної мітотичної активності, у разі, якщо вона не була стимульована (наприклад, за допомогою пропіонату тестостерону (порівняй Приклад 1) або за допомогою хіміотерапевтичного засобу, наприклад, 5FU (порівняй Приклад 4)).

Таблиця 37

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

Таблиця 38

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

Таблиця 39

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

Таблиця 40

Обробка	% загибття
Контроль	0
$\alpha$ -ланцюг гемоглобіну людини (100мкг/мл)	30
Пептид 43-55 (10мкг/мл)	26

Таблиця 41

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

Таблиця 42

Обробка	% загибття
Контроль	4
Пептид 64-82 (1мкг/мл)	25
Ноціцептин ( $10^{-8}$ М)	36

Приклад 37: Інтравенозне введення високих доз альфа-ланцюгу гемоглобіну людини стимулює мітотичну активність мишачих стовбурових клітин, які знаходяться в неактивному стані

Альфа-ланцюг гемоглобіну людини впорскували інтравенозно мишам лінії B6D2F<sub>1</sub>, які не піддавались обробці. Через 24 години мишей забивали, збирали кістковий мозок зі стегнових кісток і проводили пробу на мітотичну активність CFU-MIX, як у Прикладі 24.

Таблиця 43

Обробка	% загибття
Контроль (обробці не піддавався)	0
Середовище (контроль впорскування)	0
$\alpha$ -ланцюг гемоглобіну людини (150мкг/мишу)	48

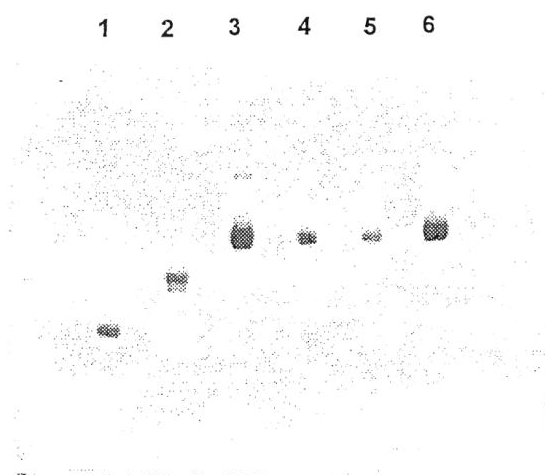
Приклад 38: Налоксон антагонізує стимулювальну активність високої дози альфа-ланцюгу гемоглобіну людини, пептиду 43-55 відносно стовбурових клітин

Таблиця 44

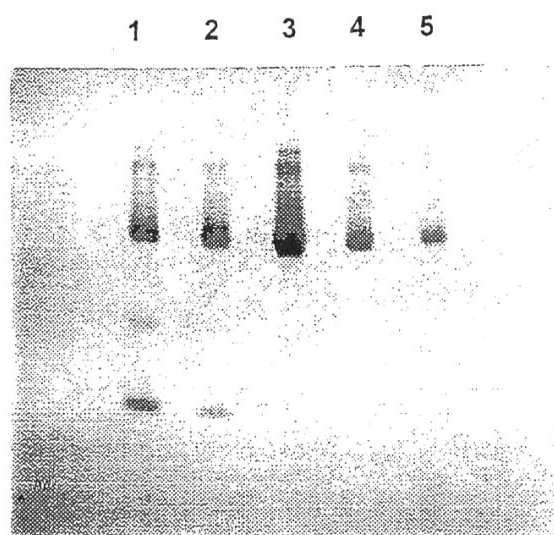
Обробка	% загибття
Контроль	6
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)	48
Альфа-ланцюг гемоглобіну людини (100нг/мл)+налоксон <sup>1</sup>	0

<sup>1</sup>Застосовано з кінцевою концентрацією  $10^{-7}$ М

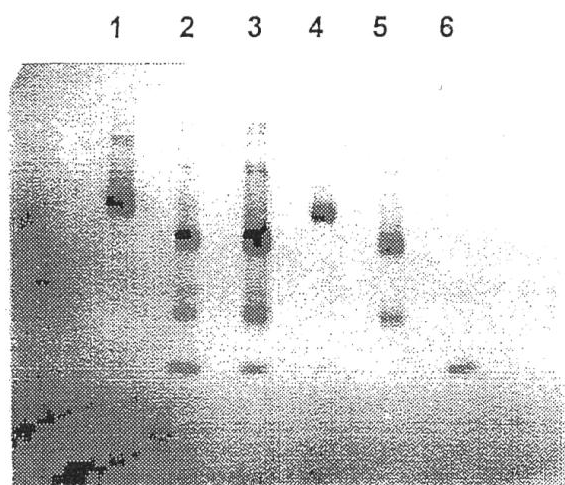
Незважаючи на те, що цей винахід було описано на прикладах переважних варіантів втілення, слід розуміти, що фахівцям у цій галузі техніки будуть очевидними варіанти та модифікації цього винаходу. Внаслідок цього, передбачається, що пункти формули винаходу охоплюють усі еквівалентні варіанти, які входять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



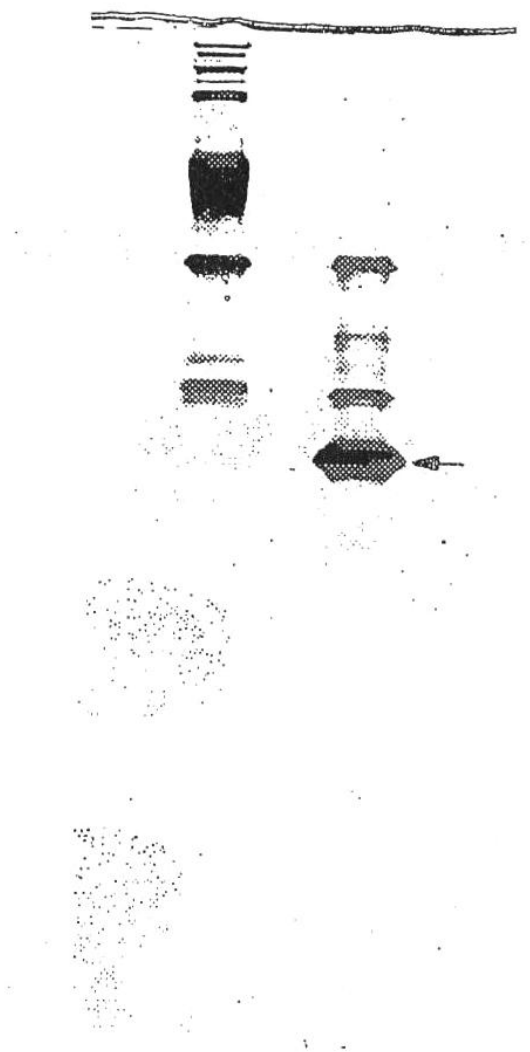
ФИГ. 1



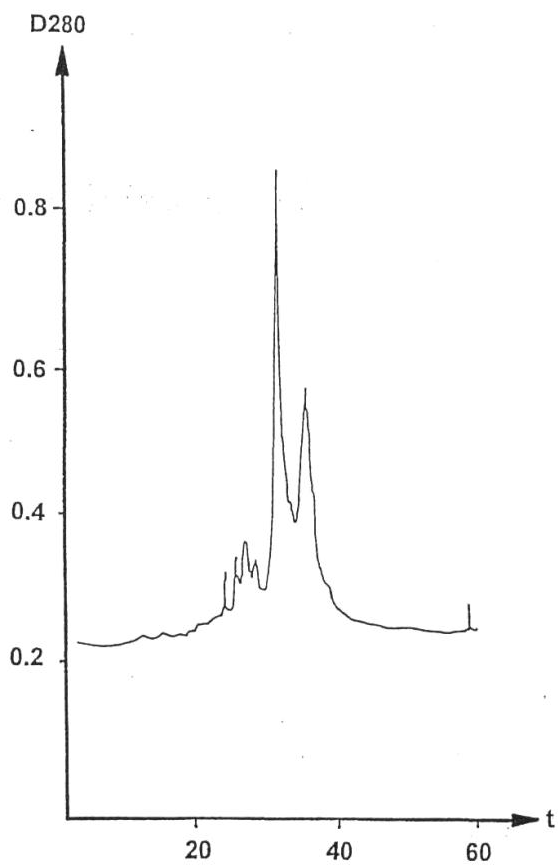
ФИГ. 2



Фиг. 3

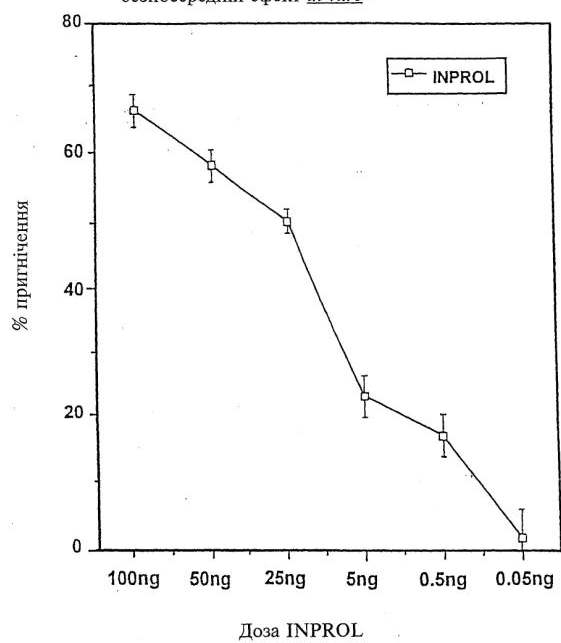


ΦΙΓ. 4

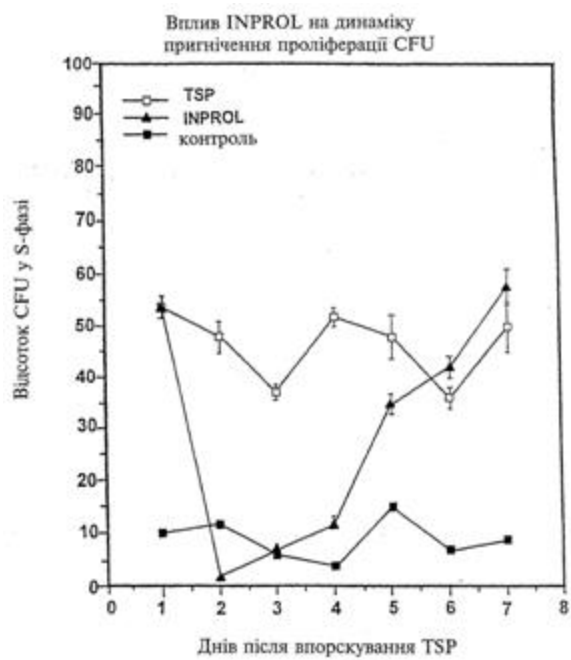


ФІГ. 5

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

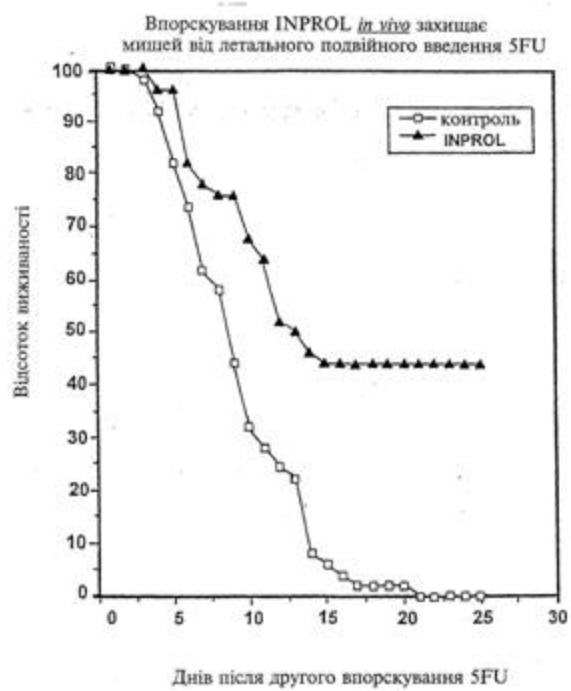


ФІГ. 6



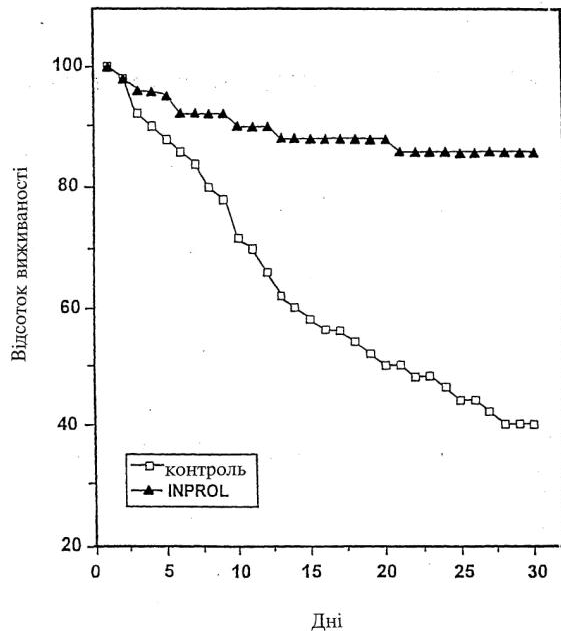
ФІГ. 7

ФІГ. 8



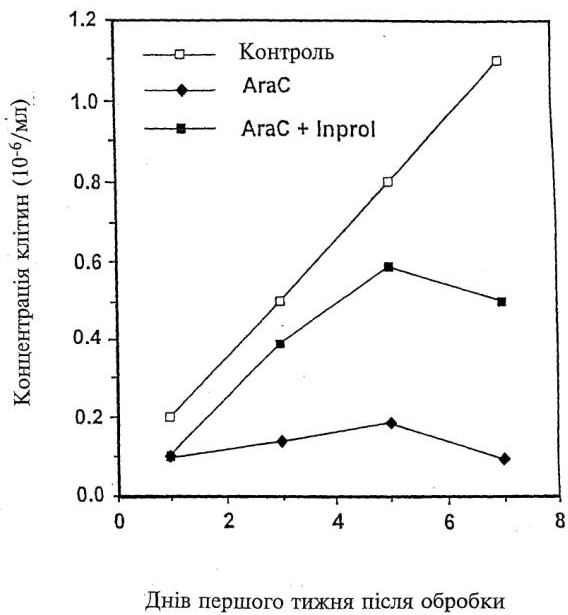


Вживаність летально опромінених мишей після обробки INPROL'ом



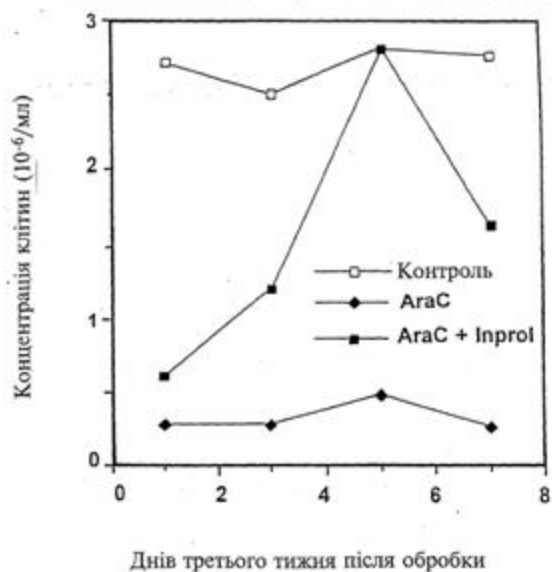
ФІГ. 9

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



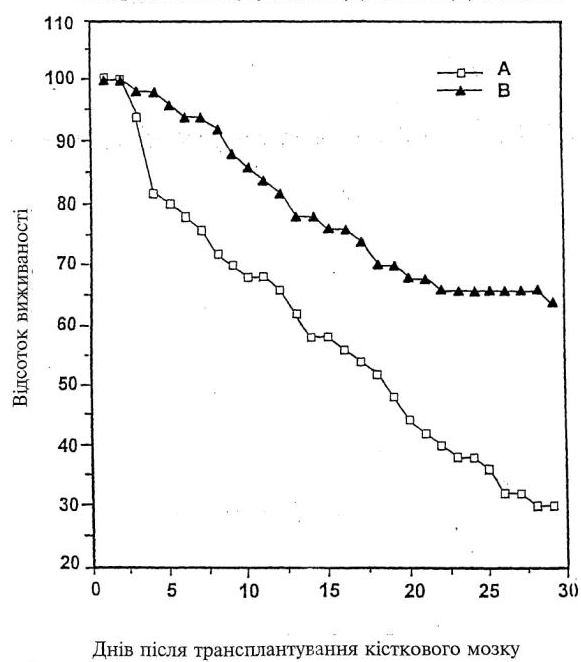
ФІГ. 10А

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



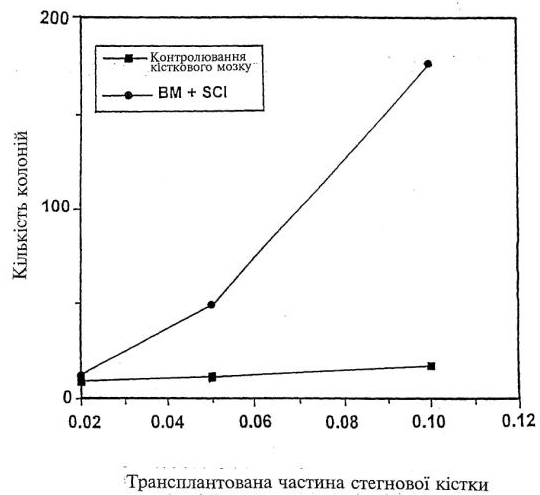
ФІГ. 10В

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



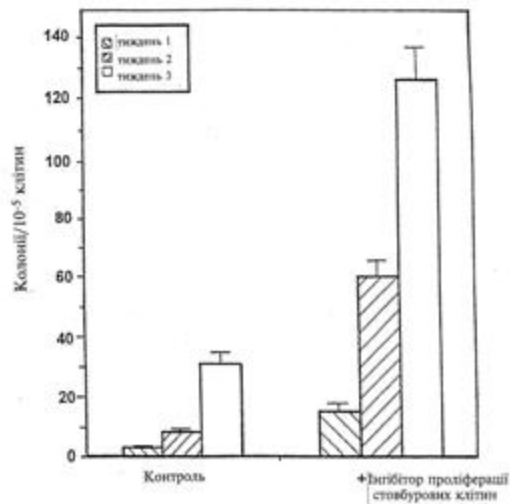
ФІГ. 11

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



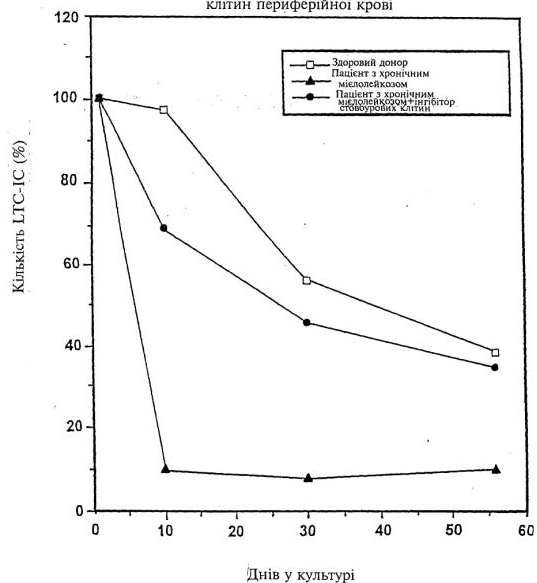
ФІГ. 12

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



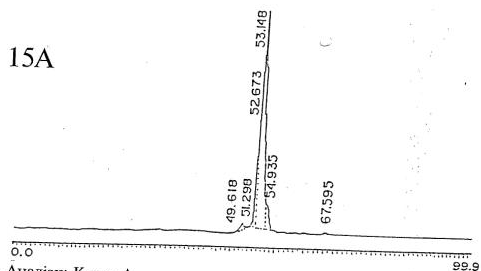
ФІГ. 13

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



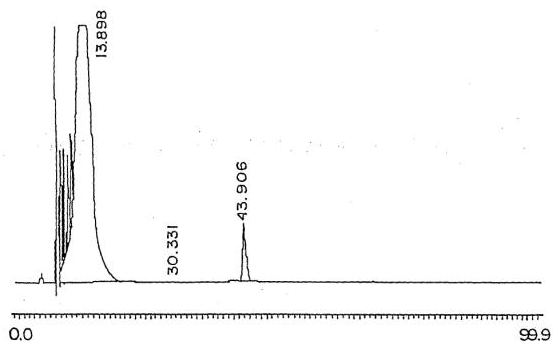
ФІГ. 14

ФІГ. 15A



Аналізи: Канал А

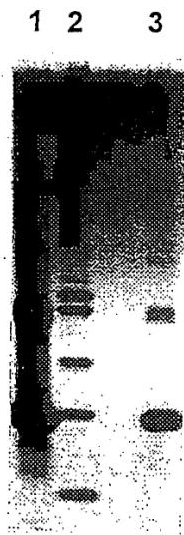
Пік №	Час	Тип	Висота (мкВ)	Площа (мкВ-сек)	Площа %
	3.126	N1	891	7578	0.041
	3.315	N2	1011	5150	0.027
1	49.618	N	8584	349227	1.893
2	51.298	N	1456	20274	0.109
3	52.673	N1	138069	2633395	14.278
4	53.148	N2	271587	14050458	75.181
5	54.935	N3	33016	1332820	7.226
6	67.595	N	3270	44507	0.241
ЗАГАЛЬНА ПЛОЩА				18443409	99.996



Аналізи: Канал А

Пік №	Час	Тип	Висота (мкВ)	Площа (мкВ-сек)	Площа %
1	4.383	N1	3945	95125	0.119
2	5.080	N2	28639	330889	0.413
3	5.216	N3	49084	531867	0.665
4	7.980	N1	399424	1110511	1.389
5	8.100	Err	1203320	2882013	3.605
6	8.241	N3	443249	1506159	1.884
7	8.386	N4	481563	2185702	2.734
8	8.533	N5	412886	1826165	2.284
9	8.701	N6	321500	842122	1.053
10	8.745	N7	404661	1610380	2.014
11	8.995	N8	435765	2489721	3.114
12	9.316	N9	517790	4801831	6.007

ФІГ. 15В



ФІГ. 15С

ФІГ. 16А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Val	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	His
GTG	CTG	TCT	CCC	GAC	AAG	ACC	AAC	GTC	AAG	GCC	GCC	TGG	GCT	AAG	GTC	GCC	GCC	GAC	
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys
GCT	GCC	GAG	TAT	GCT	GCG	GAG	GCC	CTG	GAG	AGG	ATG	TTC	CTG	TCC	TTC	CCC	ACC	ACC	AAG
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu	Ser	His	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys
ACC	TAC	TTC	CCG	CAC	TTC	GAC	CTG	AGC	CAC	GCC	TCT	GCC	CAG	GTT	AAG	GCC	CAC	GCC	AAG
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu
AAG	GTC	GCC	GAC	GCC	CTG	ACC	AAC	GCC	CTG	GCG	CAC	GTC	CAC	GAC	ATG	CCC	AAC	GCC	CTG
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn	Phe	Lys	Leu
TCC	CCC	CTG	AGC	GAC	CTG	CAC	GCG	CAC	AAG	CTT	CGG	CTG	CAC	CCG	GTC	AAC	TTC	AAG	CTC
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala
CTA	AGC	CAC	TGC	CTG	CTG	GTC	ACC	CTG	GCC	GCC	CAC	CTC	CCC	GAG	TTC	ACC	CCC	GCG	
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Val	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr
GTG	CAC	GCC	TCC	CTG	GAC	AAG	TTC	CTG	GCT	TCT	CTG	AGC	ACC	CTG	CTG	ACC	TCC	AAA	TAC

# ФІГ. 16B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val  
GTG CAC CTG ACT CCG CAG CAG AAG TCT GCC GGT ACT GGC CTG TCG GCG AAG GTG AAC CTG

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40  
Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg  
CAT GAA GTT GGT GGT GAG GGC CTG GGC AGG CTG CTG CTG CTG TAC CTT TCG ACC CAG AGG

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60  
Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val  
TTC TTT CAG TCC TTT GCG CAT CTG TCC ACT CCG CAT GGT GTT ATG GGC AAC CCG AAG CTG

61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80  
Lys Ala His Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn  
AAG CCG CAT GCG AAG AAA CTG CTG GGT GGC TTT ACT GAT GCG CTG CCG CAC CTG CAC AAC

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100  
Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu His Val Asp Pro  
CTC AAG CCG ACC TTT GCG ACA CTG AGT GAG CTG CAC TGT CAC AAG CTG CAC CTG CAT CCG

101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120  
Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys  
CAG AAC TTC AGG CTG CTG GGC AAC CTG CTG CTG TGT CTG CTG GCG CAT CAC TTT GCG AAA

121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140  
Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala  
GAA TTC ACC CCA CCA CTG CAG GGT GCG TAT CAG AAA GTG GTG GGT GTG GGT AAT GCG

141 142 143 144 145 146  
Leu Ala His Lys Tyr His  
CTG GCG CAC AAG TAT CAC

# ФІГ. 16C

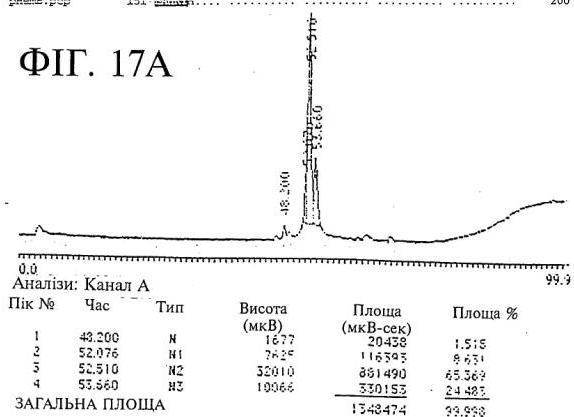
hHemA.per 1 VLS-ADP-NV VKAMGNGV HA-EPYCAH ES-SVET-PS NS-CTFRPH 50  
hHemB.per 1 VHS-DEER-SM VTA-PEK-NT -NVDVGCSEA ES-SVET-PS NS-CTFRPH 50  
mHemA.per 1 VLS-DEER-SM VKAMGNGV HA-EPYCAH ES-SVET-PS NS-CTFRPH 50  
mHemB.per 1 VHS-DEER-SM VKAMGNGV HA-EPYCAH ES-SVET-PS NS-CTFRPH 50  
pHemA.per 1 VLS-DEER-SM VKAMGNGV HA-EPYCAH ES-SVET-PS NS-CTFRPH 50  
pHemB.per 1 VHS-DEER-SM VKAMGNGV HA-EPYCAH ES-SVET-PS NS-CTFRPH 50

hHemA.per 51 MLEH-DAVAGS VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 100  
hHemB.per 51 MLEH-DAVAGS VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 100  
mHemA.per 51 MLEH-DAVAGS VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 100  
mHemB.per 51 MLEH-DAVAGS VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 100  
pHemA.per 51 MLEH-DAVAGS VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 100  
pHemB.per 51 MLEH-DAVAGS VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 100

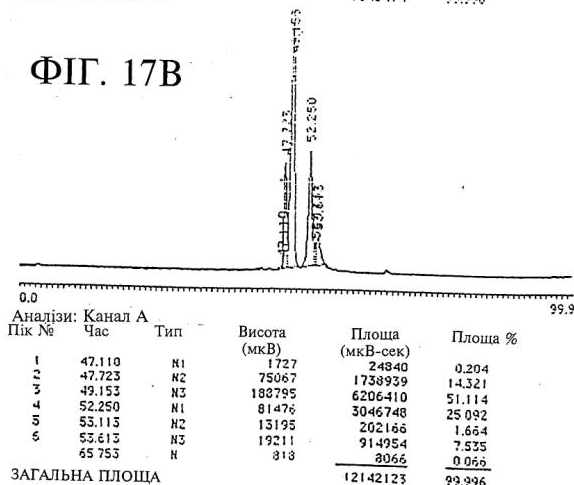
hHemA.per 101 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 150  
hHemB.per 101 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 150  
mHemA.per 101 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 150  
mHemB.per 101 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 150  
pHemA.per 101 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 150  
pHemB.per 101 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 150

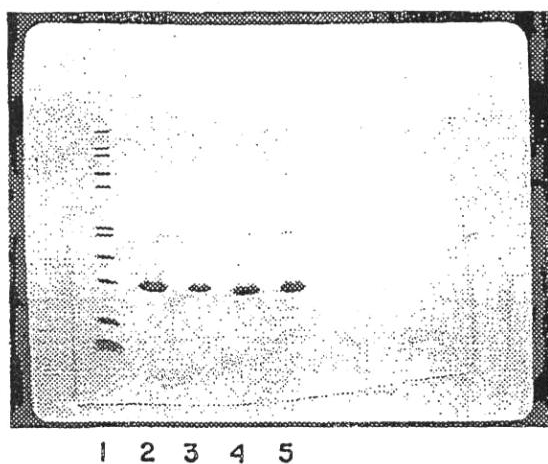
hHemA.per 151 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 200  
hHemB.per 151 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 200  
mHemA.per 151 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 200  
mHemB.per 151 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 200  
pHemA.per 151 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 200  
pHemB.per 151 EAKLKVDP VKVKAHNGS VADNMT-AN-DEP-PS AL-DEP-PS 200

# ФІГ. 17A



# ФІГ. 17B

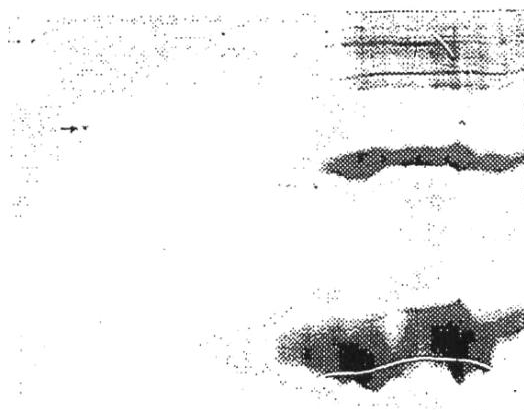




Фиг. 18

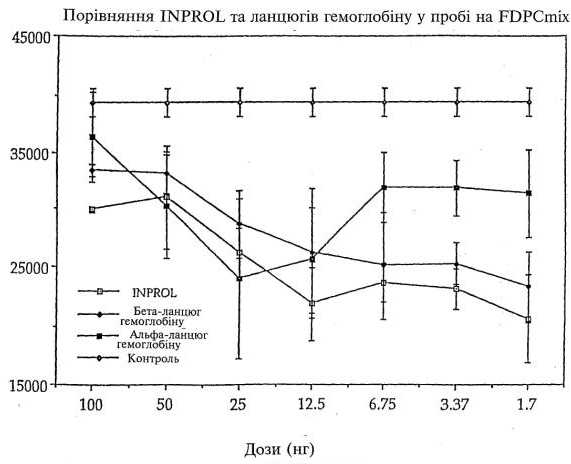


Фиг. 19А

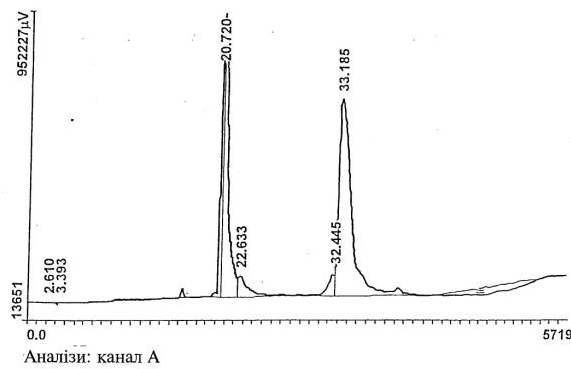


Фиг. 19В

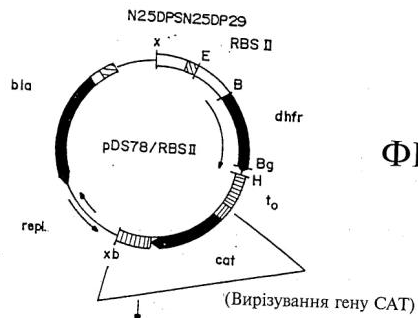
ФІГ. 20



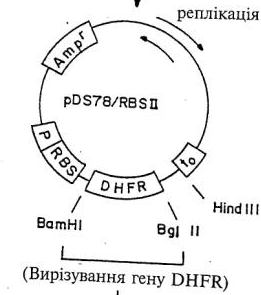
ФІГ. 21



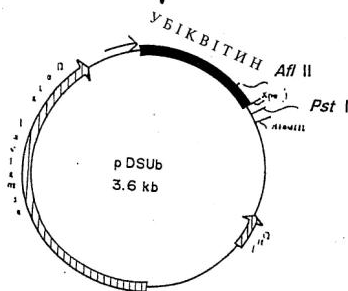
ФІГ. 22А



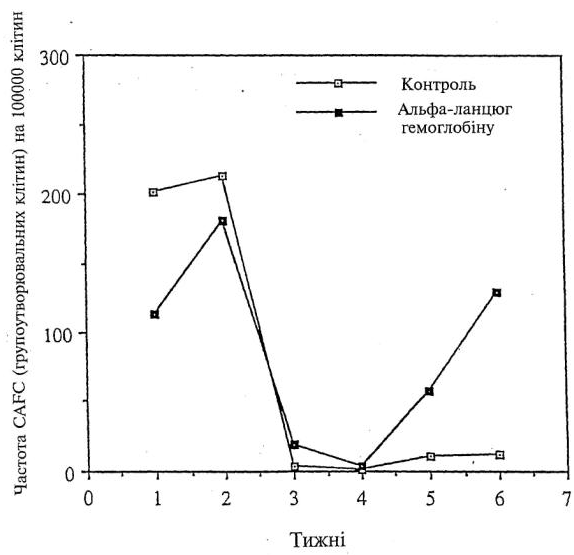
ФІГ. 22В



ФІГ. 22С







ФІГ. 23