



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



F1000117468B

(10) FI 117468 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

31.10.2006

(51) Kv.lk. - Int.kl.

A61K 38/42 (2006.01)
C07K 14/805 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

971000

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

11.03.1997

(24) Alkupäivä - Löpdag

29.09.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

28.05.1997

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US95/12268

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

30.09.1994 US 316424 P

28.09.1995 US 535882 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Wellstat Therapeutics Corporation, 1530 East Jefferson Street, Rockville, MD 20852, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Kozlov,Vladimir, Kolyvanskaya, 8-7, Novosibirsk, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

2 •Tsyriova,Irena, 8204 Castlebury Terrace, Gaithersburg, MD 20879, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Wolpe,Stephen D., 10821-200 Hampton Mills, Terrace, Rockville, MD 20852, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Turun Patenttitoimisto Oy
PL 99, 20521 Turku

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Kantasolujen lisääntymisen inhibiittoreita
Inhibitorer av proliferation av stamceller

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 5334706 A, WO 92/20369 A1, WO 91/04274 A1

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnössä on kuvattu menetelmiä, joista on myös esitetty patenttivaatimukset, jotka koskevat kantasoluja inhiboivien tekijöiden eristystä ja käyttöä epänormaalin kantasolun solukierron säätelyä ja perifeeraalisen veren solujen uudistumisen kiihdyttämiseksi kemoterapian jälkeen. Keksinnössä on myös kuvattu kantasolujen lisääntymisen inhibiittoreita, joista on myös esitetty patenttivaatimukset.

Uppfinningen skildrar och ställer patentkrav gällande förfaranden utsett för isolering och användning av stamcell hämmande faktorer för reglering en abnormal cellcykel och för accelelering av återhämtning av celler i perifer blod. Uppfinningen skildrar och ställer patentkrav gällande inhibitorer av proliferation av stamceller.

Kantasolujen lisääntymisen inhibiittoreita - Inhibitorer av proliferation av stamceller

5 **Keksinnön ala**

Keksintö liittyy oheisten patenttivaatimusten mukaisiin tuotteisiin, käyttöihin, menetelmiin ja farmaseuttisiin koostumuksiin.

Keksinnön tausta

- 10 Useimmat uudistuvissa järjestelmissä esiintyvät terminaalisen vaiheen solut ovat lyhytikäisiä ja niiden tilalle on muodostuttava jatkuvasti uusia soluja koko yksilön elämän ajan. Esimerkiksi verisolut ovat peräisin multipotenttien hematopoieettisten kantasolujen (HSC) itsestään uudistuvasta populaatiosta. Hematopoieettiset kantasolut ovat hematopoieettisten solujen alapopulaatio.
- 15 Hematopoieettisia soluja voidaan saada esimerkiksi luuytimestä, napaverestä tai perifeeraalisesta verestä (joko mobilisoitumattomina tai mobilisoituina reagenssilla, kuten G-CSF:lla); hematopoieettisia soluja ovat kantasolupopulaatio, esiastesolut, erilaistuneet solut, apusolut, stroomasolut ja muut solut, jotka myötävaikuttavat kypsien verisolujen muodostumiselle
- 20 välttämättömän ympäristön muodostumiseen. Koska hematopoieettiset kantasolut ovat tarpeellisia kaikkien hematopoieettisen ja immuunijärjestelmien kypsien solujen kehittymiselle, niiden elossa pysyminen on olennaista täysin toimintakykyisen isännän puolustusjärjestelmän muodostumiselle uudelleen potilailla, joiden hoitoon on käytetty kemoterapiaa
- 25 tai muita aineita.

- Hematopoieettisten solujen muodostumista säätelee ryhmä tekijöitä, jotka stimuloivat hematopoieettisten solujen kasvua ja erilaistumista ja joista tekijöistä tiettyjä, esimerkiksi erytropoietiinia ja G-CSF:ää, käytetään nykyisin
- 30 hoitokäytössä. Yksi osa kontrolliverkostoa, jota ei ole laajamittaisesti luonnehdittu, on kuitenkin se takaisinsyöttömekanismi, joka muodostaa säätelyilmion negatiivisen haaran [Eaves, et al., Blood 78 (1991) 110 - 117].

- Lord ja hänen työtoverinsa ovat varhaisissa tutkimuksissaan osoittaneet, että
- 35 normaaleissa hiiren ja sian luuydinuutteissa esiintyy liukoinen proteiinitekijä, joka kykenee inhiboimaan palautuvasti hematopoieettisten kantasolujen solukierron [Lord, et al., Br. J. Haem. 34 (1976) 441 - 446. Tälle inhiboivalle

aktiivisuudelle (suhteellinen moolimassa 50 - 100 kD) annettiin nimitys kantasolujen inhibiittori (SCI).

Tämän tekijän puhdistusta primaarisista materiaali-
 5 lähteistä ei suoritettu siitä syystä, että in vivo -olosuhteissa suoritettua määrityksessä esiintyi luontaisia vaikeuksia, joissa vaadittiin suuria määriä säteilytettyjä hiiriä. Kun Pragnell yritti työtovereineen selvittää näitä ongelmia, he kehittivät in vitro -olosuhteissa suoritettavan määrityksen, joka oli tarkoitettu primitiivisten hematopoieettisten solujen (CFU-A) havaitsemiseksi ja he seuloivat solulinjoja, jotka toimisivat
 10 inhibitorisen aktiivisuuden lähtömateriaalina [tätä kysymystä on käsitelty julkaisussa Graham, et al., Nature 344 (1990) 442 - 444].

Koska makrofagit oli varhaisissa tutkimuksissa tunnistettu mahdollisiksi kantasolujen inhibiittorimateriaalin lähteiksi [Lord, et al., Blood Cells 6 (1980)
 15 581 - 593], valittiin käyttöön hiiren makrofagisolulinja J774.2 [Graham, et al., Nature 344 (1990) 442 - 444]. Graham, et al. käyttivät puhdistamiseen tämän solulinjan kasvatukseen käytettyä elatusainetta; eristettiin inhibitorinen peptidi, joka osoittautui olevan identtinen aikaisemmin kuvatun sytokiinin, makrofagien tulehdusproteiini-1-alfan (MIP-1 α) suhteen. Siten MIP-1 α eristettiin solulinjasta
 20 eikä primaarisesta materiaalista. Vaikkakin Graham, et al. havaitsivat, että MIP-1 α :aa vastaan suunnattu vasta-aine hävitti puhdistamattoman luuydinuutteen aktiivisuuden, ovat muut tutkijat osoittaneet, että muut inhiboivat aktiivisuudet ovat tärkeitä. Esimerkiksi Graham, et al. [J. Exp. Med. 178 (1993) 925 - 32] ovat ehdottaneet, että hematopoieettisten kantasolujen
 25 primaarinen inhibiittori on TGF β eikä MIP-1 α . Lisäksi Eaves, et al. [PNAS 90 (1993) 12015 - 19] ovat ehdottaneet, että sekä MIP-1 α että TGF β esiintyvät optimaalista pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa luuytimessä ja että inhibitio vaatii näiden kahden tekijän välistä synergiaa.

Muut tutkijat ovat kuvanneet muita kantasolujen inhibitorisia tekijöitä. Frindel on työtovereineen edistänyt fetaalisesta vasikan luuytimeistä ja maksauutteista tetrapeptidin, jolla on kantasoluja inhiboivia aktiivisuuksia [Lenfant, et al., PNAS 86 (1989) 779 - 782]. Paukovits, et al. [Cancer Res. 50 (1990) 328 -
 30 332] ovat luonnehtineet pentapeptidin, joka monomeerisessä muodossaan on kantasolujen solukierron inhibiittori ja dimeerisessä muodossaan stimulaattori. Muiden tekijöiden on myös väitetty olevan inhibitorisia in vitro -olosuhteissa useissa erilaisissa järjestelmissä [näitä kysymyksiä on käsitelty julkaisuissa

Wright ja Pragnell, teoksessa Bailliere's Clinical Haematology v. 5, pp. 723 - 39, 1992 (Bailliers Tindall, Paris)]

- 5 Tsyrova, et al., SU 156 1261 A1 ovat kuvanneet kantasolujen lisääntymisen inhibiittorin puhdistusmenetelmän.

- 10 Tähän päivämäärään mennessä ei mitään näistä tekijöistä ole hyväksytty kliiniseen käyttöön. On kuitenkin olemassa tarvetta saada käyttöön tehokkaita kantasolujen inhibiittoreita. Kemoterapiaan tai sädehoitoon liittyvä tärkein toksisuus on normaalien lisääntyvien solujen tuhoutuminen, mikä voi johtaa luuytimen toiminnan estymiseen tai gastrointestinaaliseen toksisuuteen. Tehokas kantasolujen inhibiittori suojaisi näitä soluja ja antaisi mahdollisuuden optimoida näitä hoito-ohjelmia. Aivan samalla tavoin kuin on osoitettu olevan tarvetta saada käyttöön useita erilaisia stimuloivia sytokiinejä
- 15 (toisin sanoen sytokiinejä, kuten IL-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, erytropoietiini, trombopoietiini, kantasolutekijä, flk2/flt3-ligandi ja muut näitä vastaavat sytokiinit, jotka stimuloivat hematopoieettisten solujen solukiertoa) kulloinkin kyseessä olevan
- 20 kliininen tapauksen mukaan, on myös todennäköistä, että erilaisia klinisiä käyttötarpeita varten tarvittaisiin useita erilaisia inhibitorisia tekijöitä.

- 25 Hemoglobiini on erittäin muuttumattomana pysyvä tetrameerinen proteiini, jonka suhteellinen moolimassa on noin 64 000 daltonia. Se koostuu kahdesta alfa-ketjusta ja kahdesta beeta-ketjusta. Kukin ketju sitoo yhden hemimolekyylin (ferroprotoporfyriini IX), joka on rautaa sisältävä prosteettinen ryhmä. Selkärankaisten alfa- ja beeta-ketjut ovat todennäköisesti peräisin yhdestä kantageenistä, joka duplikoitui ja tämän jälkeen kehittyi eri suuntiin; näiden kahden ketjun sekvenssi on säilynyt huomattavan identtisinä sekä toisiinsa verrattuna että useiden eri selkärankaisten välillä (ks. kuvio 16A).
- 30 Kromosomin 16 sisältämä alfa-ketjun ryhmittymä sisältää ihmisissä 2 alfa-geeniä (alfa₁ ja alfa₂), jotka koodaavat identtisiä polypeptidejä, sekä geenejä, jotka koodaavat muita alfaa muistuttavia ketjuja: zetaa, thetaa ja useita pseudogeenejä, joille ei tapahdu transkriptiota (ks. kuvio 16B, joissa on esitetty ihmisen alfa-ketjun cDNA- ja aminohapposekvenssit). Kromosomin 11
- 35 sisältämä beeta-ketju-ryhmittymä sisältää yhden beeta-ketjun geenin ja useita beetaa muistuttavia geenejä: delta, epsilon, G gamma ja A gamma, sekä vähintään 2 ilmentymätöntä pseudogeenia (ks. kuvio 16C, jossa on esitetty

ihmisen beeta-ketjun cDNA- ja aminohapposekvenssit).

Näiden geenien ilmentyminen vaihtelee yksilönkehityksen aikana. Ihmisen hematopoieesissa, joka on luonnehdittu perusteellisesti, syntetisoivat alkion erytroblastit kahdesta zeta-ketjusta ja kahdesta epsilon-ketjusta muodostuvia tetrameereja (Gower I), kahdesta alfa-ketjusta ja kahdesta epsilon-ketjusta muodostuvia tetrameereja (Gower II) tai kahdesta zeta-ketjusta ja kahdesta gamma-ketjusta muodostuvia tetrameereja (Hb Portland). Embryogeneesin edistyessä koostuu vallitseva muoto fetalisesta hemoglobiinista (Hb F), joka koostuu kahdesta alfaketjusta ja kahdesta gammaketjusta. Aikuisen hemoglobiini (2 alfa- ja 2 beeta-ketjua) alkaa syntetisoida sikiökauden aikana; syntymähetkellä noin 50 % hemoglobiinista on aikuismuotoista ja siirtymävaihe on mennyt loppuun noin 6 kuukauden iässä. Aikuisessa ylivoimaisesti suurin osa hemoglobiinista (noin 97 %) on muotoa, joka sisältää 2 alfa- ja 2 beeta-ketjua (Hb A), ja siinä on havaittavissa pieniä määriä Hb F -ketjua tai deltaketjua (Hb A₂).

Hemiä on tutkittu perusteellisesti sen suhteen, miten se vaikuttaa hematopoieesiin [tätä kysymystä tarkastelevia katsauksia ovat Sassa, S., Seminars Hemat. 25 (1988) 312 - 20, ja Abraham, N., et al., Int. J. Cell Cloning 9 (1991) 185 - 210]. Hemiä tarvitaan erytroblastien kypsymiseen; in vitro -olosuhteissa hemiini (klooriferroprotoporfyriini IX - tosin sanoen hemi, joka sisältää ylimääräisen kloridi-ionin) lisää CFU-GEMM-, BFU-E- ja CFU-E- yksikköjen lisääntymistä. Samalla tavoin hemiini lisää solupitoisuutta pitkän aikaa viljeltävissä luuydinviljelmissä.

1. Syövän kemoterapia ja sädehoito

Stimuloivia kasvutekijöitä koskeva tuloksia tuottanut tutkimus johtanut siihen, että useita näitä tekijöitä (erytropoietiinia, G-CSF:ää, GM-CSF:ää ja muita vastaavia tekijöitä) käytetään kliinisesti. Nämä tekijät ovat vähentäneet kemoterapeuttisiin ja sädehoito-ohjelmiin liittyvää kuolevuutta ja sairastavuutta. Kemoterapiaa tai sädehoitoa saavat potilaat voisivat vielä hyötyä kliinisesti muista vaihtoehtoisista strategioista, joihin kuuluisi se, että kantasolujen siirtyminen solukiertoon estettäisiin, mikä suojaisi niitä toksisilta sivuvaikutuksilta.

II. Luuytimen siirto

Luuytimen siirto (BMT) on käyttökelpoinen useiden erilaisten hematologisten sairauksien, autoimmuunisairauksien ja syöpäsairauksien hoitomuoto; nykyisin käytössä oleviin hoitomuotoihin sisältyvät hematopoieettiset solut, jotka on otettu talteen napaverestä tai perifeeraalisesta verestä (joko mobilisoidumattomina tai mobilisoituina aineilla, kuten G-CSF:lla) sekä luuytimestä. Nykyisin käytetään hematopoieettisten solujen manipulointia ex vivo -olosuhteissa primitiivisten kantasolujen kasvattamiseksi siirtoon soveltuvaksi solupopulaatioksi. Tämän menetelmän optimointiin tarvitaan: (1) riittävä määrä kantasoluja, jotka kykenevät säilyttämään hematopoieesin rekonstituointikyvyn pitkän aikaa; (2) käänteishyljintää aikaansaavien T-lymfosyyttien määrän vähentämistä ja (3) jäljellä olevien malignien solujen puuttumista. Tätä menetelmää voidaan optimoida käyttämällä siinä lisäksi kantasolujen inhibiittor(e)i(t)a solujen kasvattamiseksi ex vivo -olosuhteissa.

Jäljellä olevien malignien solujen eliminoimiseksi suoritettavan hematopoieettisten solujen puhdistamisen tehokkuus sytotoksisia lääkkeitä käyttäen on rajoitettua, mikä johtuu näiden yhdisteiden toksisuudesta normaaleille hematopoieettisille soluille ja erityisesti kantasoluille. On olemassa tarvetta saada käyttöön tehokas normaalien solujen suojauskeino soluja puhdistettaessa; suojaus voidaan saada aikaan siirtämällä kantasolut pois solukierrosta tehokasta inhibiittoria käyttäen.

III. Perifeeraalisen veren kantasolujen talteenotto

Perifeeraalisen veren kantasoluista (PBSC) saadaan autologisen siirron kyseessä ollessa useita potentiaalisia etuja luuytimeen verrattuna. Sellaisten potilaiden perifeeraalisesta verestä, joilta ei löydy luuytimen talteenottoon sopivia kohtia siitä syystä, että näissä on tuumori tai siksi, että niihin on annettu aikaisemmassa vaiheessa sädehoitoa, voidaan kuitenkin ottaa talteen kantasoluja. Veressä esiintyviä kantasoluja käytettäessä jäävät yleisanestesia ja kirurgiset toimenpiteet tarpeettomiksi potilailla, jotka eivät siedä näitä. Veren talteenottoon tarvittava afereesitekniikka on tehokas ja se on käytettävissä yleisesti useissa suurissa lääketieteellisissä keskuksissa. Tämän menetelmän tärkeimmät rajoitukset ovat sekä kantasolujen pieni normaali esiintymistiheys dynaamisessa tasapainossa perifeeraalisessa veressä että solukierron voimakas esiintyminen sellaisten mobilisointimenetelmien jälkeen, joissa on käytetty lääkkeitä tai kasvutekijöitä (esimerkiksi syklofosfamidia, G-CSF:ää,

kantasolutekijää). Tehokas kantasolujen inhibiittori olisi käyttökelpoinen näiden solujen palauttamiseksi lepotilaan, mikä siten estäisi niiden erilaistumisesta johtuvan menettämisen.

5 IV. Liikalisääntymishäiriöiden hoito

- Useille sairauksille on luonteenomaista solujen liikalisääntymistila, jossa kantasolujen säätelyhäiriö saa aikaan loppuvaiheen solujen liiallisen muodostumisen. Näitä sairautiloja ovat mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, psoriaasi, jossa esiintyy epidermisolujen liikamuodostusta sekä gastrointestinaalikanavassa esiintyvät premalignit sairaudet, joille on luonteenomaista polyyppien ilmaantuminen suoleen. Kantasolujen inhibiittori olisi
- 10 käyttökelpoinen näiden sairauksien hoidossa.

V. Geenien siirto

- 15 Kykyä siirtää geneettistä informaatiota hematopoieettisiin soluihin käytetään nykyisin hyväksi kliinisessä käyttöympäristössä. Hematopoieettiset solut ovat käyttökelpoisia geeniterapian kohteita, koska niitä päästään helposti käyttämään hyväksi, tämän kudoksen käsittelystä ja hoidosta on laaja-alaista kokemusta ja ne ovat käyttökelpoisia siitä syystä, että verisolut kykenevät
- 20 tunkeutumaan kudoksiin. Lisäksi tiettyjä ihmisen geenivirheitä voidaan mahdollisesti kyetä korjaamaan liittämällä toiminnallinen geeni ihmisen hematopoieettisen järjestelmän alkeellisiin kantasoluihin.

- Geenien liittämiseksi ihmisen hematopoieettisiin soluihin, mihin käytetään joko
- 25 retrovirusvektoreihin tai fysikaalisiin menetelmiin perustuvaa geeninsiirtoa, on olemassa useita rajoituksia: (1) koska kantasolujen esiintymistiheys hematopoieettisissa kudoksissa on pieni, niin tämä on tehnyt tarpeelliseksi kehittää erittäin tehokkaita geeninsiirtomenetelmiä; ja (2) kantasolujen solukierron nopeuttaminen on osoittautunut parantavan niiden infektoitumisherkkyttä
- 30 vektorilla, mutta infektiotekijöiden nostaminen stimuloimalla kantasolujen lisääntymistä kasvutekijöillä vaikuttaa negatiivisesti geenin ilmentymiseen pitkän ajan kuluessa, koska transgeenejä sisältävät solut pakotetaan erilaistumaan palautumattomasti ja ne menettävät uudistumiskykynsä. Näitä ongelmia voidaan vähentää käyttämällä kantasolujen inhibiittoria, jonka
- 35 tarkoituksena on estää erilaistuminen ja solujen oma uudistumiskyky.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö liittyy kantasolujen lisääntymisen inhibiittoreina ("INPROL") toimiviin polypeptideihin ja niiden käyttöön. Keksintö on esitetty tarkemmin oheisissa patenttivaatimuksissa.

5

Keksintö sisältää INPROL'ia sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia, jotka on tarkoitettu useiden eri sairauksien hoitamiseen, kuten farmaseuttisen koostumuksen, joka on tunnettu siitä, että se sisältää (a) INPROL'ia ja (b) vähintään yhtä inhibitorista yhdistettä, joka on valittu joukosta, jossa on MIP-10 1 α , TGF β , TNF α , INF α , INF β , INF γ , pyroGlu-Glu-Asp-Cys-Lys-pentapeptidi, N-asetyyli-Ser-Asp-Lys-Pro-tetrapeptidi ja glutationi-tripeptidi (Gly-Cys- γ Glu), mainitun INPROL'in ollessa alla määritelty peptidi PEP.

Keksintö sisältää lisäksi farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää (a) 15 INPROL'ia ja (b) vähintään yhtä stimuloivaa yhdistettä, joka on valittu joukosta, jossa on IL-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, erytropoietiini, trombopoietiini, kantasolutekijä ja flk2/flt3-ligandi, mainitun INPROL'in ollessa alla määritelty peptidi PEP.

20

Tässä selitysosassa kantasolut voivat olla hematopoieettisia kantasoluja, jotka tavallisesti esiintyvät ja jakautuvat luuytimessä. Kantasolut voivat olla vaihtoehtoisesti epiteelikantasoluja, jotka sijaitsevat esimerkiksi suolessa tai 25 päänahassa tai muilla alueilla ruumiissa, tai ne voivat olla lisääntymiselimissä sijaitsevia sukusoluja.

Tämä keksintö sisältää myös peptidin, jonka sekvenssi on:

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

30 Tämä keksintö sisältää myös syklisen peptidin jonka sekvenssi on

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

jossa kaksi Cys-ryhmää muodostavat disulfidisidoksen tai liittyvät toisiinsa 35 hiilisillan välityksellä.

Tämä keksintö sisältää myös peptidin, jonka sekvenssi on:

Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala.

- 5 Tämä keksintö sisältää myös jonkin peptidin (PEP), jonka sekvenssi on:

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

Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys (jossa kaksi Cys-ryhmää muodostavat disulfidisidoksen tai liittyvät toisiinsa hiilisillan välityksellä),

- 10 Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala,

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe,

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg,

- 15 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,

- 20 Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe,

Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg,

Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln tai

Tyr-Pro-Trp-Thr,

- 25 käytön valmistettaessa kantasolun lisääntymisen inhiboimiseen tarkoitettua lääkettä.

Keksintö sisältää myös kasvua stimuloivan INPROL-määrän käytön valmistettaessa B-solujen kasvun stimuloimiseen käytettävää lääkettä, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

- 30

Keksintö sisältää edelleen kantasolujen lisääntymistä inhiboivan määrän INPROL'ia käytön valmistettaessa syövän, erityisesti leukemian, hoidossa käytettävää lääkettä, tai valmistettaessa kantasolujen jakautumisen inhiboimiseen nisäkkäässä, jossa on tapahtunut altistumista kantasoluja tuhoavalle tai vahingoittavalle aineelle, kuten antiviraaliselle aineelle, käytettävää lääkettä, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

- 35

Keksintö sisältää menetelmän nisäkkäiden hematopoieettisten kantasolujen säilyttämiseksi ex vivo -olosuhteissa, jossa menetelmässä hematopoieettiset solut saatetaan kosketukseen kantasolujen lisääntymistä inhiboivan INPROL-määrän kanssa, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

Keksintö sisältää myöskin liikalisääntymistä rajoittavan määrän INPROL'ia käytön valmistettaessa myeloproliferatiivisen sairauden tai autoimmuunisairauden tai epiteelikantasolujen liikalisääntymisen nisäkkäissä, joilla näitä sairauksia esiintyy, kuten myelodysplastisen oireyhtymän, hoidossa käytettävää lääkettä, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

Keksintö sisältää kantasoluja suojaavan määrän INPROL'ia käytön valmistettaessa lääkettä, jolla annetaan nisäkkäissä esiintyville normaaleille kantasoluille mutta ei syöpäsoluille differentiaalisesti suoja kemoterapiaa tai säteilyä vastaan, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

Keksintö sisältää INPROL'in käytön valmistettaessa rokotteen lisäainetta, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

Keksintö sisältää lisäksi sellaisen määrän INPROL'ia, joka kääntää liikalisääntymisen kulun päinvastaiseksi käytön valmistettaessa lääkettä, jolla hoidetaan sellaista nisäkästä, jolla kantasolujen liikalisääntyminen on aiheuttanut immunologisen järjestelmän toiminnan heikkenemistä, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

Edelleen keksintö sisältää menetelmäs kantasolujen lisäämiseksi ex vivo-olosuhteissa, joka menetelmä sisältää sen, että hematopoieettiset solut saatetaan kosketukseen INPROL'in ja vähintään yhden stimuloivan sytokiinin kanssa, mainitun INPROL'in ollessa yllä määritelty peptidi PEP.

Hemoglobiinista on eristetty peptidejä (näistä käytetään nimitystä "hemorfiini"), joilla esiintyy opiaatteja muistuttavia aktiivisuuksia [esimerkiksi Brantl, et al., Eur. J. Pharm. 125 (1986) 309 - 10; Davis, et al., Peptides 10 (1989) 747 - 51; Karelin, et al., Bioch. Biophys. Res. Comm. 202 (1994) 410 - 5; Zhao, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci 750 (1995) 452 - 8]. Kukin näistä artikkeleista on liitetty tähän selitysosaan siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Edellä olevien peptidien sekvensseillä on yhtäläisyyksiä muiden opiaattityyppisten peptidien suhteen, kuten Tyr-MIF-1-ryhmän peptidien suhteen [tätä kysymystä on käsitelty katsauksessa Reed, et al., Neurosci. Biobehav. Rev. 18 (1994) 519 - 25], kaseiinista peräisin olevien kaso-

5 morfiinien [Brantl, et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360 (1979) 1211 - 16; Loukas, et al., Biochem. 22 (1983) 4567 - 4573; Fiat ja Jolles, Mol. Cell. Biochem. 87 (1989) 5 - 30] suhteen, sytokromi B:stä peräisin olevien peptidien, joista on käytetty nimitystä sytokrofiinit [Brantl, et al., Eur. J. Pharm.

10 111 (1985) 293 - 4] suhteen sekä sellaisista kombinatoriaalisista kirjastoista peräisin olevien peptidien suhteen, joille on suoritettu seulonta opiaattireseptoreihin sitoutumisen suhteen [tätä kysymystä on käsitelty katsauksessa Dooley, et al., Peptide Research 8 (1995) 124 - 137]. Kukin näistä artikkeleista on liitetty tähän selitysosaan siihen oikeuttavien

15 säännösten nojalla.

Käsillä olevassa selitysosassa kuvataan kantasolujen inhibiittoria (INPROL) joka eroaa tällä alalla tunnetuista inhibiittoreista, kuten MIP-1 α :sta, TGF β :sta, Frindel'in ja hänen työtovereidensa mukaisesta tetrapeptidistä ja Paukovitsin

20 ja hänen työtovereidensa mukaisesta pentapeptidistä (vrt. Wright & Pragnell, 1992 (op cit). Luonnossa esiintyvän INPROL'in suhteellinen moolimassa on ultrasuodatuksen perusteella yli 10 000 daltonia, mikä erottaa sen tetrapeptidistä sekä pentapeptidistä. Se on hydrofobisempi kuin MIP-1 α tai TGF β käänteisfaasikromatografijärjestelmissä, mikä erottaa sen näistä

25 sytokiineista. Lisäksi sen vaikutustapa eroaa kaikista aikaisemmin kuvattujen inhibiittorien vaikutusta vasta siinä mielessä, että se on aktiivinen in vitro -olosuhteissa suoritettavassa määrityksessä käytettynä pelkän esi-inkubointiajan kuluessa. MIP-1 α ei esimerkiksi ole tehokas käytettynä pelkästään esi-inkubointiaikana (esimerkki 5). Lisäksi luonnossa esiintyvä INPROL on

30 aktiivinen määrityksessä, jolla määritetään "suuren lisääntymispotentiaalin soluja" (HPP-PFC), kun taas MIP-1 α ei ole (esimerkki 6).

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuvioissa 1 - 4 on esitetty SDS-polyakryyliamidigeeli, joka on ajettu tuotteesta

35 kunkin puhdistusvaiheen jälkeen.

Kuvio 1 - Kanava 1 on kymotrypsinogeeni, kanava 2 on ovalbumiini, kanava 3

on BSA, kanava 4 on alle 30 kD:n fraktiot, kanava 5 on 30 - 50 kD:n suuriset fraktiot ja kanava 6 on 50 - 100 kD:n suuriset fraktiot.

5 Kuvio 2 - Kanava yksi on ammoniumsulfaattisaostuksen (40 - 80 %) jälkeen ja kanavat 2 - 5 ovat DEAE-fraktioita (kanava #2 edustaa aktiivista fraktiota).

10 Kuvio 3 - Kanava 1 on ammoniumsulfaattisaostuksen jälkeen saatu supernatantti, kanava 2 on aktiivinen DEAE-fraktio, kanavat 3 - 5 edustavat geelisuodatusfraktioita (kanava nro 5 edustaa aktiivista fraktiota)

Kuvio 4 - Kanava 2 edustaa lopputuotetta.

15 Kuvio 5 esittää viimeisen puhdistusvaiheen käänteisfaasi-HPLC-kromatogrammia.

20 Kuvio 6 esittää tritoidun tymidiinin kerääntymistä (cpm) FDCC-mix-solulinjan soluihin ilman INPROL'ia (kontrolli = 0 % inhibitio) ja sian luuytimeistä puhdistetun INPROL'in (pINPROL) useiden eri konsentraatioiden läsnäollessa. Koetulokset on normalisoitu kontrolliarvoja vastaan.

25 Kuvio 7 esittää solukierron S-vaiheessa olevien solujen osuutta sen jälkeen kun hiiriä on käsitelty testosteronipropionaatilla (TSP), TSP:lla sekä pINPROL'illa tai kantaja-aineella (kontrolli). Kukin ryhmä sisälsi 25 eläintä (3 - 4 yhtä ajankohtaa kohti).

Kuvio 8 esittää sellaisten hiirten eloonjäämistä, joita on käsitelty kahdella 5-FU-annoksella ja käytetty pINPROL-käsittelyä tai tämä on jätetty suorittamatta. Kukin ryhmä sisälsi 30 eläintä.

30 Kuvio 9 esittää sellaisten säteilytettyjen hiirten eloonjäämistä, joita oli käsitelty pINPROL'illa tai jätetty käsittelemättä. Kukin ryhmä sisälsi 50 eläintä.

35 Kuvioissa 10 A ja 10 B esitetään normaalin luuytimen pitkäaikaisen soluviljelmän solujen uudistumista 1 viikko (10 A) ja 3 viikkoa (10 B) sen jälkeen kun soluja on käsitelty Ara-C:lla tai Ara-C:lla ynnä pINPROL'illa.

Kuviossa 11 on esitetty hiirten (75 ryhmää kohti) eloonjääminen sen jälkeen

kun niille on annettu tappava säteilyannos ja niihin on siirretty 3×10^4 luuydinsolua, joita ennen siirtoa oli esi-inkuboitu neljän tunnin ajan mediumin (kontrolli) tai pINPROL'in (25 ng/ml) kanssa. Eloojäämistä seurattiin 30 päivän ajan.

5

Kuvio 12 esittää 14 päivän viljelyn jälkeen saatujen CFU-GM-yksiköiden lukumäärää, joka oli saatu luuydinsoluista, jotka olivat peräisin tappavalla annoksella säteilytetyistä hiiristä, joiden luuydin oli uudistettu luovuttajilta saaduilla luuydinsoluilla, joita on esi-inkuboitu neljän tunnin ajan pINPROL'in tai mediumin kanssa.

10

Kuvio 13 esittää pitkäaikaisesta lymfoidisoluviljelmästä peräisin olevaa solususpensiota, jotka solut poistettiin kerran viikossa, pestiin ja esi-inkuboitiin ensin neljä tuntia mediumin tai pINPROL'in kanssa ja maljattiin sitten IL-7:ää (10 ng/ml) sisältäville maljoille.

15

Kuvio 14 esittää pINPROL'illa käsiteltyjen leukemisten perifeeraalisen veren solujen kykyä muodostaa solupopulaatio uudelleen. Pitkäaikaisen viljelmän lähtösolujen (LTC-IC) määrä määritettiin maljaamalla kiinnittyvät ja kiinnittymättömät LTC-solut pINPROL'in kanssa ja ilman tätä ja määrittämällä 7. päivänä CFU-GM. Koetulokset on normalisoitu kontrolliarvojen suhteen.

20

Kuvio 15A on 53-%:isen asetonitriliin kohdalla eluoituvan puhdistetun pINPROL'in C4-käänteisfaasikromatogrammi. Kanava 1 on puhdistamaton materiaali, kanava 2 on suhteellisen moolimassan markkerit ja kanava 3 on puhdistettu materiaali. Kuvio 15B esittää 43,9-%:isen asetonitriliin kohdalla eluoituvan MIP-1 α :n C4-käänteisfaasikromatogrammia. Kuvio 15C esittää puhdistamattoman pINPROL-preparaatin ja käänteisfaasin jälkeen saadun puhdistetun preparaatin SDS-PAGE-kromatogrammia.

25

30

Kuvio 16 esittää hemoglobiinisekvenssejä: kuvio 16A esittää ihmisen alfa-hemoglobiinin cDNA- ja aminohapposekvenssit ja kuvio 16B esittää ihmisen beeta-hemoglobiinin cDNA- ja aminohapposekvenssit. Numerointi on aminohappojen mukainen. Kuvio 16C esittää ihmisen, hiiren ja sian hemoglobiinien alfa- ja beetaketijujen aminohapposekvenssien välistä vertailua.

35

Kuvio 17 on pINPROL'in (kuvio 17A) ja kiteytetyn sian hemoglobiinin (kuvio 17B) C₄-käänteisfaasi-HPLC-piirturijälkien vertailu.

5 Kuvio 18 esittää kiteytetyn sian hemoglobiinin C₄-käänteisfaasi-HPLC-erotuksesta peräisin olevien fraktioiden SDS-PAGE-geeliä. Kanava 1 esittää suhteellisen moolimassan markkereita, kanava 2 esittää ensimmäisestä piikistä (47,11 minuutin kohdalla esiintyvä piikki) peräisin olevia fraktioita 48 - 49, kanava 3 esittää toisesta piikistä (49,153 minuutin kohdalla esiintyvä piikki) peräisin olevia fraktioita 50 - 51, kanava 4 esittää kolmannesta piikistä 10 (52,25 minuutin kohdalla esiintyvä piikki) peräisin olevia fraktioita 54 - 55 ja kanava 5 esittää neljännestä piikistä (53,613 minuutin kohdalla esiintyvä piikki) peräisin olevia fraktioita 56 - 57.

15 Kuvio 19 esittää pINPROL'in (kuvio 19A) ja puhdistetun sian beeta-hemoglobiinin (kuvio 19B) kaksisuuntaisten geielektroforeesien vertailua.

Kuvio 20 esittää niiden vaikutusten vertailua, joita puhdistetulla sian alfa-hemoglobiinilla, beeta-hemoglobiinilla tai p-INPROL'illa on FDCC-MIX-määrityksessä.

20

Kuvio 21 esittää sian hemoglobiinin erottamista käänteisfaasilla loivaa eluointigradienttia käyttäen.

25 Seuraava yksityiskohtainen selitys esitetään selventämään kuvattua keksintöä. Vaikka tämä selitys toimii esimerkkinä tästä keksinnöstä, sen ei ole katsottava rajoittavan tätä keksintöä millään nimenomaisella tavalla ja kaikki ne muunnelmat, jotka ovat ilmeisiä tämän alan ammattikokemuksen perusteella, katsotaan kuuluviksi tämän keksinnön suojapiiriin.

30 Edullisten sovellutusten yksityiskohtainen selitys

INPROL inhiboi palautuvalla tavalla kantasolujen jakautumista. Tarkemmin sanottuna INPROL saa hematopoieettisten kantasolujen solunjakautumisen inhiboitumaan väliaikaisesti. Siten tämän selitysosan mukaista menetelmää voidaan käyttää lievittämään kemoterapian niitä haitallisia sivuvaikutuksia, 35 jotka kohdistuvat potilaan hematopoieettiseen järjestelmään, myeloidiseen järjestelmään ja immunologiseen järjestelmään sillä perusteella, että se suojaa kantasoluja syöpäsolujen tai virusten infektoimien solujen tuhoamiseen

- käytettyjen kemoterapeuttisten aineiden tai säteilytyksen aiheuttamalta vauriolta. Tämän selitysosan yhdessä sovellutusmuodossa INPROL'ia annetaan potilaalle määrä, joka on riittävä inhiboimaan kantasolujen jakautumisen samalla kun kemoterapeuttinen aine vaikuttaa sairastuneisiin soluihin. Kun kemoterapeuttinen aine on suorittanut tehtävänsä, INPROL'in inhiboimat kantasolut muuttuvat ilman jatkokäsittelyä takaisin jakautuviksi soluiksi. Jos hematopoieesin uudistumista on haluttua tehostaa, voidaan lisäksi käyttää stimuloivia kasvutekijöitä tai sytokiinejä.
- 10 Tässä selitysosassa termi "INPROL" sisältää esimerkeissä esitetyllä tavalla puhdistetut nisäkkäiden proteiinit, hemoglobiinin, hemoglobiinin alfaketjun (hemiryhmän kanssa ja ilman tätä), hemoglobiinin beetaketjun (hemiryhmän kanssa tai ilman tätä), alfa- ja beetaketjujen seokset (hemiryhmän kanssa tai ilman tätä) ja näiden proteiinien fragmentit tai analogit, mukaan lukien alkion, sikiön tai aikuisen yksilön muodot (esimerkiksi alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- tai zeta-ketjut joko yksinään tai seoksina, dimeereinä tai multimeereinä joko hemiryhmän kanssa tai ilman tätä), jotka kykenevät inhiboimaan kantasolujen lisääntymistä. Termi "INPROL" sisältää näiden proteiinien luonnossa esiintyvät muodot sekä muodot, joita ei esiinny luonnossa (esimerkiksi yhdistelmä-DNA-menetelmillä muodostetut muodot).
- 25 Tyypillisessä kliinisessä tapauksessa INPROL'ia annetaan potilaalle käyttäen päivittäistä annostusohjelmaa, jossa tätä injektoidaan tai infusoidaan suonensisäisesti kerta-annosmuodossa käyttäen esimerkiksi 0,01 - 100 mg/kg ja edullisesti 0,1 - 1,0 mg/kg INPROL'ia annettuna esimerkiksi 4 - 60 tuntia ennen tavallista kemoterapeuttista hoitoa tai sädehoitoa.
- 30 Vielä yhdessä tämän selitysosan sovellutusmuodossa INPROL'ia käyttäen suoritettu esihoito antaa mahdollisuuden lisätä kemoterapeuttisten aineiden annoksia tai säteilyannoksia potilaiden normaalisti sietämiä annoksia suuremmiksi.
- 35 Suuri osa hematopoieettisista kantasoluista on tavallisesti lepotilassa (muodossa, jossa solukierto ei ole käynnistynyt). Solukierto käynnistyy kuitenkin suurehkossa osassa kantasoluista kemoterapian jälkeen kompensoivana vasteena kemoterapian aikaansaamalle hematopoieettiselle vauriolle, mikä tekee ne erityisen herkiksi myöhemmin annettaville

- sytotoksisten kemoterapeuttisten aineiden annoksille tai sädehoidolle. Sen perusteella, että INPROL-hoito inhiboi tällaisten kantasolujen solukiertoa, on tällaisen hoidon jälkeen mahdollista antaa aikaisemmin tai useammin sytotoksisten kemoterapeuttisten aineiden annoksia joko tavanomaisina annoksina tai annoksia suurentaen.

- Yhdessä tämän selitysosan sovellutusmuodossa annetaan INPROL'ia (0,1 mg - 6 mg - edullisesti 1,0 - 60 mg) noin 24 tuntia - 10 päivää ensimmäisen kemoterapia-annoksen jälkeen. Vielä yhden 4 - 60 tunnin pituisen aikavälin jälkeen, edullisesti 24 - 48 tunnin jälkeen, käytetään toista kemoterapeuttista annosta. Tätä sykliä, jossa kemoterapiaa ja INPROL'ia käytetään vuorotellen, jatketaan siitä saadun terapeuttisen hyödyn mukaisesti. Annosteltavaksi tarkoitetut kemoterapeuttiset aineet ja toimenpiteet valitaan sen perusteella, kuinka ne sopivat tietyn tyyppisiin tuumoreihin tavanomaisen kliinisessä hoitokäytännössä vallitsevan käytännön mukaisesti. Kemoterapian tai sädehoidon jälkeen käytetään mahdollisesti hematopoieettisen toiminnan uudistumisen edistämiseksi stimuloivia kasvutekijöitä, kuten G-CSF:ää ja kantasolutekijää.

- Ex vivo -olosuhteissa suoritettavia sovellutuksia varten käytetään 0,1 - 100 ng/10⁶ solua millilitrassa, ja edullisesti 20 - 50 ng/10⁶ solua millilitrassa.

- Vielä yhdessä tämän selitysosan sovellutusmuodossa INPROL'ia käytetään menetelmässä, joka on tarkoitettu autologisten hematopoieettisten solujen esikäsittelyyn siirtoa varten. Hematopoieettisia soluja käsitellään ex vivo -olosuhteissa tehokkaalla määrällä INPROL'ia kantasolujen jakautumisen inhiboimiseksi ja näistä puhdistetaan tämän jälkeen syöpäsolut käsittelemällä luuydinviljelmiä tehokkaalla määrällä kemoterapeuttista ainetta tai sädettämällä niitä. Edullisia ovat kemoterapeuttiset aineet, jotka ovat spesifisiä solukierrossa oleville soluille. Tällä tavoin käsitelty luuydin injektoidaan takaisin autologiseen luovuttajaan. Potilasta käsitellään mahdollisesti aineella, jonka tiedetään stimuloivan hematopoieesia, hematopoieettisen järjestelmän uudistamiseksi potilaaseen.

- Vielä yhdessä tämän selitysosan sovellutusmuodossa INPROL'ia käytetään tukihoidona leukemian hoidossa. Esimerkiksi sairaustiloissa, joissa leukemiset solut eivät reagoi INPROL'iin, käsitellään leukemisia hematopoieettisia soluja

ex vivo -olosuhteissa INPROL'illa. INPROL'in antaminen estää normaalien kantasolujen lisääntymisen. Normaali kantasolupopulaatio on siten suojattu vaurioitumiselta käsiteltäessä lisääntyviä leukemiasoluja solusyklille spesifisellä sytotoksella aineella. Lisäksi viljelmiin lisätään stimuloivaa sytokiinia, kuten IL-3:a tai GM-CSF:ää, solukierron aikaansaamiseksi leukemisissa soluissa lääkeainehoidon tai sädehoidon aikana samalla kun normaalit kantasolut suojataan INPROL'illa. Potilasta käsitellään leukemisten solujen tuhoamiseksi kemoterapeuttisilla aineilla tai sädehoidolla ja puhdistettu luuydin siirretään takaisin potilaaseen hematopoieettisen järjestelmän uudistumisen aikaansaamiseksi.

Samalla tavoin vielä yhdessä tämän selitysosan sovellutusmuodossa, joka on tarkoitettu vakavan verisolujen tai lymfosyyttien virusinfektion, kuten HIV-infektion, saaneiden potilaiden hoitamiseksi, hematopoieettisia soluja käsitellään ex vivo -olosuhteissa INPROL'illa, minkä jälkeen niitä käsitellään antiviraalisilla aineilla, infektoituneita soluja tuhoavilla lääkeaineilla tai vasta-aineisiin perustuvilla järjestelmillä infektoituneiden solujen poistamiseksi. Myeloablatiivisten antiviraalisten tai myeloablatiivisten kemoterapeuttisten toimenpiteiden jälkeen, jotka suoritetaan viruksen isäntäsolujen poistamiseksi täydellisesti potilaasta, palautetaan INPROL'illa käsitelty luuydinsolut takaisin potilaaseen.

Vielä yhdessä tämän selitysosan sovellutusmuodossa INPROL'ia käytetään kantasolujen liikalisääntymiseen liittyvien sairauksien hoitamiseen. Esimerkiksi psoriaasi on ihon epiteelisolujen liikalisääntymisen aiheuttama sairaus ja sitä hoidetaan joskus sytotoksisilla lääkeaineilla. Muita esineoplastisia vaurioita, joihin liittyy kantasolujen lisääntymistä, on myös mahdollista hoitaa tehokkailla määrillä INPROL'ia, jota käytetään kantasolujen lisääntymisen inhiboimiseen kokonaan tai osittain. Näiden käyttömuotojen kyseessä ollessa käytetään vaihtoehtona INPROL'in antamiselle parenteraalisesti sitä sisältäviä paikalliskoostumuksia tai lääkeainetta transdermaalisesti vapauttavia koostumuksia (esimerkiksi voiteita, vesiä, geelejä tai laastareita) sen mukaan, millainen käytötapa on asiaankuuluvaa. Useimmissa leukemiatapauksissa ovat leukemian esiastesolut erilaistuneita solupopulaatioita, joihin INPROL ei vaikuta ja joita tästä syystä hoidetaan menetelmillä, kuten edellä kuvatuilla menetelmillä, joissa käytetään INPROL'ia. Niissä tapauksissa, joissa leukemian esiastesolut ovat hyvin alkeellisia ja suoraan herkkiä INPROL'n

aikaansaamalle inhibitiolle, rajoitetaan leukemiasolujen lisääntymistä antamalla tehokkaita määriä INPROL'ia.

INPROL-polypeptidejä vastaan suunnattuja vasta-aineita, jotka ovat joko
5 monoklonaalisia tai polyklonaalisia, kehitetään tavanomaisin menetelmin. Nämä vasta-aineet tai INPROL-polypeptidit, varustetaan monentyyppisillä tällä alalla tunnetuilla havaittavilla leimoilla. Leimalla varustettua INPROL'ia tai INPROL'ia vastaan suunnattuja vasta-aineita käytetään tämän jälkeen kantasolujen markkereina kantasolujen tunnistamiseksi ja eristämiseksi antamalla
10 näitä potilaalle suoraan diagnostisia tarkoituksia varten. Näitä leimalla varustettuja polypeptidejä tai vasta-aineita käytetään vaihtoehtoisesti ex vivo -olosuhteissa kantasolujen tunnistamiseksi hematopoieettisten solujen preparaattista, jotta nämä kyettäisiin poistamaan ennen neoplastisten solujen puhdistamista luuytimeä. Samalla tavoin tällaisia leimalla varustettuja
15 polypeptidejä tai vasta-aineita käytetään epiteelisolujen tai muiden kantasolujen eristämiseen ja tunnistamiseen. Lisäksi näitä vasta-aineita, jotka ovat joko leimalla varustettuja tai varustamattomia, käytetään terapeuttisesti sen välityksellä, että ne neutroloivat INPROL'in aktiivisuutta, tai diagnostisesti sen välityksellä, että niillä havaitaan verenkierrossa kiertävän INPROL'in pitoi-
20 suuksia.

INPROL voidaan kloonata ihmisen geeni- tai cDNA-kirjastoista yhdistelmä-
humaani-INPROL'in ilmentämiseksi tavanomaisia menetelmiä käyttäen. Esimerkiksi puhdistetusta proteiinista saatua sekvenssi-informaatiota käyttäen
25 konstruoidaan oligonukleotidikoettimia, jotka voidaan varustaa leimalla, esimerkiksi 32-fosforilla, ja niitä käytetään sopivan cDNA-kirjaston (esimerkiksi luuytimeä peräisin olevan kirjaston) seulontaan. Vaihtoehtoisesti INPROL'ia koodaavia cDNA-molekyylejä seulotaan esiin sopivasta materiaalilähteestä (esimerkiksi luuytimeä) peräisin olevasta ilmentämiskirjastosta käyttäen
30 vasta-ainetta tai käyttäen sopivaa toiminnallista määritystä (esimerkiksi esimerkissä 2 kuvattua määritystä). Itse hemoglobiinia sekä yksittäisiä alfa- ja beeta-ketjuja on kloonattu ja ilmennetty käyttäen tekniikan tason mukaisia menetelmiä [näitä on käsitelty julkaisuissa Pagnier, et al., Rev. Fr. Transfus. Hemobiol. 35 (1992) 407 - 15; Looker, et al., Nature 356 (1992) 258 - 60; Methods in Enzymology 231 (1994)]. Kukin näistä artikkeleista on liitetty tähän selityksosaan siihen oikeuttavien säännösten nojalla.
35

Tämä selitysosassa sisältää DNA-sekvenssejä, joihin on liitetty: kodoneja, jotka "ovat muihin nähden etusijalla" niiden ilmentämiseksi valituissa eukaryotisissa: joissa on käytetty kohtia, joista sekvenssit kyetään pilkkomaan restriktioendonukleasientsyymeillä; ja joissa on käytetty muita aloitus-, lopetus- tai väli-DNA-sekvenssejä, jotka edistävät vaikeuksitta ilmennettävien vektorien konstruointia tai hemoglobiinin alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- ja/tai zeta-ketjun tuottamista tai puhdistusta.

- 10 Tästä selitysosasta saadaan myös käyttöön DNA-sekvenssejä, jotka koodaavat hemoglobiinin alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- tai zeta-ketjujen polypeptidianalogeja tai johdannaisia, jotka poikkeavat luonnossa esiintyvistä muodoista yhden tai useamman aminohapporyhmän identiteetin tai sijainnin kyseessä ollessa (toisin sanoen deleetioanalogit, joissa ei esiinny kaikkia mainittuja ryhmiä; substituutioanalogit, joissa yksi tai useampi mainituista ryhmistä on korvattu muilla ryhmillä; ja additioanalogit, joissa polypeptidin terminaaliseen osaan tai keskiosaan on lisätty yksi tai useampia aminohapporyhmiä) ja joiden yhteisenä piirteenä on luonnossa esiintyvien muotojen jokin ominaisuus tai niiden kaikki ominaisuudet.
- 20 Edullisessa sovellutusmuodossa INPROL on perimän tai cDNA:n kloonauksen tai geenien synteessin avulla saatujen ulkopuolisten DNA-sekvenssien ilmentämistuote, jota on ilmennetty prokaryotisissa tai eukaryotisissa isännässä (esimerkiksi viljellyissä bakteerisoluissa, hiivasoluissa, korkeammassa kasvisoluissa, hyönteissoluissa ja nisäkkäsoluissa). Tämä merkitsee sitä, että edullisessa sovellutusmuodossa INPROL on "yhdistelmä-INPROL". Tyypillisessä hiivaisäntäsoluissa (esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae* -soluissa) tai prokaryotti-isäntäsoluissa (esimerkiksi *E. coli* -soluissa) suoritettua ilmentämisen tuotteen yhteydessä ei esiinny mitään nisäkkäiden proteiineja. Selkärankaissoluissa [esimerkiksi ei-humaani-nisäkkäsoluissa (esimerkiksi COS- tai CHO-soluissa) ja lintujen soluissa] suoritettua ilmentämisen tuotteiden yhteydessä ei esiinny mitään humaaniproteiineja. Käytetyn isännän mukaan voivat tämän selitysosaa mukaiset polypeptidit olla glykosyloituneita tai ei-glykosyloituneita. Tämän selitysosaa mukaiset polypeptidit sisältävät myös mahdollisesti ensimmäisenä aminohapporyhmänä metioniinin (asemassa -1).
- 35

Tämä selitysosassa kattaa myös muut tuotteet, kuten hemoglobiinin alfa-, beeta-,

gamma-, delta-, epsilon- ja/tai zeta-ketjun polypeptidianalogit. Näitä analogeja ovat hemoglobiinin alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- ja/tai zeta-ketjun fragmentit. Tunnettujen menetelmien mukaisesti on mahdollista suunnitella ja valmistaa vaikeuksitta geenejä, jotka koodaavat mikrobeissa ilmentämiseen tarkoitettuja polypeptidejä, joiden primaariset sekvenssit ovat sellaisia, että ne eroavat tässä selitysosassa kuvatuista sekvensseistä yhden tai useamman ryhmän identiteetin tai sijainnin osalta (esimerkiksi substituutiot, terminaaliset ja päiden väliin tehdyt lisäykset ja deleetiot). Vaihtoehtoisesti voidaan cDNA:ta ja perimän geenejä muuttaa vaikeuksitta tunnetuilla kohdemutageneesimenetelmillä ja näitä voidaan käyttää hemoglobiinin alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- tai zeta-ketjujen analogien ja johdannaisten valmistamiseen. Tällaisille tuotteille on yhteisenä piirteenä vähintään yksi INPROL'in biologisista ominaisuuksista mutta ne voivat poiketa tästä muissa suhteissa. Esimerkkeinä on mainittava, että tämän selitysosan mukaiset tuotteet sisältävät alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- tai zeta-ketjuja, joita on typistetty käyttämällä esimerkiksi deleetioita; tai ketjuja, jotka kestävät tavallista paremmin hydrolysoitumista (ja tästä syystä niiden vaikutukset voivat olla voimakkaampia tai pitkäkestoisempia kuin luonnossa esiintyvien ketjujen); tai joita on muutettu yhden tai useamman mahdollisen O-glykosyloitumiskohdan ja/tai N-glykosyloitumiskohdan poistamiseksi tai lisäämiseksi tai joista on poistettu yksi tai useampi kysteiiniryhmä tai niiden tilalla on käytetty esimerkiksi alaniini- tai seriiniryhmiä ja ne ovat helpommin eristettävissä aktiivisessa muodossa mikrobijärjestelmistä; tai joissa yksi tai useampi tyrosiiniryhmä on korvattu fenyyialaniinilla ja jotka sitoutuvat suhteellisen helposti vaikutuskohteena oleviin proteiineihin tai kohdesolujen pinnalla oleviin reseptoreihin. Tässä selitysosassa ajatellaan myös käytettäväksi polypeptidifragmentteja, joissa toistuu ainoastaan osa alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- tai zeta-ketjujen yhtäjaksoisesta aminohapposekvenssistä tai sekundaarisista konformaatioista, joissa fragmenteissa voi esiintyä yksi INPROL'in ominaisuus (esimerkiksi sitoutuminen reseptoriin) eikä muita (esimerkiksi kantasoluja inhiboivaa aktiivisuutta). On merkillepantavaa, että aktiivisuus ei ole välttämätöntä sille, että mikään yksi tai useampi tämän keksinnön mukainen tuote olisi käyttökelpoinen terapeuttisesti (tätä kysymystä on käsitelty julkaisussa Weiland, et al., Blut 44 (1982) 173 - 5. tai käyttökelpoinen muissa yhteyksissä, kuten määrityksissä, joilla selvitetään inhibitorisen tekijän antagonistisuutta. Kompetitiiviset antagonistit ovat käyttökelpoisia niissä tapauksissa, joissa

kantasolujen inhibiittoreja tai sen reseptoria muodostuu liikaa.

Proteiinisekvenssistä voidaan lisäksi syntetoida kemiallisesti vakiomenetelmin peptidejä, joissa on jäljellä biologista aktiivisuutta. Tästä selitysosasta
5 saadaan myös käyttöön sekvenssejä, jotka koodaavat hemoglobiinin alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon- tai zeta-ketjun peptidianalogeja tai johdannaisia, jotka poikkeavat luonnossa esiintyvistä muodoista yhden tai useamman aminohapporyhmän identiteetin tai sijainnin suhteen (esimerkiksi deleetioanalogit, jotka eivät sisällä kaikkia mainittuja ryhmiä; substituutioanalogit, joissa yhden tai useamman mainitun ryhmän tilalla käytetään muita
10 ryhmiä, jotka joko esiintyvät luonnossa tai ovat tällä alalla tunnettuja muita analogeja, kuten D-aminohappoja; ja additioanalogeja, joissa yhtä tai useampaa aminohapporyhmistä on modifioitu kemiallisesti sen stabiilisuuden lisäämiseksi, liukoisuuden lisäämiseksi ja/tai proteolyysin keston lisäämiseksi)
15 ja joille on yhteisenä piirteenä jokin luonnossa esiintyvien muotojen ominaisuuksista tai nämä kaikki ominaisuudet.

Peptidisekvenssejä, kuten edellä kuvattuja sekvenssejä, voidaan tunnistaa usein erilaisin keinoin. Vertaamalla määrittäksessä aktiivisen natiivin
20 hemoglobiinin kolmiulotteisia rakenteita (esimerkiksi alfa-ketjua) rakenteeltaan näitä muistuttaviin proteiineihin, jotka ovat inaktiivisia (esimerkiksi myoglobiiniin), voidaan tunnistaa alueita, joiden konformaatiot poikkeavat näistä kolmiulotteisessa avaruudessa ja jotka tästä syystä ovat ehdolla olevia alueita aktiivisia peptidejä varten. Toisessa lähestymistavassa käytetään hyväksi
25 valikoivaa proteolyysia, jossa proteolyyttisiä entsyymejä käytetään hemoglobiiniketjujen rajoitettuun pilkkomiseen, mistä syntyy peptidejä, jotka voidaan erottaa esimerkiksi käänteisfaasi-HPLC:lla ja joista tämän jälkeen voidaan suorittaa kantasolujen inhibitiomäärittäminen. Peptidejä voidaan myös määrittää syntetisoidulla niillä kemiallisesti (esimerkiksi kiinteän faasin synteeseillä);
30 voidaan valmistaa vaikeuksitta sarja limittäisiä peptidejä (esimerkiksi 15-membraaneja), jotka kattavat tutkittavan hemoglobiinisekvenssin (esimerkiksi alfa-ketjun, ja nämä voidaan tutkia kantasolumäärittäyksissä. Voidaan valmistaa kombinatoriaalisia kirjastoja, joissa suoritetaan useita kemiallisia synteesejä ja joissa valituista aminohappoasemista tehdään muuttuvia, mistä saadaan
35 suuria määriä peptidianalogeja seulontaa varten [esimerkiksi Dooley, et al., Peptide Research 8 (1995) 124 - 137]. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-menetelmiä. Kohdemutageneesia voidaan käyttää sellaisten

kriittisten ryhmien tunnistamiseksi, jotka ovat välttämättömiä tietyn nimenomaisen hemoglobiiniketjun aktiivisuudelle. Ketjussa (esimerkiksi alfa-ketjussa), jonka tiedetään olevan aktiivinen kantasolun inhibiittorina, voidaan niiden alueiden tilalla, joiden tiedetään olevan aktiivisia kantasolun inhibiittorina, käyttää alueita, jotka ovat peräisin tätä ketjua muistuttavasta mutta inaktiivisesta proteiinista (esimerkiksi myoglobiinista) ja näitä voidaan tutkia kantasolumäärytyksissä, minkä avulla on mahdollista tunnistaa aktiivisuudelle välttämättömät alueet. Tällaisia tunnistettuja alueita voidaan ilmentää peptideinä ja niistä voidaan tutkia aktiivisuus kantasolujen solukiertoon perustuvissa määrytyksissä.

Muista lajeista peräisin olevien INPROL'in homologisia tai analogisia muunnelmia käytetään useissa erilaisissa eläinlääketieteellisissä käyttömuodoissa, jotka muistuttavat tässä selitysosassa edellä kuvattuja terapeuttisia sovellutusmuotoja.

INPROL vaikuttaa solukierrossa oleviin kantasoluihin muuttamalla ne "lepo"-tilaan, jossa ne eivät jakaudu. Kun lepotilassa olevat solut halutaan stimuloida käynnistämään jakautumisen, esimerkiksi sen jälkeen kun potilasta on käsitelty kemoterapeuttisilla aineilla tai sädehoidolla, annetaan potilaalle pesäkestimulaatiotekijöitä ja muita hematopoieesia stimuloivia aineita. Esimerkkejä näistä tekijöistä ovat mainittuihin kuitenkin rajoittumatta sytokiinit, kuten IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 tai erytropoietiini.

INPROL-polypeptidejä tai aktiivisia fragmentteja, joissa on kantasoluja inhiboivaa aktiivisuutta, puhdistetaan tai syntetoidaan käyttämällä tavanomaisia kemiallisia menetelmiä yhdistettynä asiaankuuluviin biologisiin määrytyksiin, jotka on tarkoitettu kantasoluja inhiboivan aktiivisuuden havaitsemiseksi, ja joista esimerkkejä on esitetty alla kuvattavissa suoritusohjeissa.

Tämän selitysosan yhdessä sovellutusmuodossa käytetään terapeuttisesti tehokasta määrää INPROL-proteiinia tai tämän terapeuttisesti tehokasta fragmenttia yhdistettynä farmaseuttisesti hyväksyttävään kantaja-aineeseen. Tätä INPROL-koostumusta annetaan tavallisesti injektoimalla tai infusoimalla parenteraalisesti. Käyttöön valitaan saavutettavan terapeuttisen vaikutuksen mukaan annostelutiekse ihonalainen, suonensisäinen tai lihaksensisäinen

injektio.

Annosteltaessa tämän selitysosan mukaisesti käytettäväksi tarkoitettua
terapeuttista koostumusta systeemisesti, se on pyrogeenittoman
5 parenteraalisesti hyväksyttävän vesipitoisen liuoksen muodossa.
Farmaseuttisesti hyväksyttävän steriilin proteiiniliuoksen, jossa on huolehdittu
oikeasta pH:sta, isotonisuudesta, pysyvyydestä, kantajaproteiinista ja muista
näitä vastaavista tekijöistä, valmistaminen kuuluu alan ammattikokemuksen
piiriin.

10

Tässä selitysosassa ajatellaan myös käytettäväksi farmaseuttisia
koostumuksia, jotka sisältävät terapeuttisesti tehokkaita määriä tämän
selitysosan mukaisia polypeptidituotteita yhdistettynä sopiviin INPROL-
hoidossa käyttökelpoisiin laimentimiin, säilyteaineisiin, solubilisointiaineisiin,
15 emulgaattoreihin, lisäaineisiin ja/tai kantaja-aineisiin. "Terapeuttisesti tehokas
määrä" tarkoittaa tässä selitysosassa määrää, joka tuottaa terapeuttisen
vaikutuksen tietyn sairauden ja tietyn hoito-ohjelman kyseessä ollessa. Näitä
koostumuksia ovat nesteet, geelit, voiteet tai lyofilisoitu tai jollakin muulla
tavoin kuivattu formulaatio ja ne sisältävät laimentimia, jotka ovat pH-
20 arvoltaan ja ionivahvuudeltaan sopivia ja jotka sisältävät useita erilaisia
puskureita (esimerkiksi Tris-HCl:ää, asetaattia, fosfaattia), lisäaineita, kuten
albumiinia tai gelatiinia pintoihin tapahtuvan adsorboitumisen estämiseksi,
detergenttejä (esimerkiksi Tween 20:tä, Tween 80:tä, Pluronic F68:aa, sappi-
happosuoloja), solubilisointiaineita, (esimerkiksi glyserolia,
25 polyetyleeniglykolia), antioksidantteja (esimerkiksi askorbiinihappoa,
natriummetavetysulfiittia), säilyteaineita (esimerkiksi timerosalia,
bentsyylialkoholia, parabenejä), täyteaineita tai tonisuutta muokkaavia aineita
(esimerkiksi laktoosia, mannitolia), proteiiniin kovalenttisesti liitettyjä
polymeerejä, kuten polyetyleeniglykolia, metalli-ionien kanssa komplekseja
30 muodostavia yhdisteitä, tai joissa materiaali on liitetty polymeeriyhdisteistä,
kuten polymaitohaposta, polyglykolihaposta, hydrogeeleistä ja muista näitä
vastaavista materiaaleista valmistettuihin partikkelimuotoisiin preparaatteihin
tai näiden pinnalle tai liposomeihin, niosomeihin, mikroemulsioihin, miselleihin,
unilamellaarisiin tai multilamellaarisiin vesikkeleihin, biologisesti hajotettavissa
35 oleviin injektiomikrokapseleihin tai mikrosfääreihin tai proteiinimatrikseihin,
erytrosyyttien solukalvoihin, sferoplasteihin, iholaastareihin tai muihin
tunnettuihin keinoihin, jotka on tarkoitettu farmaseuttisten aineiden

vapauttamiseen tai pakkaamiseen. Nämä koostumukset vaikuttavat INPROL'in fysikaaliseen tilaan, liukoisuuteen, pysyvyyteen, vapautumisnopeuteen in vivo -olosuhteissa ja siihen nopeuteen, millä se poistuu elimistöstä in vivo -olosuhteissa. Säädellysti tai jatkuvasti lääkeaineita vapauttavia koostumuksia ovat formulaatio lipofiilisiin depot-valmisteisiin (esimerkiksi rasvahapot, vahat, öljyt). Tässä selitysosassa ajatellaan myös käytettäväksi partikkelimuotoisia koostumuksia, jotka on päällystetty polymeereillä (esimerkiksi poloksameereillä tai poloksamiineilla) ja INPROL'ia, joka on kytketty kudosspesifisiä reseptoreja, ligandeja tai antigeenejä vastaan suunnattuihin vasta-aineisiin tai joka on kytketty kudosspesifisten reseptorien ligandeihin. Muissa tämän selitysosan mukaisissa sovellutusmuodoissa käytetään suojapäällysteiden, proteaasien, inhiboivien tekijöiden tai permeaatiota tehostavien yhdisteiden partikkelimuotoisia muotoja, jotka on tarkoitettu käytettäväksi useissa erilaisissa annosteluteissa, mukaan lukien parenteraalisessa, pulmonaarisessa, nasaalisessa, paikallisessa (iholle tai limakalvolle) ja oraalisessa annostelussa. Vielä yhdessä sovellutusmuodossa INPROL'ia sisältävää koostumusta annetaan paikallisesti tai iholaastarin läpi.

Yhdessä sovellutusmuodossa tämän selitysosan mukaiset koostumukset pakataan kerta-annosmuodossa steriileihin pulloihin tai ampulleihin.

Tämä selitysosaa käsittää myös koostumukset, jotka sisältävät yhtä tai useampia muita tekijöitä, kuten kemoterapeuttisia aineita (esimerkiksi 5-fluorourasiilia (5FU), sytosiiniarabinosidia, syklofosfamidia, sisplatiinia, karboplatiinia, doksirubisiinia, etoposidia, taksolia, alkyloivia aineita, antiviraalisia aineita (esimerkiksi AZT:tä, asikloviiriä), TNF:ää, sytokiineja (esimerkiksi interleukiineja), solujen lisääntymistä estäviä lääkeaineita, antimetaboliitteja ja DNA-metaboliala estäviä lääkeaineita.

Potilasta hoitava lääkäri määrää hoito-ohjelman mukaisesta annostuksesta menetelmässä, jolla on tarkoitus hoitaa sytotoksisille aineille altistettavaa potilasta tai jota käytetään kantasolujen liikalisääntymisen hoitoon, harkiten lääkeaineiden vaikutusta modifioivia useita erilaisia tekijöitä: esimerkiksi potilaan kuntoa, ruumiinpainoa, sukupuolta ja ruokavaliota, minkä tahansa infektion vakavuutta, annostelun ajankohtaa ja muita kliinisiä tekijöitä.

Sen jälkeen kun potilaan altistuminen sytotoksiselle aineelle tai säteilylle on

tapahtunut, käytetään tämän selitysosan mukaisessa hoitomenetelmässä mahdollisesti menettelyä, jossa potilaalle annetaan yhtä tai useampaa lymfokiiniä, pesäkestimulaatiotekijöitä tai muita sytokiineja, hematopoietiineja, interleukiineja tai kasvutekijöitä, joiden tarkoituksena on stimuloida kantasolujen (ja niiden jälkeläisten) kasvua ja solunjakautumista, jotka edeltävä INPROL-käsittely on inhiboinut. Näitä terapeuttisia aineita, jotka edistävät hematopoieesia, ovat IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Meg-CSF, M-CSF (CSF-1), GM-CSF, G-CSF tai erytropoietiini. Näiden aineiden annokset valitaan sen tiedon mukaan, mikä niiden käytöstä kliinisissä kokeissa, joilla on ollut tarkoituksena selvittää niiden tehokkuus hematopoieettisen järjestelmän uudistumisen edistämiseksi kemoterapian tai hematopoieettisten kantasolujen siirron jälkeen. Nämä annokset säädetään suuruudeltaan sellaisiksi, että ne kompensoivat potilaan fyysisen kunnon vaihteluja ja kompensoivat kemoterapeuttisen aineen tai potilaan saaman säteilyn määrää ja tyyppiä. Sitä, miten INPROL'in antamisesta johtuvan - kantasolujen inhibition kääntyminen päinvastaiseen suuntaan etenee hoitoa saaneessa potilaassa, seurataan tavanomaisin menetelmin.

Leukemian hoidossa on hyödyllistä annostella sekä INPROL'ia, jota käytetään normaalien kantasolujen solukierron inhiboimiseksi, että leukemisten solujen kasvua stimuloivaa tekijää, kuten IL-3:a tai GM-CSF:ää, yhtä aikaa sytotoksiseen lääkeaineeseen perustuvan hoidon tai sädehoidon kanssa. Tätä menettelytapaa käyttäen on mahdollista saavuttaa suurimmat erot normaalien ja leukemisten solujen solukierron tilojen ja lääkeaineherkkyyksien kesken.

Esimerkki 1: In vivo -olosuhteissa suoritettava kantasolujen lisääntymisen inhibition määrittäminen

Kantasolujen lisääntymisen havaitsemiseksi määritettiin CFU-S-yksikköjen määrä solukierron S-vaiheessa käyttämällä ^3H -tymidiinin perustuvaa "itsetuho"-menetelmää [Becker, et al., Blood 26 (1965) 296 - 308].

Epäkypsät hematopoieettiset esiastesolut - pernassa pesäkkeitä muodostavat yksiköt (CFU-S), voidaan havaita in vivo -olosuhteissa sen perusteella, että ne muodostavat makroskooppisia pesäkkeitä tappavan säteilyannoksen saaneiden hiirten pernoissa 8 - 12 päivää hematopoieettisten solujen

suonensisäisen injektion jälkeen (Till & McCulloch, 1961).

5 Tavalliseen CFU-S-lisääntymismäärittelykseen käytetään tavallisesti ^3H -tymidiiniin perustuvaa "itsetuho"menetelmää (Becker, et al., 1965). Menetelmä perustuu radioaktiivisella leimalla varustetun tymidiinin (^3H -tymidiinin), joka on DNA-prekursori, kerääntymiseen soluihin DNA-synteesin aikana. Voimakas radioaktiivisuus tuhoaa ne CFU-S-yksiköt, jotka tutkittaessa ovat solukierron S-vaiheessa, eivätkä nämä kykene tästä syystä muodostamaan pesäkkeitä pernassa. Siten ilman ^3H -tymidiiniä inkuboidun solunäytteen ja ^3H -tymidiinin kanssa inkuboitujen samojen solujen injektioimisen vaikutuksesta syntyneiden CFU-S-yksiköiden lukumäärien välinen ero esittää lisääntymiskykyisten CFU-S-yksiköiden osuutta alkuperäisessä näytteessä.

15 Inhibiittorin tutkimusta ei voida suorittaa stimuloimattomista eläimistä peräisin olevalla luuytimen kantasolupopulaatiolla, sikäli kuin inhibiittori vaikuttaa ainoastaan CFU-S-yksiköihin, joissa solukierto on käynnissä ja jotka muodostavat niinkin pienen määrän kuin 7 - 10 % normaalien hiirten luuytimen CFU-S-yksiköiden kokonaispopulaatiosta.

20 CFU-S-yksiköiden lisääntymisen stimuloimiseksi käytettiin fenyylihydratsiinia (PHZ) tai subleetaalista säteilytystä.

25 Tässä selitysosassa on kehitetty testosteronipropionaatin (TSP) käyttömenetelmä, joka perustuu tämän CFU-S-yksiköiden solukiertoa stimuloivaan vaikutukseen [Byron, et al., Nature 228 (1970) 1204], joka yksinkertaisti tutkimusta eikä saanut aikaan mitään sivuvaikutuksia. TSP indusoi CFU-S-yksiköiden lisääntymisen stimuloitumisen 20 - 24 tuntia injektion jälkeen ja vaikutus voitiin havaita vähintään 7 päivän ajan.

30 Menetelmä, jota käytettiin fraktioiden seulontaan inhibiittorin puhdistuksen aikana, oli seuraava:

Hiiret: kaikkiin tutkimuksiin käytettiin BDF1- tai CBF1-hiirikantoja.

35 Luovuttajina käytettyjä hiiriä käsiteltiin TSP:lla, jonka annos oli 10 mg/100 g, injektioimalla tätä intraperitoneaalisesti 0,2 ml/hiiri, minkä tarkoituksena oli käynnistää S-vaihe 30 - 35 %:lla CFU-S-yksiköistä.

Luuydintä otetaan 24 tunnin kuluttua reisiluista solususpensiopreparaatin valmistamiseksi. Tämän jälkeen eri kontrollifraktioiden ja tutkittavien fraktioiden kanssa inkuboidaan 5 - 10 miljoonaa solua millilitrassa 3,5 tunnin ajan 37 °C:ssa vesihauteessa siten, että kutakin ryhmää kohti käytetään kahta koeputkea (yksi kuumaa (radioaktiivista) näytettä varten ja yksi kylmää (ei-radioaktiivista näytettä varten)).

Kuhunkin kuumaan putkeen lisätään 3,5 tunnin kuluttua ³H-tymidiiniä (1 mCi/ml, ominaisaktiivisuus 18 - 25 Ci/mmol) 200 µl:n tilavuudessa kutakin solususpension yhtä millilitraa kohti; kylmiin putkiin ei lisätä mitään. Inkubointia jatketaan vielä 30 minuuttia 37 °C:ssa.

Soluja tuhoava reaktio lopetetaan 30 minuutin inkuboinnin jälkeen lisäämällä seokseen 10 ml kylmää (4 °C) mediumia, joka sisältää 400 µg/ml ei-radioaktiivista tymidiiniä. Solut pestään huolellisesti (3 kertaa).

Solut suspendoidaan uudelleen ja ne laimennetaan injektioita varten 0,3 - 0,5 ml:n tilavuuteen haluttuun solukonsentraatioon, tavallisesti 2 - 4 x 10⁴ solua hiirtä kohti.

Vastaanottajina toimivia hiiriä, (8 - 10 eläintä ryhmää kohti) säteilytetään viimeistään 6 tuntia ennen injektioita.

Vastaanottajina käytetyt pernat kootaan talteen 9 - 12. päivinä ja kiinnitetään Tellesnitskyn liuoksessa; pesäkkeet lasketaan arvioimalla ne silmämääräisesti. S-vaiheessa olevien solujen osuus lasketaan käyttämällä kaavaa:

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

jossa a -- CFU-S-yksiköiden lukumäärä ilman ³H-tymidiiniä

jossa b -- CFU-S-yksiköiden lukumäärä ³H-tymidiinin kanssa

35

Taulukossa 1 esitetyt tutkimuskoetulokset INPROL'ista osoittavat, että solukierrossa olevat solut ovat INPROL'illa suoritettua käsittelyn jälkeen

- muuttuneet resistenteiksi ^3H -tymidiinin vaikutukselle. Tämän ja kaikkien muiden seuraavien esimerkkien kyseessä ollessa termi "pINPROL" tarkoittaa sian luuytimeistä peräisin olevaa puhdistettua proteiinia. Sama suojaus havaitaan S-vaiheelle spesifisten sytotoksisten lääkeaineiden, sytosiiniarabinosidin ja hydroksiurean, kyseessä ollessa (koetuloksia ei ole esitetty). Jos käsitellyt kantasolut pestään tämän jälkeen kylmällä mediumilla, joka sisältää ei-radioaktiivista tymidiiniä, lisääntyvät henkiinjääneet kantasolut hiirten pernoissa ja muodostavat pesäkkeitä tavalliseen tapaan.

10 Taulukko 1

pINPROL'in inhiboiva aktiivisuus CFU-S-yksiköiden lisääntymiseen inkuboitessa niitä 4 tunnin ajan luuydinsolujen kanssa.

Ryhmä	$^{-3}\text{H-TdR}$	$^{+3}\text{H-TdR}$	$^3\text{H-TdR}$:n tuhoamien CFU-S-yksikköjen % määrä
Ei inkubointia	$22,2 \pm 2,0^*$	$13,7 \pm 2,4^*$	$38,3 \pm 1,7$
4 tuntia mediumin kanssa	$18,7 \pm 3,0^*$	$11,4 \pm 1,3^*$	$43,1 \pm 1,4$
4 tuntia pINPROL'in kanssa	$21,2 \pm 2,3^*$	$20,7 \pm 2,6^*$	$2,1 \pm 0,08$

- 15 * CFU-S-yksikköjen määrä 2×10^4 solua kohti

Esimerkki 2: In vitro -olosuhteissa suoritettava kantasolujen lisääntymisen inhibitiomääritys

- 20 Käyttäen seuraavaa tutkimusjärjestelmää [Lord, et al., teoksessa The Inhibitors of Hematopoiesis pp. 227 - 239 (1987)] osoitettiin INPROL'in suora vaikutus. Monen kehityslinjan tekijästä (IL-3) riippuvaista kantasolulinjaa, FDCP-mix A4 (A4), kasvatettiin IMDM-mediumissa, jota oli täydennetty 20-%:isella hevosen seerumilla ja 10-%:isella mediumilla, jota oli käytetty WEHI-
 25 3-solujen kasvatukseen pesäkkeiden muodostumista stimuloivan IL-3:n lähteeksi.

Lisääntymisen määrittämiseksi käytettiin tritoidun tymidiinin kerääntymiseen perustuvaa määritystä: A4-soluja (5×10^4 100 μ l:ssa mediumia, joka sisälsi 20-% hevosen seerumia ja 50 % WEHI-3 CM:ää) inkuboitiin 37 °C:ssa 5-
5 %:isessa CO₂:ssa 16 tunnin ajan.

Koe aloitettiin lisäämällä seokseen pINPROL'ia tai puhdistamatonta BME:ta (fraktio IV). Kuhunkin ryhmään lisättiin tritioitua tymidiiniä (³H-TdR), 3,7 KBq 50 μ l:ssa radioaktiivisuuden ollessa 740 GBq/mmol) ja inkubointia jatkettiin
10 vielä 3 tuntia. Lisääntymistaso määritettiin kokoamalla solut talteen ja määrittäen inhibitio-%, joka laskettiin kaavasta:

$$\text{Inhibitio-\%} = \frac{\text{cpm ilman INPROL'ia} - \text{cpm INPROL'in kanssa}}{\text{cpm ilman INPROL'ia}} \times (100 \%)$$

15

Kuviossa 6 on esitetty tritoidun tymidiinin (³H-TdR) kerääntyminen FDCC mix-A4-soluihin, joita on kasvatettu normaalin luuydinuutteen tai kohoavien pINPROL-annosten läsnäollessa. Voidaan havaita, että puhdistettua pINPROL'ia sisältävä koostumus on vähintään 1000 kertaa aktiivisempaa kuin
20 lähtömateriaali.

Käsittelyn ajankohta (16 tuntia) on tärkeä tekijä tehokkaan inhiboitumisen aikaansaamiselle ja tämä osoittaa sen, että pINPROL vaikuttaa suoraan A4-solulinjan kantasoluihin.

25

Esimerkki 3 In vivo -olosuhteissa injektoidun INPROL'in aikaansaama CFU-S-yksiköiden lisääntymisen inhibitio: annokset ja vaikutuksen kesto

Tutkimukset, jotka koskivat in vivo -olosuhteissa injektoidun INPROL'in vaikutusta, osoittivat, että INPROL voi estää tehokkaasti CFU-S-yksiköiden siira solukiertoon, mikä siten suojaa näitä soluja jatkokäsittelyn sytotoksisilta vaikutuksilta, mikä osoittaa, että sitä on mahdollista käyttää kliiniseen käyttöön.

35 Kokeessa käytetyillä suoritusvaiheilla oli kaksi päämäärää: tarkistaa INPROL'in vaikutus CFU-S-yksiköihin injektoituna in vivo -olosuhteissa ja määrittää INPROL'in aktiivisuuden tehokas kesto suhteessa solukierrossa

oleviin kantasoluihin.

CFU-S-yksiköiden lisääntymisen stimuloimiseksi käytettiin testosteronipropionaatin injektioita perustuen edellä olevassa esimerkissä 1
5 mainittuun vaikutukseen.

BDF1-hiiriin injektioitiin 0. päivänä TSP:tä (10 mg/100 g); kuhunkin kokeelliseen ryhmään kuuluville hiirille (4 hiirtä ryhmää kohti) annettiin 24 tuntia myöhemmin yksi pINPROL-injektio, jonka annokset olivat 0 µg, 5 µg,
10 10 µg ja 15 µg/hiiri i.p.

Hiiret lopetettiin 24 tuntia INPROL-injektion antamisen jälkeen, ja solukierrossa olevien CFU-S-yksiköiden osuus määritettiin esimerkissä 1 kuvatulla määrityksellä. TSP-injektio sai aikaan solukierroksen alkamisen noin
15 50 %:lla CFU-S-yksiköistä verrattuna käsittelemättömissä hiirissä havaittuun 7 %:iin. pINPROL kykeni jopa niinkin pieninä annoksina kuin 2 µg/hiiri inhiboimaan TSP:n indusoiman lisääntymisen normaalitasolle.

Vaikutuksen keston määrittämiseksi yhteen ryhmään hiiriä (21 hiirtä ryhmää
20 kohti) injektioitiin pelkästään TSP:tä ja toiseen ryhmään injektioitiin sekä TSP:tä että pINPROL'ia (24 tuntia TSP:n jälkeen). Solukierrossa olevien CFU-S-yksiköiden määrä määritettiin joka 24. tunti viikon aikana ottamalla kolme luovuttajaa kustakin ryhmästä ja määrittämällä hiirten luuytimeistä solukierrossa olevien CFU-S-yksiköiden määrä käyttämällä kuvattua menetelmää (ks. esimerkki 1). Kuviossa 7 esitetyt koetulokset osoittavat, että
25 vaikkakin TSP:n vaikutus kesti vähintään 7 päivää, voi yksi INPROL-injektio siirtää CFU-S-yksiköt lepotilaan ja pitää ne poissa solukierrosta korkeintaan 48 - 72 tunnin ajan. Koska suurimmalla osalla syöpä ja leukemia-kemoterapiaan käytettävistä kemoterapeuttisista aineista on suhteellisen lyhyt
30 puoliintumisaika, tavallisesti 24 tuntia, ei INPROL'in vaikutus aikaansaatuja koetulosten mukaisesti kestä pitempään kuin se tehokas aika, jonka kuluessa kemoterapeuttiset aineet, kuten sytosiiniarabinosidi ja hydroksiurea, ovat aktiivisia in vivo -olosuhteissa. Vielä tärkeämpää on se, että sellaisten kemoterapeuttisten hoitojen ja sädehoitojen kyseessä ollessa, joissa
35 ensimmäisen (kantasoluja vaurioittamattoman) ja toisen (CFU-S-yksikköjä vaurioittavan) käsittelyn välillä käytetään pitkäköö aikaa (yli 24 tuntia ja alle 96 tuntia), pitäisi kemoterapeuttisen aineen tai säteilytyksen kahden käyttö-

kerran välisenä aikana yhden INPROL-injektiokerran olla riittävä. Useiden toistettavissa olevien sytotoksisen hoidon tai sädehoidon syklien kyseessä ollessa voitaisiin INPROL'in vaikutuksen keston perusteella käyttää samaa strategiaa.

5

Esimerkki 4: INPROL suojaa sellaisia kaikkein alkeellisimpia hematopoieettisia kantasoluja toiselta 5-FU-käsittelyltä, joissa solukierto on stimuloitunut nopeaksi 5-FU-käsittelyn jälkeen

- 10 5-fluorourasiili (5-FU) -lääkeaine pienentää silmiinpistävästi luuydin- ja imutieosastoissa esiintyvien solujen lukumääriä. Sen arvellaan tavallisesti olevan solusyklisten spesifinen ja sen toiminta kohdistuu nopeasti lisääntyviin soluihin, koska tämän nukleotidianalogin kerääntyminen DNA:han solukierron S-vaiheen aikana tai ennen tätä johtaa solun kuolemaan. Yksi 5-FU-annos ei
- 15 vaikuta pitkällä aikavälillä hiirten luuytimen elossapysymiseen eikä tämän immunohematopoieettisen järjestelmän uudistumiseen; osoitettiin kuitenkin [Harrison, et al., Blood 78 (1991) 1237 - 1240, että pluripotenttiset hematopoieettiset kantasolut (PHSC) herkistyvät toiselle 5-FU-annokselle lyhyen noin 3 - 5 päivän mittaisen ajan kuluessa ensimmäisen annoksen jälkeen. Tälle voidaan tarjota selitys, jonka mukaan PHSC-solujen solukierto on
- 20 normaalisti niin hidas, että yksi 5-FU-annos jää tehottomaksi ja stimuloituminen nopeaan solukiertoon tapahtuu ensimmäisen 5-FU-käsittelyn tuottamien stimulusten vaikutuksesta. Tämän selitysosana tekijät ovat ehdottaneet, että INPROL palauttaa PHSC-solut tilaan, jossa solukierto on
- 25 hidas ja jossa ne ovat suojattuja toiselta 5-FU-käsittelyltä.

- Näissä kokeissa käytetyt hiiret olivat koiraspuolisia BDF1-hiiriä. 5-FU:n (Sigma) kantaliuos valmistettiin fysiologiseen suolaliuokseen konsentraatioon 10 µg/ml. Kullekin käsitellylle hiirelle annettiin häntälaskimon kautta 2 mg 5-FU:ta kutakin 10 ruumiinpainogrammaa kohti kokeen 0. päivänä; 24 tuntia myöhemmin hiiriin injektoidiin intraperitoneaalisesti pINPROL'ia (10 µg kutakin 100 ruumiinpainogrammaa kohti) ja toinen 5-FU-annos injektoidiin 3. päivänä. Suoritettiin eloonjäämistutkimus, jossa hiirten kuolemista seurattiin koeryhmässä (käsittely pINPROL'illa) ja kontrolliryhmässä, joissa kussakin oli
- 35 30 hiirtä. Eloojäämiskäyrät on esitetty kuviossa 8.

Esimerkki 5: INPROL-esi-inkuboinnin vaikutukset luuydinsoluissa MP-1 α :aan verrattuna

Tämän kokeen tarkoitus oli verrata pINPROL-esi-inkuboinnin ja MIP-1 α -esi-inkuboinnin inhibitorisia vaikutuksia hiiren luuydinsoluihin in vitro -olosuhteissa.

Kokeen suoritus oli seuraava:

In vivo: 6 - 15 viikon ikäisiin BDF1-hiiriin injektoidaan 200 mg/kg 5-FU:ta i.p. 48 tuntia ennen luuytimeen talteenottoa reisiluista.

In vitro: yhdistetyn yksisoluisen suspension solujen lukumäärä lasketaan ja 5×10^6 solua inkuboidaan yhteensä 2 ml:n tilavuudessa seosta, joka sisältää pINPROL'ia tai MP-1 α :a tai josta nämä on jätetty pois sekä 5 % hevosen seerumia, IMDM-mediumia, joka sisältää mediumiin lisättyä L-glutamiinia, 37 °C:ssa ja 5-%:isessa CO₂:ssa 4 tunnin ajan. Tämän jälkeen solut pestään kaksi kertaa ja lasketaan uudelleen. Ne maljataan metyyliiselluloosalle lopullisissa olosuhteissa, jotka ovat:

- 0,8 % metyyliiselluloosaa
- 25 % hevosen seerumia
- 20 ng/ml yhdistelmä-muriini-IL-3:a
- L-glutamiinia, lisättyä seokseen
- 5×10^5 solua millilitrassa
- IMDM-mediumia

Maljoja inkuboitin 11 päivää 37 °C:ssa ja 5-%:isessa CO₂:ssa 100-%:isessa kosteudessa. Yli 50 solua sisältävät pesäkkeet laskettiin.

30 Taulukko 2

Ryhmät	Pesäkkeiden lukumäärä	% kontrollista
Kontrolli	31	100 %
pINPROL	21,25	68,5 %
MIP-1 α	35,25	114 %

Esimerkki 6: INPROL inhiboi HPP-CFC-yksiköiden lisääntymistä

In vitro -olosuhteissa suoritettava määrittäminen, joka soveltuu hiiren rekonstituoituvien kantasolujen ja varhaisten esiastesolujen määrittämiseen, on suuren lisääntymispotentiaalin sisältävien pesäkkeiden (HPP-PFC) määrittäminen; muilla tätä muistuttavilla määrittämisillä, esimerkiksi CFU-A:lla, CFU-GM:lla, CFU-E:lla ja CFU-GEMM:lla, havaitaan enenevässä määrin rajoittuneempia esiastesolupopulaatioita [Moore, M., Blood 177 (1991) 2122 - 2128]. Tämä esimerkki osoittaa, että solujen esikäsittely pINPROL'illa inhiboi niiden lisääntymistä, kun taas MIP-1 α ei kykene tähän näissä koeolosuhteissa.

BDF1-hiiriä käsiteltiin 5-fluoriurasiililla (200 mg/kg i.p.) ja niiden luuytimeistä määritettiin HPP-CFC-yksiköiden lukumäärät. Solut pestiin sentrifugoimalla ja niitä inkuboitettiin neljän tunnin ajan solutiheyksissä, jotka olivat 10^6 - 5×10^6 /ml, mediumissa, johon ei oltu lisätty mitään (kontrollit), joka sisälsi pINPROL'ia (25 ng/ml) tai MIP-1 α :aa (200 ng/ml). Solut pestiin inkuboinnin jälkeen ja ne maljattiin agarille (0,3 %), joka sisälsi 30 % FCS:ää ja yhdistettyä solujen kasvatukseen käytettyä mediumia, joka oli peräisin 5637- ja WEHI-3B-solulinjoista (7,5 % kutakin solujen viljelykseen käytettyä mediumia Sharp, et al.:n, 1991, suosittelemalla tavalla. Maljauskonsentraatio 60 mm:n maljoille oli 5×10^4 solua/ml. Pesäkkeet laskettiin 14. päivänä ja tulokset on esitetty alla.

Taulukko 3

Ryhmä	HPP-CFU	% kontrollista
Kontrolli	15,5 $\pm$ 1,2	1
pINPROL	8,3 $\pm$ 0,7	53,5 %
MIP-1 α	15,8 $\pm$ 0,9	101 %

25

Näiden tulosten mukaisesti MIP-1 α ei estänyt kaikkien epäkypsien esiastesolujen lisääntymistä silloin, kun sitä käytettiin ainoastaan esi-inkubointiajan kuluessa. pINPROL inhiboi tehokkaasti lisääntymistä näissä olosuhteissa, mikä viittaa perustavanlaatuisiin eroihin pINPROL'in ja MIP-1 α :n välillä biologisen aktiivisuuden suhteen.

30

Esimerkki 7: INPROL-hoidon vaikutus toipumiseen säteilyn aikaansaamasta luuytimen aplasiasta

Luuytimen aplasia on syövän sädehoidon tärkein rajoittava toksisuuden muoto. Tiettyjen kasvutekijöiden (esimerkiksi G-CSF, GM-CSF, erytropoietiini) on osoitettu voivan nopeuttaa toipumista säteilyn aikaansaamasta luuytimen aplasiasta. Ajatus suojan aikaansaamisesta käyttämällä kantasolujen lisääntymisen inhibiittoria on poikkeava ja täydentävä lähestymistapa hematologisesta vauriosta selviytymiseen. Aikaisemmin kehitetyn hoitomenetelmän (esimerkit 3, 4) noudattamista varten luotiin hiirten letaalista säteilyttämistä koskeva malli. Tällä alalla tiedetään, että hiiret, joille annetaan 9 Gy koboltti 60:tta, alkavat kuolla noin 10 - 14 päivän kuluttua; 30. päivään mennessä kuolevuus lähestyy 50 %. Mallissamme käytettiin tätä tappavaa annosta jakamalla se kahteen peräkkäiseen käsittelykertaan, joilla kummallakin annettiin 4,5 Gy ja annosten välillä pidettiin 3 päivän väli. Alustavat koetulokset osoittivat, että eloonjäämiskäyrä tässä mallissa muistutti hyvin tarkasti 9 Gy:n annoksella suoritettujen säteilytyksen tunnettua eloonjäämiskäyrää; CFU-S-yksiköiden tutkimus osoitti lisäksi, että lisääntyminen käynnistyy 35 - 50 %:lla CFU-S-yksiköistä 24 tuntia ensimmäisen säteilytyksen jälkeen. Nämä solut voivat saada suojan ennen toista annosta annetun kantasolujen inhibiittorin vaikutuksesta.

Tämän mahdollisuuden tutkimiseksi annettiin hiirille (50 hiirtä ryhmää kohti) 0. päivänä 4,5 Gy:tä. 24 tuntia myöhemmin yhdelle ryhmälle annettiin pINPROL'ia (2 µg/hiiri i.p.) ja toiseen, kontrolliryhmään, injektointiin fysiologista suolaliuosta. Toinen säteilyannos (4,5 Gy) annettiin 3. päivänä.

Kuviossa 9 on esitetty, että eloonjääminen lisääntyy yhden pINPROL-annoksen jälkeen. Mallin olosuhteet ovat kliinisesti relevantteja minkä tahansa syövän hoidon kyseessä ollessa, mukaan lukien niiden syöpien kyseessä ollessa, joille luonteenomaisina ovat kiinteät tuumorit; tällaista hoitoa käytettäisiin syöpäpotilaalla antamalla tehokas INPROL-annos kahden peräkkäisen säteilyannoksen välillä, minkä ansiosta syövän hoitoon voidaan käyttää suurempia annoksia. Tätä hoitotapaa pitäisi myös olla mahdollista laajentaa kemoterapeuttisiin aineisiin.

Esimerkki 8: INPROL'in käyttö autologiseen luuydinsiirtoon

Luuydinsiirto on ainoa tunnettu parantava hoitokeino useiden leukemioiden (CML, AML ja muut näitä vastaavat leukemiat) kyseessä ollessa. Autologisen BMT:n sopeuttamisesta ex vivo -olosuhteissa infuusioon pitäisi saada käyttöön normaalien kantasolujen potentiaalisia autologisia materiaalilähteitä, joissa ei esiinny leukemista kontaminaatiota ja jotka kykenevät uudistamaan vastaanottajan hematopoieettisen järjestelmän solupopulaatiota, minkä avulla on mahdollista käyttää aggressiivista ja tehokasta hoitoa.

1. INPROL'in vaikutuksen tutkimiseen soveltuva pitkäaikaiseen luuytimen viljelyyn perustuva L1210-leukemiamalli, jossa normaali hematopoieesi säilyy AraC:lla suoritettavan puhdistuksen aikana

- 15 Pitkäaikaisia luuydinviljelmiä (LTBMC) perustettiin Toksoz, et al.'n [Blood 55 (1980) 931 - 936] mukaisesti ja leukemiasolulinjaa L1210 ryhdyttiin viljelemään samanaikaisesti LTBMC:n kanssa kahden viikon ajan. Normaalit ja leukemiset esiasestesolut kasvoivat samanaikaisesti näissä yhdistetyissä LTBMC/L1210-viljelmissä, mikä muistuttaa tilannetta leukemiapotilaan luuytimessä. Normaalit pesäkkeitä muodostavat CFU-yksiköt kyettiin erottamaan leukemisista CFU-yksiköistä kasvattamalla niitä agarpesäkkeinä WEHI-3-soluista (IL-3:a tuottava solulinja) peräisin olevan solujen kasvatukseen käytetyn mediumin läsnäollessa tai tämän puuttuessa. Normaaileille soluille tapahtuu IL-3:n puuttuessa apoptoosi, kun taas leukemiasolut kykenevät sen puuttuessa muodostamaan pesäkkeitä. LTBMC-L1210-koostumuksesta peräisin olevasta solususpensiosta saadaan IL-3:n läsnäollessa 50 000 maljattua solua kohti noin 150 pesäkettä (normaalit hematopoieettiset kloonit) ja 70 pesäkettä kasvatettaessa näitä ilman IL-3:a (leukemiset kloonit).
- 30 Puhdistusmenetelmä oli seuraava: 0. päivänä kaikki suspendoidut solut ja medium (10 ml/pullo) otettiin LTBMC-1210:aa sisältävistä pulloista ja sen tilalle lisättiin 2 ml mediumia, joka sisälsi 200 µg sytosiiniarabinosidia (AraC) [Tsyrova, et al., teoksessa Leukemia: Advances in Biology and Therapy v. 35, 1988) 20 tunnin inkuboinnin jälkeen pullojen sisältö huuhdottiin pois ja sen tilalle lisättiin 4 tunnin ajaksi 2 ml pelkkää tuoretta mediumia (kontrolliryhmä) tai mediumia, joka sisälsi pINPROL'ia, jonka konsentraatio oli 25 ng/ml. Tämän esi-inkuboinnin jälkeen soluja inkuboitiin uudelleen 3 tunnin ajan

37 °C:ssa käyttäen 100 µg/pullo AraC:tä. Kukin ryhmä sisälsi 4 pulloa. LTBMC-L1210-viljelmät pestiin 3 kertaa ja elatusaineena käytettiin tuoretta LTBC-mediumia, soluja kasvatettiin uudistumistutkimuksia varten 3 - 4 viikon ajan kuten aikaisemminkin. Koetulokset on esitetty kuviossa 10. pelkällä AraC:lla käsitellyissä kontrolliviljelmissä ei havaittu solujen kasvua, kun taas INPROL'n suojaamissa pulloissa hematopoieesi muodostui uudelleen nopeammin, mikä johtui tarttuneesta kerroksesta peräisin olevien esiastesolujen lisääntymisestä. Lisäksi kokeellisesta ryhmästä peräisin olevat solut kasvoivat agarille maljattuina ainoastaan IL-3:n läsnäollessa ja ne muodostivat noin 100 CFU:ta 50 000 solua kohti; leukemiasolujen ei havaittu kasvavan ainakaan 4 viikkoon. Siten luuydin, jota on käsitelty ex vivo -olosuhteissa tehokkaalla AraC-annoksella INPROL'iin yhdistettynä, voidaan puhdistaa syöpäsoluista kantasolujen pysyessä samalla suojattuina. Tätä hoitotapaa pitäisi olla mahdollista laajentaa muihin kemoterapia- tai sädehoitomuotoihin.

2. INPROL-käsittely in vitro -olosuhteissa parantaa luuytimen solupopulaatioiden uudistumiskykyä (MRA) sekä tuloksia 30 päivän mittaisessa kokeessa suojan muodostumisesta säteilyn vaikutuksia vastaan

MRA, solujen kyky uudistaa tappavalla säteilyannoksella säteilytettyjen hiirten luuytimen solupopulaatio, sekä kyky muodostaa suoja säteilyn vaikutuksia vastaan 30 päivän ajalta määritettynä, ovat yhdessä sellainen suora in vivo -olosuhteissa suoritettava määritys, jolla arvioidaan mahdollisuuksia saada eläimet, joiden verta muodostavan järjestelmän toiminta on heikentynyt, jäämään eloon [Visser, et al., Blood Cells 14 (1988) 369 - 384].

Sellaisia tutkimuksia varten, joissa määritettiin suojan muodostumista säteilyn vaikutuksia vastaan, säteilytettiin BDF1-hiiriä 9,5 Gy:lla ja elimistön vauriot korjattiin siirtämällä luuydintä testosteronilla stimuloituista luovuttajista. - Elimistön vauriot yhdessä vastaanottajien ryhmässä korjattiin käyttämällä luuydinsoluja, jota oli esi-inkuboitu 4 tunnin ajan mediumin kanssa (kontrollit - ryhmä A) ja elimistön vauriot toisessa ryhmässä (ryhmä B) pINPROL'in kanssa, jonka konsentraatio oli 25 ng/ml. Kummankin ryhmän sisältämät solut pestiin ja säteilytettyihin eläimiin siirrettiin 30 000 solua hiirtä kohti. Eloonjäämiskokeen tulokset on esitetty (kuvio 11). Kuviossa on kuvattu kolmen kokeen yhteenlasketut tulokset ja kontrollit on normalisoitu 100 %:ksi.

pINPROL-inkubointi lisäsi 30. päivään mennessä hiirten eloonjäämistä kontrolliryhmässä havaitusta 36,5 %:sta 61,8 %:iin.

- INPROL-esi-inkuboinnin indusoima MRA:n voimistuminen voisi olla yksi mekanismeista, jotka edistävät suojan muodostumista säteilyn vaikutuksia vastaan. Tämän hypoteesin tutkimiseksi määritettiin MRA Visser, et al.'n (edellä) mukaisesti. Lyhyesti mainittuna luovuttajina käytettyjä BDF1-hiiriä esikäsiteltiin testosteronilla, niiden luuydintä esi-inkuboitiin mediumin tai pINPROL'in kanssa 4 tunnin ajan ja injektointiin säteilytettyihin eläimiin.
- 10 Vastaanottajan reisiluista peräisin olevat luuydinsolut maljattiin 13. päivänä kolmessa eri konsentraatiossa (0,01, 0,05, 0,1 reisiluuekvivalenttia) agarille, joka sisälsi 20 % hevosen seerumia ja 10 % WEHI-CM:ää. 7. päivän pesäkkeiden lukumäärä edusti MRA:ta, mikäli vastaanottajien luuytimessä esiintyvät pesäkkeitä muodostavat solut tällä ajankohdalla ovat luovuttajan epäkypsien kantasolujen esimuotoja.
- 15

Kuten kuviosta 12 voidaan nähdä, on INPROL'n kanssa esi-inkuboidun solupopulaation MRA suurempi kuin kontrolliryhmässä (B).

- 20 Esimerkki 9: INPROL'in liikalisääntymistä vastaan suunnattu vaikutus kantasoluihin voi muuttaa niiden epänormaaleja erilaistumistapoja

- CFU-S-yksiköiden liikalisääntymistä ei havaita ainoastaan luuytimen uudistumisessa sytotoksisten lääkeaineiden tai säteilyn aikaansaamien vaurioiden jälkeen vaan myös normaalin ikääntymisen seurauksena, ja sen arvellaan olevan tärkein ominaisuus myelodysplastisessa oireyhtymässä (MDS). Siihen liittyvät erilaistumishäiriöt, kuten erytroidisen erilaistumisen vallitsevuus granulosyyttisen kehityslinjan mukaisen erilaistumisen samalla heikentyessä.
- 25

- 30 Luuydinsoluja inkuboitiin 4 tunnin ajan 37 °C:ssa pINPROL'in kanssa, jonka konsentraatio oli 25 ng/ml, tai mediumin kanssa (kontrolli), solut pestiin ja ne maljattiin agarille, joka sisälsi 20 % hevosen seerumia, 2 U/ml erytropoietiinia ja 10 % WEHI-CM:ää. BFU-E- ja GM-CFU-pesäkemäärät laskettiin 7. päivänä. Taulukossa 4 esitetyt koetulokset ovat yhteenveto kolmesta kokeesta - kustakin ryhmästä otettiin 4 eläintä koepistettä kohti; kokeessa maljattiin 4 maljaa.
- 35

- Kuten taulukosta 4 käy ilmi, ei nuorista eläimistä (BDF1, ikä 8 - 12 viikkoa) otetun normaalin luuytimen (NBM) inkubointi INPROL'in kanssa muuttanut erityyppisten pesäkkeiden lukumäärää tai osuutta. Testosteronipropionaatilla (TSP) esikäsitellyissä BDF1-luovuttajissa havaittiin sama CFU-S-yksiköiden lisääntymisen voimistuminen kuin mitä havaittiin aikaisemmin (esimerkki 1, 3, 4), pieni erytroidisolujen esiastemuotojen lukumäärän nousu (BFU-E-pesäkkeet) ja GM-CFU-määrän pieneneminen, jotka inkubointi INPROL'in kanssa ehkäisi kokonaan. Lisäksi epänormaalin korkea CFU-S-yksiköiden
- 5 lisääntymisaste palautui tilanteeseen, jossa 10 % CFU-S-yksiköistä oli solukierron S-vaiheessa. CFU-S-yksiköiden liikalisääntymisen tiedetään olevan joidenkin sellaisten hiirikantojen, esimerkiksi Balb/c-hiirten, ominaisuus, jotka ovat herkkiä indusoimaan virusleukemian, (taulukko 4), ja joka voidaan myös havaita vanhahkoissa eläimissä (taulukko 4). Se sama tietyn
- 10 kehityslinjan valinneiden esiastesolujen uudelleenjakautuminen, joka havaitaan TSP:lla käsitellyissä BDF1-hiirissä, havaitaan Balb/c-hiirissä ja vanhahkoissa (23 - 25 kuukauden ikäisissä BDF1-hiirissä, joille yhteisenä piirteenä on CFU-S-yksiköiden epänormaalin korkea lisääntymistaso. Inkubointi INPROL'illa sai aikaan sekä CFU-S-yksiköiden lisääntymistilanteen
- 15 että niiden erilaistumistilanteen korjaantumisen. Vielä tätäkin kliinisesti asiaan kuuluvampaa on se, että INPROL'in injektoinnin in vivo -olosuhteissa (2 µg/hiiri) osoitettiin tässä tutkimuksessa, vaikuttavan sekä CFU-S-yksikköjen lisääntymiseen että erytroidipesäkkeiden (BFU-E) ja GM-pesäkkeiden suhteeseen (taulukko 4).
- 20

Taulukko 4

INPROL'in vaikutus CFU-S-yksiköiden erilaistumiseen kehityslinjan valinneiksi BFU-E- ja CFU-GM-esiastemuodoiksi

Luuytimen luovuttajat	pIN-PROL	³ HTdR:n tuhoamien CFU-S-yksiköiden % määrä	BFU-E	CFU-GM
BDF1 nuoret	-	12,0 ± 0,3	28,33 ± 1,91	46,22 ± 3,44
	+	15,0 ± 1,3	22,00 ± 3,74	47,70 ± 3,72
BDF1 vanhat	-	47,1 ± 1,9	43,75 ± 1,54	24,0 ± 1,33
	+	11,4 ± 0,7	15,25 ± 1,45	44,0 ± 7,63
BDF1	-	53,2 ± 1,6	32,67 ± 2,44	15,71 ± 2,28
TSP:llä stimuloit BDF1-eläimet	+	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

5

Esimerkki 10: INPROL'in immunologista järjestelmää stimuloiva aktiivisuus

On havaittu, että sellaisten luuydinsolujen inkubointi INPROL'in kanssa, jotka sisältävät suuren määrän lisääntyviä CFU-S-yksiköitä, ei ainoastaan muuta CFU-S:n osallistumista solukiertoon vaan myös niiden erilaistumista, vaihtaen pääasiassa erytroidisen erilaistumisen granulosyyttisiä ja lymfoidisia esiastesoluja suosivaksi. Tämä INPROL'in ominaisuus on tärkeä siitä syystä, että kemoterapian tai sädehoidon sivuvaikutukset heikentävät immunologisen järjestelmän toimintaa, sekä siitä syystä, että kantasolujen liikälisääntymissairauksien ja ikääntymisen yhteydessä esiintyy immunologisen

15

järjestelmän toiminnan heikentymistä.

- 5 Tämä esimerkki osoittaa, että INPROL vaikuttaa suoraan epäkypsien esiastemuotojen erilaistumiseen pre-beeta-esiastesoluiksi lymfoidisten solujen pitkäkestoisesta viljelmästä (LLTC), joka on perustettu julkaisun Wittlock & Witte [Ann. Rev. Immun. 3 (1985) 213 - 35] mukaisesti, määritettynä pesäkkeiden muodostumisesta IL-7:ää sisältävässä metyyliiselluloosassa.

- 10 LLTC-viljelmät perustettiin kuvatulla tavalla ja niiden elatukseen käytettiin tuoretta LLTC-mediumia (Terry Fox Labs., Vancouver, Kanada) kaksi kertaa viikossa. Alustaan kiinnittymättömät solut koottiin talteen kerran viikossa, pestiin puhtaksi tekijöistä ja inkuboitiin 4 tunnin ajan pINPROL'in kanssa, jonka konsentraatio oli 25 ng/ml, tai kontrollina käytetyn pelkän mediumin kanssa. Solut pestiin inkuboinnin jälkeen ja ne maljattiin solutiheyteen 10^5 so-
 15 lua/ml metyyliiselluloosalle, joka sisälsi 30 % FCS:ää ja 10 ng/ml IL-7:ää. Koetulokset kolmen viikon ajalta on esitetty kuviossa 13. Suurien pre-B-solujen pesäkkeiden lukumäärä vaihteli kontrollissa, lisääntyen ajan myötä, mutta esi-inkubointi INPROL'illa stimuloi aina pesäkkeiden kasvua 4 - 8-kertaisesti kontrollitason yläpuolelle. Tämä osoittaa INPROL'in immunologisen
 20 järjestelmän toimintaa stimuloivan ominaisuuden, jolla on käyttöä immuunivajavuustilojen parantamisessa ja haluttujen immuunivasteiden, esimerkiksi rokotukseen syntyvän vasteen, tehostamisessa.

- 25 Esimerkki 11: INPROL tehostaa kantasolujen kykyä muodostaa solupopulaatiota uudelleen - CML-potilaalta peräisin olevat pitkäaikaisen viljelmän käynnistävät solut

- 30 Krooninen myeloinen leukemia (CML) on hematopoieettisen kantasolun letaali maligni sairaus. CML:n hoito kroonisessa vaiheessa yhden aineen kemoterapialla, yhdistelmäkemoterapialla, pernan poistolla tai pernan säteilytyksellä voi hillitä sairauden merkkejä ja oireita mutta ei merkittävästi pidennä elinaikaa. CML:n edetessä kroonisesta kiihtyvään vaiheeseen ei tavallisella hoidolla ole vaikutusta. Ainoa tunnettu parantava hoito CML:een on nykyisin luuytimen siirto (BMT). BMT-hoito, jossa luuydin on peräisin joltakin
 35 muulta kuin potilaan sukulaiselta, on vaikeaa kudosten epäyhteensopivuusongelmien johdosta. Sopivalla tavalla yhteensopiva sukulainen löytyy luovuttajaksi alle 40 %:lla muutoin hoidettavaksi soveltuville

CML-potilaille; tästä syystä autologista siirtoa pidetään edullisena. Se, että luuydin kyetään sopeuttamaan autologiseen BMT:hen infuusiota varten samalla kun pitkäaikaisessa viljelmässä (LTC) kasvavia myeloidisolujen ei-leukemisia (Ph-negatiivisia) esiastemuotoja kyetään valikoimaan Ph-positiivisista potilaista, viittaa siihen, että normaalien kantasolujen autologisilla lähtömateriaaleilla on käyttöpotentiaalia, jolla CML:ää on mahdollista hoitaa aggressiivisesti ja tehokkaasti.

BMT:n kyseessä ollessa voidaan hematopoieettinen kantasolu määritellä soluksi, joka kykenee muodostamaan kypsiä verisoluja pitkiä aikoja. Tässä selitysosassa on sekä kantasolujen lukumäärien kvantitointiin että niiden käsittelyyn terapeutista käyttöä varten käytetty C. Eaves'in ja A. Eaves'in kehittämää humaani-LTC-järjestelmää. Tämä sisältää sen, että solut lisätään kasvamaan etukäteen valmistettuun säteilytettyyn kiinnittymiskerrokseen, joka on valmistettu ihmisen luuytimeistä; näitä viljelmiä kasvatetaan tämän jälkeen viiden viikon ajan. Loppupisteinä on tämän ajan umpeen kuluttua talteenotettujen viljelmien kokonainen klonogeenisten solujen lukumäärä (alustaan kiinnittyneet + kiinnittymättömät solut). Klonogeenisten solujen tuotto näissä olosuhteissa on lineaarisesti riippuvainen esiastesolujen lukumäärästä (pitkäaikaisen viljelmän aloittavat solut (LTC-IC), jotka on lisätty viljelmään viljelyä aloitettaessa; keskimääräinen tuotto yksittäisestä humaani-LTC-IC:stä on 4 klonogeenistä esiastemuotoa LTC-IC:tä kohti. Aikaisemmin on osoitettu, että kun CML-potilaista peräisin oleva luuydin saatetaan vastaaviin olosuhteisiin, vähenee leukemisten (Ph-positiivisen) klonogeenisten solujen lukumäärä nopeasti. Käyttämällä jäljellä olevien normaalien LTC-IC-yksikköjen kvantitointia CML-potilaissa on mahdollista valita ne potilaat, jotka saavat hyötyä tehohoidosta viljeltyjen autograftien siirron tukemana [Phillips, et al., Bone Marrow Transplantation 8 (1991) 477 - 487].

Seuraavaa menetelmää käytettiin sen vaikutuksen tutkimiseksi, joka INPROL'illa on CML-potilaan perifeeraalisesta verestä valmistettujen luuydinsiirtosolujen joukossa esiintyvien klonogeenisten solujen (LTC-IC) lukumäärään. Soluja ryhdyttiin viljelemään pitkäkestoisina viljelminä etukäteen säteilytetyn strooman pinnalla. Kontrollina käytettiin terveen luovuttajan perifeeraalista verta. CML-potilaasta saatuja perifeeraalisia verisoluja esi-inkuboitiin pINPROL'in kanssa (25 ng/ml tai ilman tätä neljän tunnin ajan, pestiin ja pipetoitiin LTC-IC-järjestelmään viiden viikon ajaksi LTC-IC-solujen

kontrolliarvon määrittämiseksi. Kokeita varten valmistettiin muita rinnakkaisia viljelmiä 10:ksi päiväksi. 10 päivän ajan kasvavista viljelmistä peräisin olevien alustaan kiinnittyneiden ja kiinnittymättömien solujen seosta esi-inkuboitiin pINPROL'in kanssa tai ilman tätä ja ne pipetoitiin etukäteen valmistettujen syöttösolukerrosten pinnalle vielä kahdeksaksi viikoksi. Kustakin kokeellisesta viljelmästä peräisin olevien LTC-IC-solujen lukumäärä arvioitiin maljaamalla sekä kiinnittyneet että kiinnittymättömät solut metyyliiselluloosalle asiaan-kuuluvien kasvutekijöiden ohella (Terry Fox Laboratories, Vancouver, Kanada) ja laskemalla tulokseksi saatujen pesäkkeitä muodostavien solujen kokonaislukumäärä. Tätä menetelmää käyttäen saadut LTC-IC-arvot oli saatu klonogeenisten solujen (CFC) kokonaispitoisuuden määrittämisestä käyttäen kaavaa:

$$\# \text{ LTC-IC} = \# \text{ CFC} / 4$$

15

Kuviossa 14 esitetyt koetulokset osoittavat, että terveen luovuttajan luuytimeistä suoritettujen ensimmäisen kymmenen viljelypäivän aikana ei esiintynyt yhtään LTC-IC-solujen hävikkiä ja viljelmässä oli vielä viiden viikon viljelyn jälkeen noin 30 % alussa lisättyjen LTC-IC-solujen määrästä. CML-potilaiden LTC-IC-solujen lukumäärä pieneni silmiinpistävästi noin 8 %:iin 10 päivän aikana eikä se palautunut inkubointia jatkettaessa, kun taas solujen esi-inkubointi INPROL'in kanssa kohotti LTC-IC-solujen pitoisuutta 30 %:iin siitä määrästä, joka oli lisätty viljelmiin viljelyä aloitettaessa ja tämä säilyi 8 viikon ajan.

25

Ne INPROL'in kliinisesti relevantit sovellutukset, jotka ovat ennustettavissa näiden alustavien koetulosten perusteella, sisältävät niiden käytön strategioissa, joilla on tarkoitus lisätä selektiivisesti juuri valmistettujen luuydin-siirteiden tai viljeltävien luuydinsiirteiden normaalia kantasolupitoisuutta, strategioissa, joilla on tarkoitus tehostaa jäljellä olevien normaalien kantasolujen muuttumista aktiivisiksi, sekä menetelmissä uuden geneettisen materiaalin siirtämiseksi ihmisen luuydinsoluihin niiden siirtämiseksi edelleen potilaisiin.

35

Esimerkki 12A: Menetelmä luuydinpreparaateista peräisin olevien kantasolujen lisääntymisen immunoaktiivisen inhibiittorin eristämiseksi

5 Luuydin eristettiin sikojen kylkiluista. Sikojen ruhoista peräisin olevat kylkiluut erotettiin ja puhdistettiin lihassyistä ja rasvasta, leikattiin kappaleiksi ja luuydin eristettiin Biophyzpribor'in valmistamalla hydraulisella puristimella (hydropress). Luuydinsolut erotetaan sentrifugoimalla K-70-sentrifugissa kierrosnopeudella 2000 kierrosta minuutissa 20 minuutin ajan. Tämän jälkeen uutteen supernatanttia käsitellään peräkkäisillä ultrasuodatuksilla Amicon
10 USA-membraanien XM-100, PM30, PM-50 läpi. Elektroforeesilla suoritettun analyysin mukaisesti pääkomponentti on albumiini (ks. kuvio 1).

Biokemiallinen puhdistus

15 Luuydinuute ja fraktioiden proteiinikomponentit analysoitiin jokaisessa puhdistusvaiheessa geelielektroforeesilla 10-%:isessä polyakryyliamidissa, joka sisälsi 0,1 % natriumdodekyylisulfaattia. Näytteisiin, joita inkuboitiin 5 minuuttia 70 °C:ssa ennen niiden pipetoimista geeliin, lisättiin korkeintaan 7 % natriumdodekyylisulfaattia ja korkeintaan 0,5 - 1 % merkaptotetanolia.

20

Elektroforeesi suoritettiin 20 V jännitteellä geelin kutakin senttimetriä kohti viiden tunnin ajan. Geeli värjättiin tämän jälkeen 0,25-%:isessä Coomassie CBBC250:ssa suhteessa 5 : 5 : 1 valmistetussa etanolin, veden ja etikkahapon seoksessa yhden tunnin ajan 20 °C:ssa ja pestiin 7-%:isessä
25 etikkahapossa vaihtaen pesuliuos useita kertoja. Tuotteen aktiivisuus määritettiin hematopoieettisten kantasolujen (CFU-S) lisääntymisen inhibition menetelmällä. Menetelmä on kuvattu yksityiskohdittain jäljempänä.

Vaihe 1. Puhdistus ammoniumsulfaattisaostuksella

30

Aktiivisuus puhdistettiin saostamalla 25-%:isellä ammoniumsulfaatilla käyttäen 40 - 80-%:ista kylläisyysastetta, joka valittiin taulukossa 5 esitettyjen tulosten perusteella.

35

Taulukko 5

Kylläisyysaste (%)	0 - 40	0 - 20	60 - 80	80 - 100
Aktiivisuus (%)	37,2 - 35,4	37,2 - 1,8	37,2 - 12,8	37,2 - 26,1
	= 1,8 %	= 35,4 %	= 24,4 %	= 11,1 %

5 Kunkin puhdistusvaiheen jälkeen tutkimiseen käytetyn preparaatin määrä määritettiin puhdistumistason mukaisesti ja se vastasi annosta, jonka suuruus oli 2×10^{-2} mg vaiheen alussa ollutta tuotetta. Aktiivisuus määritettiin kaavasta:

$$\text{muutos-\%} = \text{Sa-\%} - \text{Sb-\%}$$

10 jossa Sa-% on S:n %-määrä kontrollissa

Sb-% on S-% tutkittavan fraktion kanssa suoritettun inkuboinnin jälkeen.

15 Fraktiosta poistettiin suolat ammoniumsulfaatin konsentraation pienentämiseksi 20-kertaisesti ennen aktiivisuustutkimusta ja ennen kutakin seuraavaa puhdistusvaihetta.

20 Vaihe 2. Vaiheesta 1 peräisin olevaa epäpuhdasta inhibiittoria käsitellään suolan poiston jälkeen ioninvaihtokromatografialla, joka tässä esimerkissä on DEAE23-selluloosa, ja fraktioidaan ja eluoidaan tämän jälkeen natrium-asetaatipuskurigradientilla (pH 6,0).

Inhibiittorin aktiiviset fraktiot eluoituvat alueella 3 - 5 mM olevissa konsentraatioissa.

25 Kolonnin tilavuus oli 1 ml ja eluointinopeus oli 4 ml tunnissa. Havaitseminen suoritettiin Millicrome-kromatografilla 230 ja 280 nm:n kohdalta. Fraktio 1 (ks. kuvio 2), jossa esiintyi suurin aktiivisuus, eristettiin ja eluointiin 5 mM natriumasetaatipuskurilla (ks. taulukko 6).

30

Taulukko 6

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

- 5 Elektroforeesikoetulokset viittaavat siihen, että tärkein proteiinikontaminantti - albumiini (ks. kuvio 3) poistuu tästä fraktiosta mikä tuottaa vielä nelinkertaisen puhdistumisen.

Vaihe 3. Vaiheesta 2 oleva osittain puhdistettu inhibiittori lisätään suoraan G-75-Sephadex-kolonneihin.

- 10 Kolonnin tilavuus on 20 ml (20 x 1), eluointinopeus on 2 ml tunnissa. Eluointipuskuri on 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Havaitseminen suoritettiin Millicrome-kromatografissa 230 ja 280 nm:n kohdalta. Fraktio 5, jonka aktiivisuus oli korkein, eristettiin.

15 Taulukko 7

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

Vaihe 4. Käänteisfaasikromatografia (Pharmacia FPLC System), jossa käytettiin Pro-REC-kolonneja, suoritetaan Ultrasfera-matriksissa. Proteiini eluoidaan käyttäen 0,1 % trifluorietikkahappoa asetonitriligradientissa.

20

Tuotteen, jonka suhteellinen moolimassa on 16 - 17 kD, homogeenisuus vastaa 90-%:ista homogeenisuutta akryyliamidi/natriumdodekyylisulfaattigeeliansalyysin osoittamalla tavalla (ks. kuvio 6). Tulos on esitetty kuviossa 4. Aktiivisuus määritetään fraktiosta 5. Tuotteen lopullinen saanto on 5 %. Tämän tuloksena on proteiinin, jonka suhteellinen moolimassa on 16 kD, kokonaismäärä

25

puhdistuksen jälkeen on 650 ng/ml alkuperäistä tuotetta. Puhdistusmenetelmän aikana tuotetta käsiteltiin inkuboimalla sitä lämmössä 70 °C:ssa useiden minuuttien ajan, mutta biologisen aktiivisuuden menetystä ei havaittu.

5 Esimerkki 12B: Vaihtoehtoinen menetelmä suurehkojen INPROL-määrien eristämiseksi

Eristyksen alkuvaiheet

- 10 Tuoreista sianruhoista peräisin olevista kylkiluista puhdistetaan lihassyt ja rasva ja ne paloittellaan sitten kappaleiksi ja huuhdellaan suhteessa 1 : 1 (paino/tilavuus) fosfaatilla puskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa. Aikaansaatu seos murskataan hydraulisella puristimella luuytimen erottamiseksi kiinteästä luumateriaalista.

- 15 Luuydinsolujen suspensio kootaan talteen ja suodatetaan puhtaaksi kiinteistä partikkeleista neljän juustoliinakerroksen läpi. Suodosta inkuboidaan 56 °C:ssa 40 minuutin ajan, minkä jälkeen se jäädytetään jäähäuteella 4 °C:een. Tulokseksi saatu saostuma poistetaan sentrifugoimalla 10 000 x g:n voimalla
- 20 30 minuutin ajan 4 °C:ssa ja tämä heitetään pois.

- Selkeytetty supernatantti lisätään pisaroittain seosta samalla sekoittaen 30 minuutin aikana sen omaa tilavuutta 10 kertaa vastaavaan tilavuuteen jääkylmää asetonia, joka sisältää 1 tilavuus-% väkevää suolahappoa.
- 25 Tulokseksi saatua seosta pidetään 4 °C:ssa 16 tunnin ajan saostuman täydellisen muodostumisen aikaansaamiseksi. Tämän jälkeen saostuma sentrifugoidaan napiksi 20 000 x g:n voimalla 30 minuutin ajan 4 °C:ssa. Tämä nappi pestään kylmällä asetonilla ja kuivataan.

30 HPLC-puhdistus

- Nappi liuotetaan HPLC-eluointipuskuriin A, joka sisältää 5 % asetonitriliä (MeCN) ja 0,1 % trifluorietikkahappoa (TFA), siten, että lopulliseksi proteiinikonsentraatioksi tulee 8 - 10 mg/ml. Tätä liuosta (0,5 - 0,6 ml) pipetoidaan 250 x 4,6 mm HPLC-kolonniin, joka oli pakattu Polisil ODS-300:lla [10 µm (mcm)] ja tasapainotettu samalla puskurilla A.
- 35

Eluointi suoritettiin puskuri B:n (90 % MeCN, 0,1 % TFA) gradientilla puskurissa A virtausnopeudella 1 ml minuutissa seuraavan ohjelman mukaisesti:

	aika, min	% B:tä
5	0	0
	4	0
	5	25
	25	90

10 Vielä yksi vaihe, joka sisältää 100 % B:tä viiden minuutin ajan kolonnin pesuun ennen uudelleen tasapainottamista. Tämän jälkeen kolonni tasapainotetaan uudelleen sen palauttamiseksi alkutilaansa ja seuraava proteiinierä voidaan pipetoida kolonniin. Tyypillinen kromatogrammi on esitetty kuviossa 5.

15 Kolonnin efluenttia monitoroidaan erottumisen aikana 280 nm:n kohdalla proteiinipiikkien havaitsemiseksi. Proteiinimateriaalia sisältävät fraktiot kootaan talteen, erotetut piikit yhdistetään ja ne pyöröhaihdutetaan 30 °C:ssa kuivaksi. Saadut haihdutusjäännökset liuotetaan tislattuun veteen ja niistä tehdään määritykset biologista aktiivisuustutkimusta ja SDS-PAGE:a (14-%:inen geeli, pelkistävät olosuhteet) käyttäen. Aktiivista materiaalia sisältävä piikki eluoituu alueella 70 - 80 % puskuria B ja se sisältää SDS-PAGE:n avulla määritettynä 16 kD:n suuruisen pääpiikin ja pieniä määriä nopeammin liikkuvia proteiineja.

25 Kuviossa 15 (A ja C) on esitetty sellaisen materiaalin analyysi, joka on saatu kokoamalla talteen ainoastaan toinen HPLC-pääpiikki. Molemmat piikit (esimerkiksi kuvio 5) sisältävästä materiaalista käytetään tässä selitysosassa nimitystä pINPROL-preparaatti 1 ja pelkästään toisen piikin sisältävistä materiaaleista käytetään nimitystä pINPROL-preparaatti 2. 500 mg tätä aktiivista puhdistettua pINPROL-preparaattia 2 pipetoitiin C4-käänteisfaasikolonnein (Vydac) ja eluointi käytettiin lineaarista gradienttia, joka sisälsi 5 - 95 % asetonitriliä 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. Materiaali eluotui yhtenä piikkinä 53-%:isen asetonitriliin kohdalla (kuvio 30 15A). Kun 250 µg MIP-1α:aa (R & D Systems) ajettiin identtisissä olosuhteissa, se eluotui 43,9-%:isen asetonitriliin kohdalla (kuvio 15B - on pantava merkille, että 14-%:ista asetonitriliä edeltävät piikit ovat artefakteja

ja johtuvat detektorissa esiintyvistä ilmakuplista). Siten luonnossa esiintyvä INPROL on näissä olosuhteissa huomattavasti hydrofobisempi kuin MIP-1 α . TGF β :n tiedetään eluoituvan pienemmissä konsentraatioissa kuin mitä on havaittu pINPROL'in suhteen näissä olosuhteissa [Miyazono, et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 6407 - 15].

Eluoituneen pINPROL-materiaalin geeli on esitetty kuviossa 15C. Kanava 1 on puhdistamaton materiaali, kanava 2 on suhteellisen moolimassan markkerit ja kanava 3 on puhdistettu materiaali. Geelissä esiintyy kaksi päävyöhykettä, joista toinen esiintyy 14 kD:n kohdalla ja toinen noin 35 kD:n kohdalla. 35 kD:n suuruisen vyöhykkeen arvellaan olevan 14 kD:n vyöhykkeen multimeerinen muoto.

Esimerkki 13A: Aktiiviset INPROL-preparaatit sisältävät hemoglobiinin beetaketjua

pINPROL'ia [toisin sanoen pINPROL-preparaatti 1 (ks. esimerkki 12B)] valmistettiin kuviossa 5 esitetyllä tavalla. Materiaalille suoritettiin SDS-PAGE ja se siirrettiin nitroselluloosalle käyttäen vakiomenetelmiä. Materiaalille suoritettiin N-terminaalisen sekvenssin analyysi käyttäen standardimenetelmiä ABI 477A-proteiinisekvenssintilaitteella, joka oli varustettu mallin 120A Online PTH-AA- analysaattorilla. Saatiin seuraava N-terminaalinen sekvenssi:

VHLSAEEKEAVLGLWGKVVNDEV....

Proteiinitietokantojen tietokonehausta kävi ilmi, että tällä sekvenssillä oli identiteettiä sian hemoglobiinin beetaketjun N-terminaalisen sekvenssin suhteen (vrt. kuvio 16C).

Esimerkki 13B: Aktiiviset INPROL-preparaatit sisältävät hemoglobiinin alfaketjua

Kuten kuviossa 15C on esitetty, saatiin proteiinista, joka oli puhdistettu ottamalla talteen kuviossa 5 esitetty toinen pääpiikki (toisin sanoen pINPROL-preparaatti 2), kaksi pääpiikkiä, jotka vastasivat suuruudeltaan noin 15 K ja 30 K olevia suhteellisia moolimassoja, sekä useita sivupiikkejä.

SDS-PAGE-geelit siirrettiin nitroselluloosalle käyttäen vakiomenetelmiä ja yksittäiset vyöhykkeet irrotettiin ja niiden N-terminaalinen sekvenssi analysoitiin samalla tavoin kuin esimerkissä 13A. 15 kD:n vyöhykkeelle saatiin seuraava N-terminaalinen sekvenssi:

5

VLSAADKANVKAAWGKVGGQ

30 kD:n suuruinen vyöhyke pilkottiin rajoitetusti proteolyytisesti ja saatiin seuraava sisäinen sekvenssi:

10

** FPHFNLSHGSDQVK....

Ensimmäisessä sekvenssissä esiintyy identiteettiä sian hemoglobiinin alfa-ketjun N-terminaalisen sekvenssin suhteen, kun taas toisessa sekvenssissä esiintyy identiteettiä sian hemoglobiinin alfa-ketjun ryhmien 43 - 56 suhteen (ks. kuvio 16C, joka koskee ihmisen, hiiren ja sian alfa- ja beeta-hemoglobiiniketjujen vertailua). Kun nämä vyöhykkeet sekä muutama sivuvyöhyke sekvensoitiin uudelleen, saatiin johdonmukaisesti osia alfa-globiinisekvenssistä. Siten kuviossa 15C havaitut useat erilaiset vyöhykkeet edustavat sian hemoglobiinin alfa-ketjun fragmentteja tai aggregaatteja.

20

Esimerkki 13C: Sian INPROL'in tarkempi luonnehtiminen

pINPROL'in vertaamiseksi tarkemmin sian hemoglobiiniin hankittiin Sigma Chemical Company -yhtiöstä kaksi kiteytettyä sian hemoglobiinia ja niille suoritettiin käänteisfaasi-HPLC esimerkissä 12B kuvion 15 kyseessä ollessa kuvatulla tavalla. Kuten kuvioista 17 voidaan havaita, on kokonaisen hemoglobiinin kromatogrammi samanlainen kuin mitä havaitaan pINPROL-preparaatin 1 kyseessä ollessa. Lisäksi pINPROL-preparaatin 2, joka on esitetty kuviossa 17A (toisin sanoen kuvion 5 toisesta piikistä peräisin oleva materiaali), havaitaan osapuolia toisiinsa suoraan verrattaessa menevän osaksi limittäin toisen piikin suhteen niistä kahdesta piikistä, jotka kuuluvat sian hemoglobiinille (kuvio 17B), ja pääpiikkien retentioajat ovat 52, 51 ja 52,25 minuuttia, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. On pantava merkille, että hemi liikkuu hemoglobiinin ensimmäisen pääpiikin mukana, tässä tapauksessa 49,153 minuutin kohdalla; tästä syystä hemi on pINPROL-preparaatin 1 komponentti, mutta ei preparaatin 2 komponentti. Tämän

30

35

varmistaa se, että tällä pINPROL-preparaatilla ei esiinny absorptiota 575 nm:n kohdalla, joka on hemin esiintymistä kuvaava aallonpituus.

5 Sian hemoglobiinin alfa- ja beetaketjujen ennustetut suhteelliset mooli-
massat ovat 15038 daltonia ja 16034 daltonia, mainitussa järjestyksessä
ilmoitettuna. Kuten kuviossa 18 esitetystä SDS-PAGE-kromatogrammista
voidaan havaita, koostuvat ensimmäiset kaksi piikkiä ketjusta, jonka suh-
teellinen moolimassa on suurehko ja toiset kaksi koostuvat ketjusta, jonka
10 suhteellinen moolimassa on näitä pienempi. Siten ensimmäiset kaksi piikkiä
vaikuttavat edustavan hemoglobiinin beeta-ketjua ja toiset kaksi piikkiä
hemoglobiinin alfa-ketjua.

Sian hemoglobiini erotettiin komponenteikseen vielä muissa kokeissa
loivalla eluointigradientilla (kuvio 21). Näiden piikkien N-terminaaliset
15 analyysit osoittivat, että ensimmäinen piikki on sian alfa-ketju ja toinen sian
beeta-ketju. Biologisen määrittelyn tulokset varmistavat sen, että
kummatkin eristetyt hemoglobiiniketjut ovat biologisesti aktiivisia
(esimerkiksi esimerkit 14 ja 15).

20 pINPROL-preparaatin 2 ja hemoglobiinin beeta-ketjun vertaamiseksi
tarkemmin suoritettiin kaksi-suuntaisia elektroforeeseja (kuvio 19).
Isoelektrinen fokusointi suoritettiin ensimmäiseen suuntaan lasiputkissa pH-
alueella 4 - 8 olevilla 2-%:isilla amfoliineilla 9600 voltituntimäärää käyttäen.
Sisäisenä standardina käytettiin tropomyosiinia (suhteellinen moolimassa 33
25 kD, pI 5,2; sen asema on merkitty lopulliseen kaksisuuntaiseen geeliin
nuolella). Putki tasapainotettiin puskurissa ja tämä kiinnitettiin 12,5-%:isen
akryyliamidi-slab-geelin päälle asetetun pinoutumisgeelin päälle. SDS-slab-
geelielektroforeesi suoritettiin neljän tunnin ajan käyttäen virran
voimakkuutena 12,5 mA/geeli. Geelit värjättiin hopea-värjäyksellä ja ne kui-
30 vattiin. Kaksisuuntaisen elektroforeesin tulosten vertailu paljasti ainoastaan
yksi tai kaksi vähäistä täplää, joiden suhteen HPLC:lla puhdistettu
hemoglobiinin beeta-ketju ja pINPROL-preparaatti 2 poikkeavat toisistaan.
Western-analyysit, jotka suoritettiin käyttäen sian hemoglobiinia vastaan
suunnattuja vasta-aineita ja joko yksisuuntaista tai kaksisuuntaista
35 elektroforeesia, varmistavat, että tässä preparaatussi esiintyy beeta-
hemoglobiinia. Siten aktiivinen pINPROL-preparaatti 2, joka on valmistettu
esimerkin 12B mukaisesti, on olennaisesti sian hemoglobiinin beeta-ketju.

Esimerkki 14: Hemoglobiinin alfa-ketjulla, hemoglobiinin beeta-ketjulla tai kokonaisella hemoglobiinilla esiintyy kantasoluja inhiboivaa aktiivisuutta.

- 5 Sen varmistamiseksi, että hemoglobiinin beeta-ketjulla on INPROL-aktiivisuutta, suoritettiin itsetuhomääritys käyttäen luuydintä, joka oli peräisin testosteronilla käsitellyistä hiiristä, käyttämällä esimerkissä 1 kuvattuja menetelmiä ja käyttäen esimerkissä 12B puhdistettua materiaalia. Kuten taulukossa 8 on esitetty, tuhoutui normaaleista hiiren luuydinsoluista 15 % verrattuna 36 %:iin testosteronilla käsitellyissä eläimissä. Kuten oli odotettua, tämä viittasi siihen, että testosteronikäsittely lisää solukierrossa olevien solujen osuutta (mikä siten tekee ne herkemiksi tuhoutumiseen johtavalle käsittelylle - esimerkiksi esimerkki 1). Tälle muodostaa jyrkän vastakohtan se, että soluissa, jotka olivat peräisin testosteronilla käsitellyistä eläimistä ja joita on inkuboitu joko pINPROL'in kanssa tai puhdistetun hemoglobiinin beeta-ketjun kanssa, jonka konsentraatio on 40 mg/ml, tapahtui solukierrossa olevien solujen osuuden silmiinpistävää pienenemistä 36 %:sta 0 %:iin ja 36 %:sta 7 %:iin, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. Suurempi 200 ng:n suuruinen annos oli tehokkuudeltaan vähäisempi kummankin proteiinin kyseessä ollessa. Aikaisemmin luonnehdittu kantasolujen inhibiittori MIP1- α , jota käytettiin positiivisena kontrollina, pienensi solukierrossa olevien solujen määrän 13 %:iin.

- 25 Samanlainen määrittäminen voidaan suorittaa in vitro -olosuhteissa käyttäen CFU-MIX-yksiköiden solukierroksen tilaa CFU-S-yksiköiden solukierroksen tilan tilalla. Määrittäminen suoritetaan edellä kuvatulla CFU-S-määrittämyksen kyseessä ollessa kuvatulla tavalla lukuunottamatta sitä, että solukierrokselle spesifisenä toksisena aineena käytetään sytosiiniarabinosidia (Ara C, 30 mg/ml) sen sijaan, että tähän käytettäisiin suurta annosta tritioitua tymidiiniä [tätä kysymystä on käsitelty artikkeleissa Lord, B.I., teoksessa Haemopoiesis - A Practical Approach, N.G. Testa ja G. Molineux (Eds.), IRL Press 1993; Pragnell, et al., teoksessa Culture of Hematopoietic Cells, Freshney, R.I., Pragnell I.B. ja Freshney M.G. (Eds.), Wiley Liss 1994], ja testosteronilla käsiteltyjen BDF1-hiirten tilalla käytetään hiirikantaa (Balb/c-kanta), jolla solukierrossa olevien solujen määrät ovat endogeenisesti suuria. Kuten taulukossa 9 on esitetty, ovat kumpikin erittäin puhdistetuista sian beeta-ketjusta tai erittäin puhdistetusta sian alfa-ketjusta aktiivisia tässä

määrittämisessä. On pantava merkille, että tässä määrittämisessä esiintyy pINPROL'illa käsiteltyjen solujen kyseessä ollessa toisinaan sellaisia solukierrossa olevien solujen määriä, että arvot tulevat negatiivisiksi, mikä viittaa siihen, että Ara C -käsitellyssä yhdistelmässä esiintyy useampia pesäkkeitä kuin käsittelemättömässä yhdistelmässä.

Kuten esimerkissä 2 on kuvattu, pINPROL inhiboi hiiren FDCP-MIX-kantasolulinjan lisääntymistä määrittämisessä, joka perustuu tritoidun tymidiinin kerääntymiseen soluihin. Kuviossa 20 on osoitettu, että kumpikin hemoglobiinin puhdistetuista alfa- ja beeta-ketjuista ovat aktiivisia tässä määrittämisessä ja inhibitiot havaitaan konsentraatiossa < 2 mg/ml.

Edellä olevassa esityksessä on esitetty todisteita siitä, että sian hemoglobiinin beeta-ketjulla esiintyy INPROL-aktiivisuutta. Muut koetulokset (esimerkiksi taulukko 9, kuvio 20) osoittavat, että eristetty alfa-ketju sekä kokonainen hemoglobiini ovat myös aktiivisia kantasolujen inhibiittoreina. Aktiiviset preparaattit sisältävät myös alfa- ja beeta-ketjujen seoksia (esimerkiksi kuvio 5).

Havainnot, joiden mukaan eristetty alfa-globiiniketju ja/tai beeta-globiiniketju ovat aktiivisia, viittaavat siihen, että tässä selitysosassa kuvatuissa aktiivisuuksissa ei tarvita eheää kolmiulotteista hemoglobiinirakennetta. Myös alfa- ja beeta-ketjun fragmentit ovat aktiivisia kantasolujen inhibiittoreina.

25

Taulukko 8

Käsittely	Tuhoutumis-%
NBM ¹	15
TPBM ²	36
pINPROL 200 ng/ml	23
40 ng/ml	0
Hbg ³ 200 ng/ml	25
40 ng/ml	7
MIP-1 α 200 ng/ml	13

1. NBM = normaali luuydin

2. TPBM = testosteronilla käsitellyistä hiiristä peräisin oleva luuydin

- 5 3. Hbg = käänteisfaasilla puhdistettu sian hemoglobiinin beeta-ketju (peräisin kaksi kertaa kiteytetystä sian hemoglobiinista)

Taulukko 9

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli ¹	43
Sian alfaketju ²	-4
Sian beetaketju ²	-14

- 10 1. Kontrolli - BALB/C-hiiristä peräisin oleva luuydin

2. 100 ng/ml (puhdistettu kuviossa 21 kuvatulla tavalla)

Esimerkki 15: Puhdistettu INPROL, puhdistettu sian alfa-hemoglobiini tai puhdistettu sian beeta-hemoglobiini ovat aktiivisia in vivo -olosuhteissa

15

Jotta kyettäisiin tutkimaan puhdistettujen sian hemoglobiiniketjujen toimintaa in vivo -olosuhteissa, injektointiin PDF1-hiiriin testosteronipropionaattia esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Hiirille annettiin 24 tuntia myöhemmin 500

ng joko pINPROL'ia, sian hemoglobiinin alfa-ketjua (tämä oli puhdistettu perifeeraalisen veren punasoluista kuviossa 21 kuvatulla tavalla), sian beeta-ketjua (puhdistettu perifeeraalisen veren punasoluista kuviossa 21 esitetyllä tavalla) tai vastaava tilavuus kantaja-ainetta suonen sisäisesti. Kustakin
 5 hiirestä otettiin luuydin talteen 48 tunnin kuluttua ja CFU-MIX-määrittys suoritettiin esimerkissä 14 kuvatulla tavalla. Kuten taulukossa 10 on osoitettu, olivat pINPROL, sian alfa-ketju ja sian beeta-ketju kaikki aktiivisia in vivo -olosuhteissa ja ne vähensivät solukierrossa olevien CFU-MIX-solujen osuuden perustasoille.

10

Taulukko 10

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli ¹	45
pINPROL ²	5
Sian alfaketju ²	5
Sian beetaketju ²	-5
Perustaso ³	4

¹Kontrolli - testosteronilla käsitellyistä BDF₁-hiiristä peräisin oleva luuydin

²100 ng/ml

15 ³Perustaso - käsittelemättömistä BDF₁-hiiristä peräisin oleva luuydin

Esimerkki 16: Kaikilla ketjuista, jotka ovat puhdistettu ihmisen hemoglobiinin alfa-ketju, biotinyloitu ihmisen hemoglobiinin alfaketju, biotinyloitu ihmisen hemoglobiinin beetaketju, ihmisen hemoglobiinin gammaketju ja ihmisen hemoglobiinin deltaketju, esiintyy kantasoluja inhiboivaa aktiivisuutta in vitro -olosuhteissa

20

25

Ihmisen hemoglobiinia hankittiin joko yhtiöstä Sigma Chemical Corporation tai se eristettiin vakiomenetelmin aikuisen ihmisen perifeeraalisesta verestä tai napaverestä. Yksittäiset ketjut eristettiin käänteisfaasi-HPLC:lla samalla tavoin kuin mitä on kuvattu edellä sian alfa- ja beetaketjujen kyseessä ollessa [tätä on käsitelty julkaisussa Masala, B. ja Manca, L., Methods in Enzymology 231 (1994) 21 - 44]. Saatiin käyttöön puhdistettuja alfa-, beeta-,

gamma- ja deltaketjuja. Biotinyloitujen alfa- ja beeta-ketjujen kyseessä olleessa käsiteltiin yhtä milligrammaa aikuisen yksilön humaanin hemoglobiinia 37 µg:lla NHSLC-biotiinia (Pierce) ja ketjut erotettiin käänteisfaasikromatografialla edellä kuvatulla tavalla.

5

Kuten taulukoissa 11, 12 ja 13 on esitetty, ovat kaikki ketjuista, jotka ovat puhdistettu ihmisen alfa-, biotinyloitu ihmisen alfa-, biotinyloitu ihmisen beeta-, ihmisen gamma- ja ihmisen delta-hemoglobiiniketju, aktiivisia CFU-MIX-solukiertomäärityksessä.

10

Taulukko 11

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli ¹	49
Humaanialfaketju ²	-1
Humaanibeetaketju ²	41
Humaanigammaketju ²	-63

¹Kontrolli - Balb/c-hiiristä peräisin oleva luuydin

²100 ng/ml

15

Taulukko 12

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli ¹	47
Humaanigammaketju ²	12
Humaanideltaketju ²	-4

¹Kontrolli - Balb/c-hiiristä peräisin oleva luuydin

²100 ng/ml

20

Taulukko 13

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli ¹	68
Humaanialfaketju ²	19
Biotinyloitu alfaketju ²	7
Humaanibeetaketju ²	55
Biotinyloitu beetaketju ²	25

¹Kontrolli - Balb/c-hiiristä peräisin oleva luuydin

²100 ng/ml

5

Esimerkki 17: puhdistettu ihmisen alfaketju, alfa-beeta-dimeeri tai hemoglobiini ovat aktiivisia in vivo -olosuhteissa

10

Puhdistettu ihmisen alfaketju, alfa-beeta-dimeeri tai hemoglobiini tutkittiin in vivo -olosuhteissa suoritettua määrityksessä esimerkissä 15 kuvatulla tavalla. Kuten taulukossa 14 on esitetty, olivat kukin näistä aktiivisia konsentraatiossa 500 ng/hiiri.

Taulukko 14

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli ¹	49
Humaanialfaketju	-22
Humaani-alfa-beeta-dimeeri	14
Humaanihemoglobiini	-31

15

¹Kontrolli - testosteronilla käsitellyistä BDF1-hiiristä peräisin oleva luuydin

Esimerkki 18: Sian INPROL on aktiivinen ihmisen mononuklearisoluja kohtaan tai CD34⁺-napaverisoluja kohtaan in vitro -olosuhteissa

- Sen tutkimiseksi, miten sian luuytimeistä peräisin oleva puhdistettu INPROL kykenee vaikuttamaan solukierrossa oleviin ihmisen esiastesoluihin, hankittiin käyttöön napaveren verisoluja. Käytettiin joko Ficoll'issa suoritettua
- 5 eristyksen jälkeen saatua kokonais-mononukleearisolufraktiota tai CD34⁺-fraktiota, joka oli saatu anti-CD34-affiniteettikolonneissa (CellPro Inc.) suoritettua fraktioinnin jälkeen. Soluja inkuboitiin 48 tuntia in vitro -olosuhteissa interleukiini-3:n (IL-3) ja kantasolutekijän (SCF) (kummankin konsentraatio 100 ng/ml) läsnäollessa sen varmistamiseksi, että
- 10 varhaisvaiheen kantasolut olivat solukierrossa. Tämän esi-inkuboinnin jälkeen suoritettiin solukiertomääryksiä menetellen esimerkissä 14 kuvatulla tavalla, jossa oli kysymyksessä hiiri, lukuunottamatta sitä, että 18. päivänä maljauksen jälkeen laskettiin CFU-GEMM-yksiköt (CFU-MIX-yksiköiden sijaan). Kuten taulukossa 15 on esitetty, esti sian INPROL CFU-
- 15 GEMM-yksiköiden solukierrossa joko erottelemattomissa mononukleearisoluissa tai CD34⁺-fraktiossa.

Taulukko 15

Käsittely	Tuhoutumis-%
Mononukleearisolut	
Kontrolli	93
pINPROL ¹	16
CD34 ⁺ -solut	
Kontrolli	41
pINPROL ¹	21

20 ¹100 ng/ml

Esimerkki 19: puhdistettu ihmisen alfa-hemoglobiini on aktiivinen ihmisen CFU-GEMM-yksiköitä kohtaan

25 Hankittiin käyttöön ihmisen napaveren mononukleearisoluja ja niitä inkuboitiin IL-3:ssa ja SCF:ssa ja niitä käytettiin solukiertomäärytykseen

esimerkissä 18 kuvatulla tavalla. Kuten taulukossa 16 on esitetty, sekä luuytimeistä puhdistettu sian INPROL että perifeeraalisesta verestä puhdistettu ihmisen alfa-hemoglobiini olivat aktiivisia tässä määrityksessä.

5 Taulukko 16

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli	100
pINPROL ¹	-6
Humaanialfaketju	-23

¹100 ng/ml

10 Esimerkki 20: Humaani-alfa-hemoglobiinisekvensseistä ja humaanibeeta-hemoglobiinisekvensseistä saadut peptidit ovat aktiivisia

15 Aktiivisten peptidisekvenssien tunnistamiseksi kohdistettiin myoglobiinin (joka on inaktiivinen tässä määrityksessä) kolmiulotteinen rakenne aikuisen ihmisen hemoglobiinissa esiintyvän alfaketjun natiivin kolmiulotteisen rakenteen suhteen käyttäen tietokonemallintamisohjelmaa. Kaksi peptidiä (nämä edustivat aminohappoja 43 - 55 ja 64 - 82, jotka ovat alueita, jotka poikkeavat rakenteensa puolesta myoglobiinista kolmiulotteisessa avaruudessa), tunnistettiin peptideiksi, joilla oli aktiivisuutta CFU-MIX-solukiertomäärityksessä. Jotta peptidin rakenne olisi saatu muistuttamaan 20 tarkemmin natiivissa alfaketjussa havaittua silmukkaa, syntetoiitiin disulfidisidosta käyttäen myös 43 - 55-peptidin syklinen johdannainen (C43-55), jonka havaittiin olevan aktiivinen.

Näiden peptidien sekvenssi on seuraava:

25 43-55 Phe-Pro-His-Phe-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val

c(43-55) Cys-Phe-Pro-His-Phe-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys (jossa kaksi Cys-ryhmää sitoutuvat toisiinsa disulfidisidoksella)

30 64-82 Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala

Tutkittiin kahta hemorfiinisekvenssiä, hemorfiini 10 (beeta-ketjun sekvenssin aminohapot 32 - 41) ja hemorfiini 7 (aminohapot 33 - 40), ja niiden havaittiin olevan aktiivisia.

5

Sekvenssit olivat seuraavat:

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

10 Hemorfiini 7 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg

Näiden sekvenssien aktiivisuuden tutkimiseksi suoritettiin CFU-MIX-solukiertomääritys esimerkissä 14 kuvatulla tavalla. Kuten taulukoissa 17 - 19 on esitetty, olivat nämä kaikki peptidit aktiivisia tässä määityksessä.

15

Taulukko 17

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli	47
pINPROL ¹	0
Peptidi (43-55)	
100 ng/ml	2
10 ng/ml	18
1 ng/ml	11

¹100 ng/ml

20

Taulukko 18

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli	43
Peptidi (43-55) ¹	5
Peptidi (64-82) ¹	9
Hemorfiini 10 ¹	1
Hemorfiini 7 ¹	0

¹Kaikki peptidit tutkittiin konsentraatiossa 100 ng/ml

5 Taulukko 19

Käsittely	Tuhoutumis-%
Kontrolli	47
Syklinen peptidi 43-55 ¹	0

¹Tutkittu konsentraatiossa 100 ng/ml

- 10 Vaikka tämä keksintö on kuvattu sen edullisten sovellutusmuotojen muodossa, on selvää, että alan ammattikokemuksen perusteella on oivallettavissa sen variaatioita ja modifikaatioita. Tästä syystä oheisten patenttivaatimusten tarkoituksena on kattaa kaikki tällaiset vastaavat variaatiot, jotka kuuluvat keksinnön suojapiiriin sellaisena kuin se on patenttivaatimuksissa esitetty.

Patenttivaatimukset

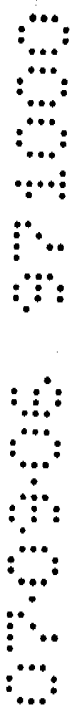
1. Peptidi, **tunnettu** siitä, että sen sekvenssi on Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val.
- 5
2. Syklinen peptidi, **tunnettu** siitä, että sen sekvenssi on Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys, jossa kaksi Cys-ryhmää muodostavat disulfidisidoksen tai liittyvät toisiinsa hiilisillan välityksellä.
- 10
3. Peptidi, **tunnettu** siitä, että sen sekvenssi on Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala.
4. Jokin peptidin, jonka sekvenssi on:
Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val,
15 Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys (jossa kaksi Cys-ryhmää muodostavat disulfidisidoksen tai liittyvät toisiinsa hiilisillan välityksellä),
Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala,
20 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,
25 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 tai
30 Tyr-Pro-Trp-Thr,
käyttö valmistettaessa kantasolun lisääntymisen inhiboimiseen tarkoitettua lääkettä.
5. Kasvua stimuloivan INPROL-määrän käyttö valmistettaessa B-solujen kasvun stimuloimiseen käytettävää lääkettä, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.
- 35

6. Kantasolujen lisääntymistä inhiboivan määrän INPROL'ia käyttö valmistettaessa syövän, erityisesti leukemian, hoidossa käytettävää lääkettä, tai valmistettaessa kantasolujen jakautumisen inhiboimiseen nisäkkäässä, jossa on tapahtunut altistumista kantasoluja tuhoavalle tai vahingoittavalle aineelle, kuten antiviraaliselle aineelle, käytettävää lääkettä, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.
7. Menetelmä nisäkkäiden hematopoieettisten kantasolujen säilyttämiseksi ex vivo -olosuhteissa, **tunnettu** siitä, että hematopoieettiset solut saatetaan kosketukseen kantasolujen lisääntymistä inhiboivan INPROL-määrän kanssa, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut hematopoieettiset solut on valittu joukosta, jossa on luuydinsoluja, perifeeraalisen veren soluja, mobilisoituneita perifeeraalisen veren soluja ja napaveren soluja.
9. Liikalisääntymistä rajoittavan määrän INPROL'ia käyttö valmistettaessa myeloproliferatiivisen sairauden tai autoimmuunisairauden tai epiteelikantasolujen liikalisääntymisen nisäkkäässä, joilla näitä sairauksia esiintyy, kuten myelodysplastisen oireyhtymän, hoidossa käytettävää lääkettä, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.
10. Kantasoluja suojaavan määrän INPROL'ia käyttö valmistettaessa lääkettä, jolla annetaan nisäkkäässä esiintyville normaaleille kantasoluille mutta ei syöpäsoluille differentiaalisesti suoja kemoterapiaa tai säteilyä vastaan, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.
11. INPROL'in käyttö valmistettaessa rokotteen lisäainetta, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.
12. Sellaisen määrän INPROL'ia, joka kääntää liikalisääntymisen kulun päinvastaiseksi käyttö valmistettaessa lääkettä, jolla hoidetaan sellaista nisäkstä, jolla kantasolujen liikalisääntyminen on aiheuttanut immunologisen järjestelmän toiminnan heikkenemistä, mainitun INPROL'in ollessa vaatimuksessa 4 määritelty peptidi.

5

10

15



Patentkrav

1. Peptid, **kännetecknad** därav, att dess sekvens är Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val.
- 5 2. Cyklisk peptid, **kännetecknad** därav, att dess sekvens är Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys, i vilken två Cys-grupper bildar en disulfidbindning eller är förenade med varandra genom en kolbrygga.
- 10 3. Peptid, **kännetecknad** därav, att dess sekvens är Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala.
4. Användning av någon peptid med sekvensen:
Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val,
15 Cys-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Cys (i vilken två Cys-grupper bildar en disulfidbindning eller är förenade med varandra genom en kolbrygga),
Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala,
20 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,
25 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 eller
30 Tyr-Pro-Trp-Thr,
för framställning av ett läkemedel för inhibering av en stamcells proliferation.
5. Användning av en tillväxtstimulerande mängd av INPROL för framställning av ett läkemedel för stimulering av B-cellers tillväxt, varvid nämnda INPROL är
35 en peptid definierad i patentkravet 4.
6. Användning av en stamcells proliferation inhiberande mängd av INPROL vid framställning av ett läkemedel för behandling av cancer, i synnerhet

leukemi, eller för framställning av ett läkemedel för att inhibera stamcelldelning hos ett däggdjur, som har utsatts för ett stamceller förstörande eller skadande medel, såsom ett antiviralt medel, medan nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

5

7. Förfarande för konservering ett däggdjurs hematopoietiska stamceller i ex vivo -förhållanden, **kännetecknat** därav, att hematopoietiska celler bringas i kontakt med en stamcellers proliferation inhiberande mängd av INPROL, varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

10

8. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** därav, att nämnda hematopoietiska celler är valda från en grupp, vilken innehåller benmärgsceller, perifериella blodkroppar, mobiliserade perifериella blodkroppar och strängblodkroppar.

15

9. Användning av en hyperproliferation hämmande mängd av INPROL för framställning av ett läkemedel för behandling av en myeloproliferativ sjukdom eller autoimmun sjukdom eller hyperproliferation av epitelstamceller hos ett däggdjur, som lider därav, såsom ett myelodysplastiskt syndrom, varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

20

10. Användning av en stamcellskyddande mängd av INPROL för framställning av ett läkemedel för differentiellt skydd av normala stamceller men inte cancerceller hos ett däggdjur från kemoterapi eller strålning, varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

25

11. Användning av INPROL för framställning av ett vaccins adjuvans, varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

30

12. Användning av en sådan mängd av INPROL, som omvänder hyperproliferation för framställning av ett läkemedel för behandling av ett däggdjur med immunnedsättning orsakad av stamcellers hyperproliferation, varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

35

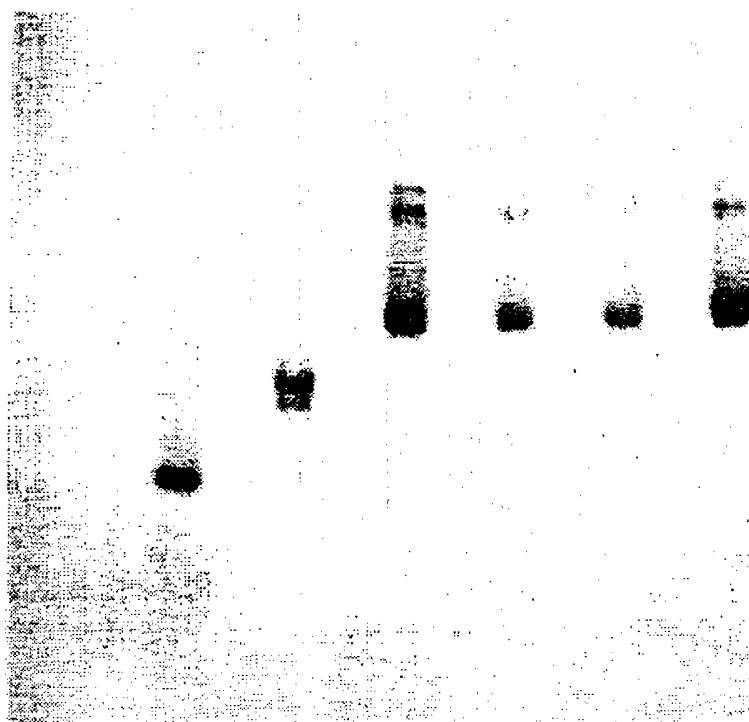
13. Förfarande för stamcellexpansion i ex vivo -förhållanden, **kännetecknat** därav, att förfarandet omfattar, att de hematopoietiska cellerna bringas i

14. Farmaceutisk komposition, **kännetecknad** därav, att den innehåller (a) INPROL och (b) åtminstone en inhiberande förening, vilken är vald från en grupp, som består av MIP-1 α , TGF β , TNF α , INF α , INF β , INF γ , pyroGlu-Glu-Asp-Cys-Lys-pentapeptid, N-asetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-tetrapeptid och glutation-tripeptid (Gly-Cys- γ Glu), varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.

15. Farmaceutisk komposition, **kännetecknad** därav, att den innehåller (a) INPROL och (b) åtminstone en stimulerande förening, vilken är vald från en grupp, som består av IL-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, erythropoietin, trombopoietin, stamcellfaktor och flk2/flt3-ligand, varvid nämnda INPROL är en peptid definierad i patentkravet 4.



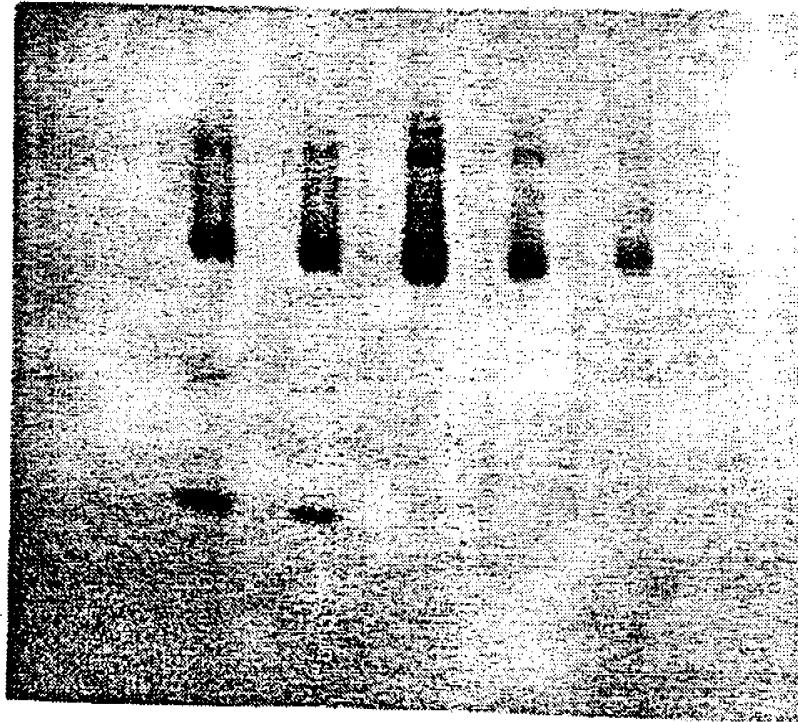
1 2 3 4 5 6



Kuvio 1

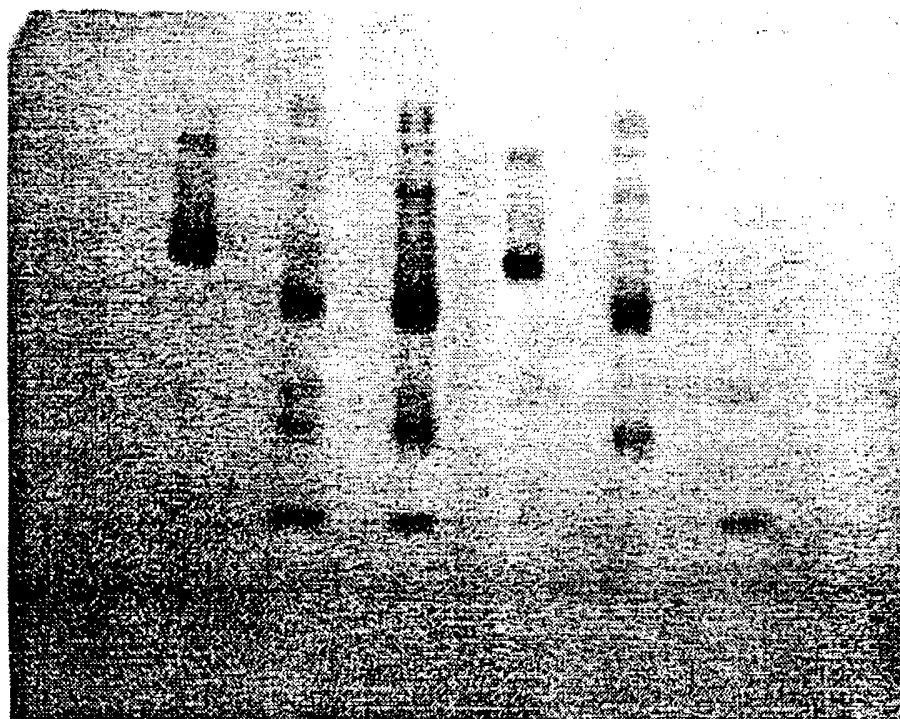
0001150000

1 2 3 4 5



Kuvio 2

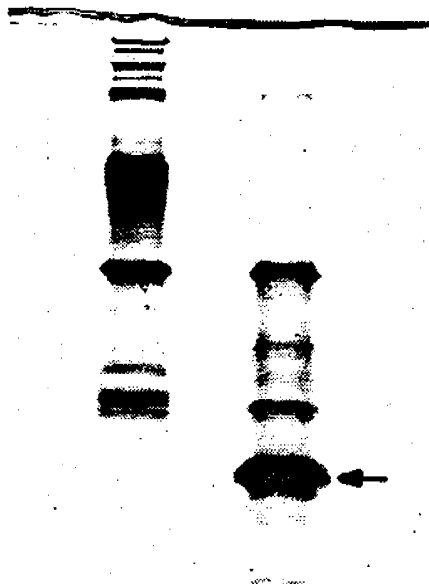
1 2 3 4 5 6



Kuvio 3

117468

4/26

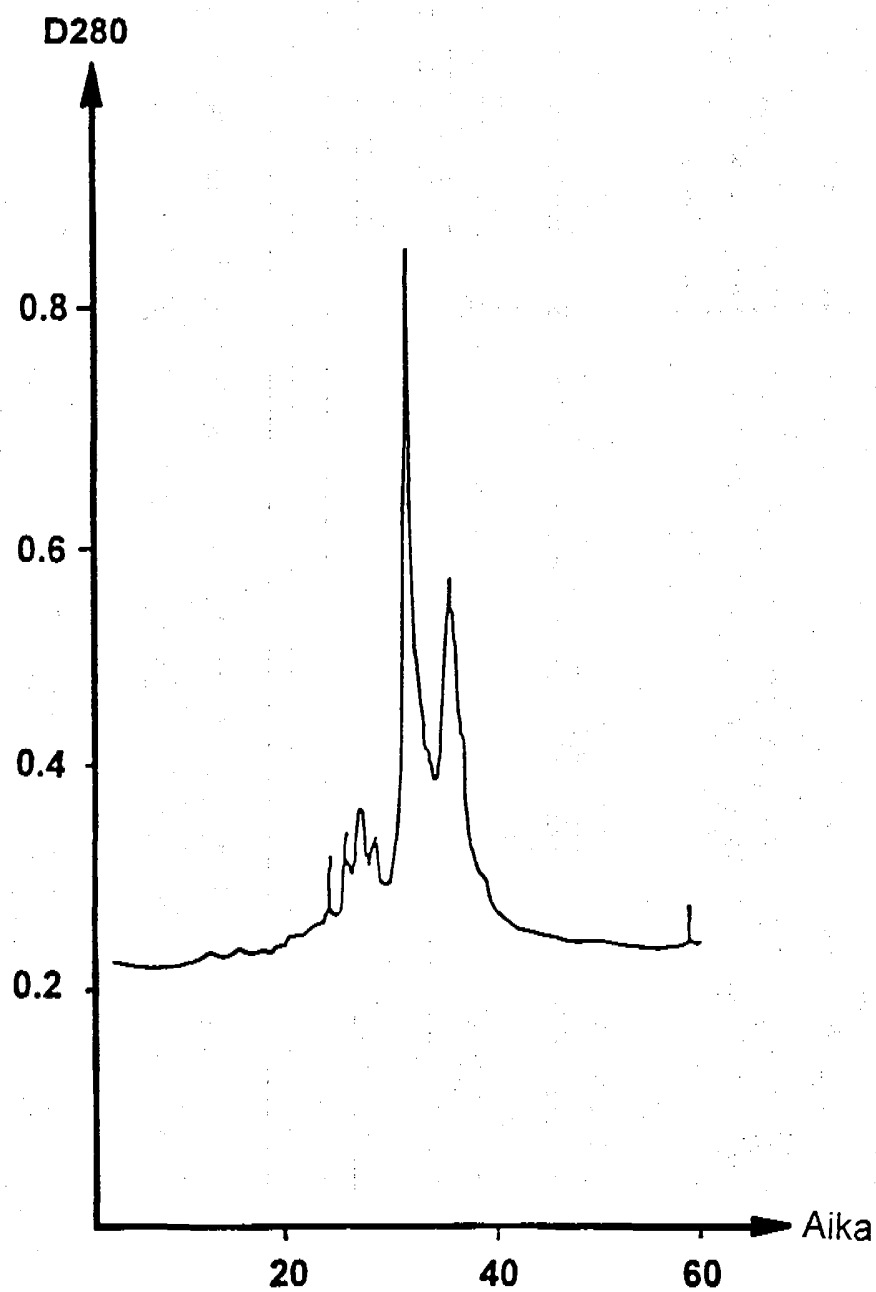


2000 1500 1000 750 500 250

Kuvio 4

5/26

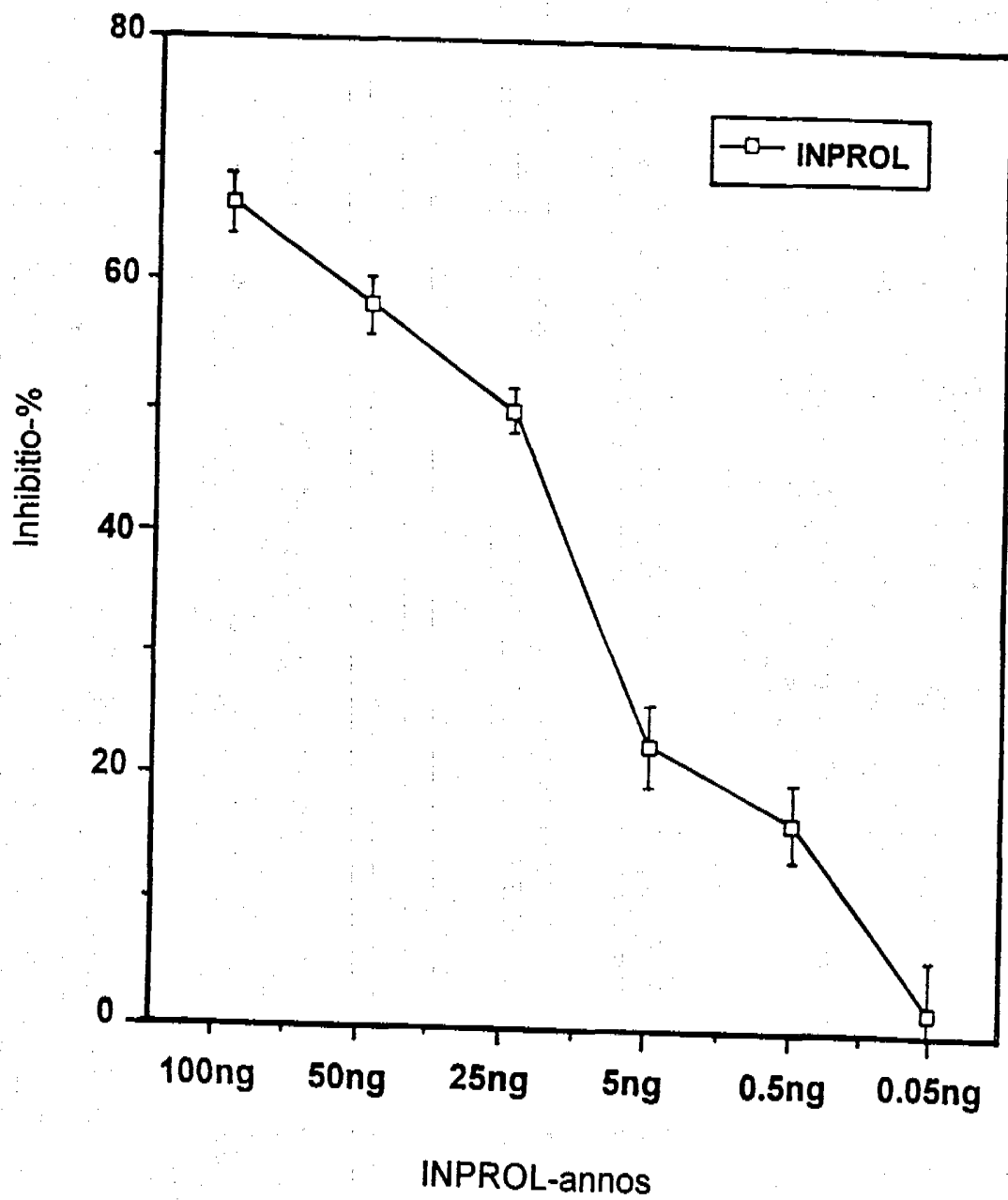
117468



Kuvio 5

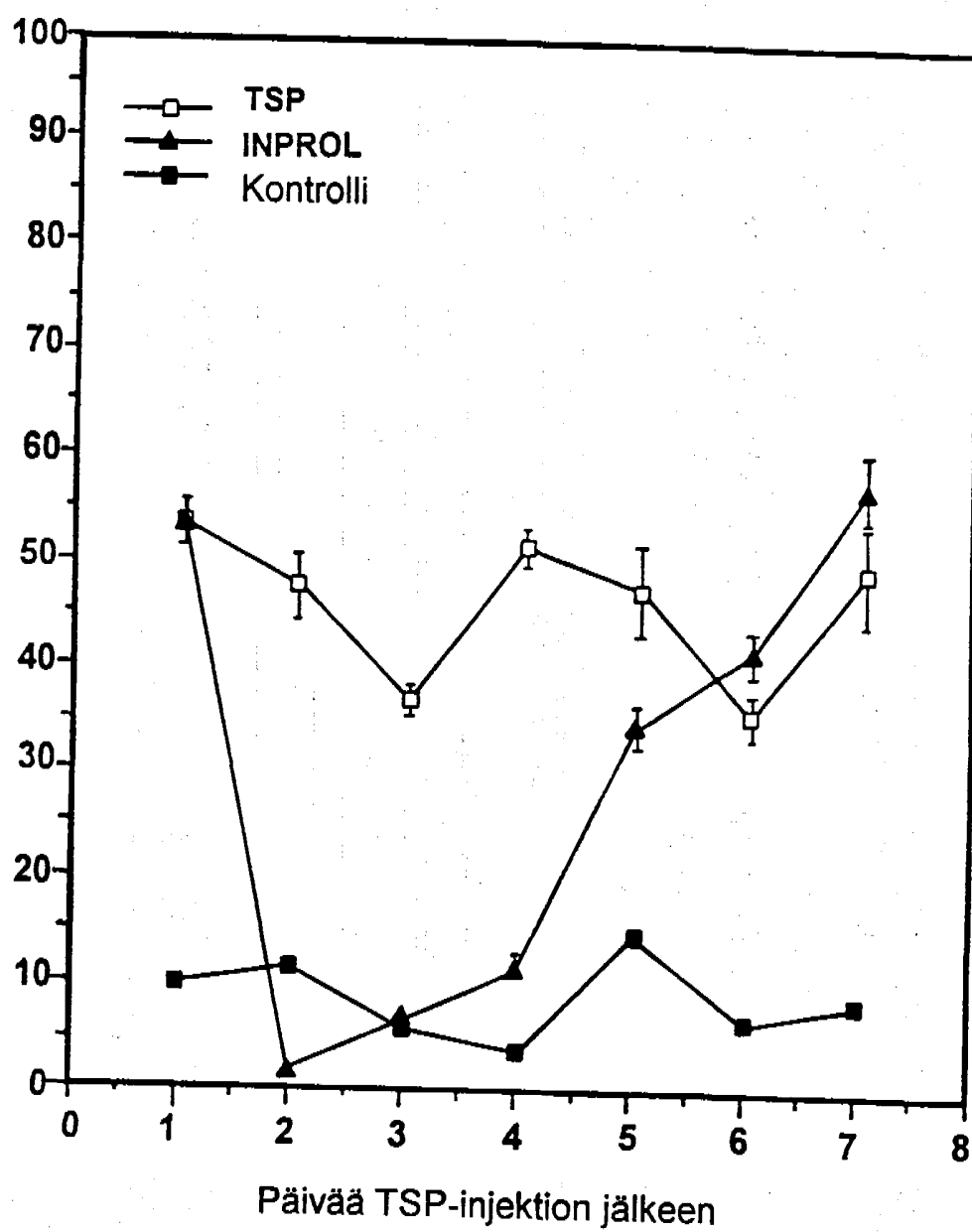
6/26

117468



Kuvio 6

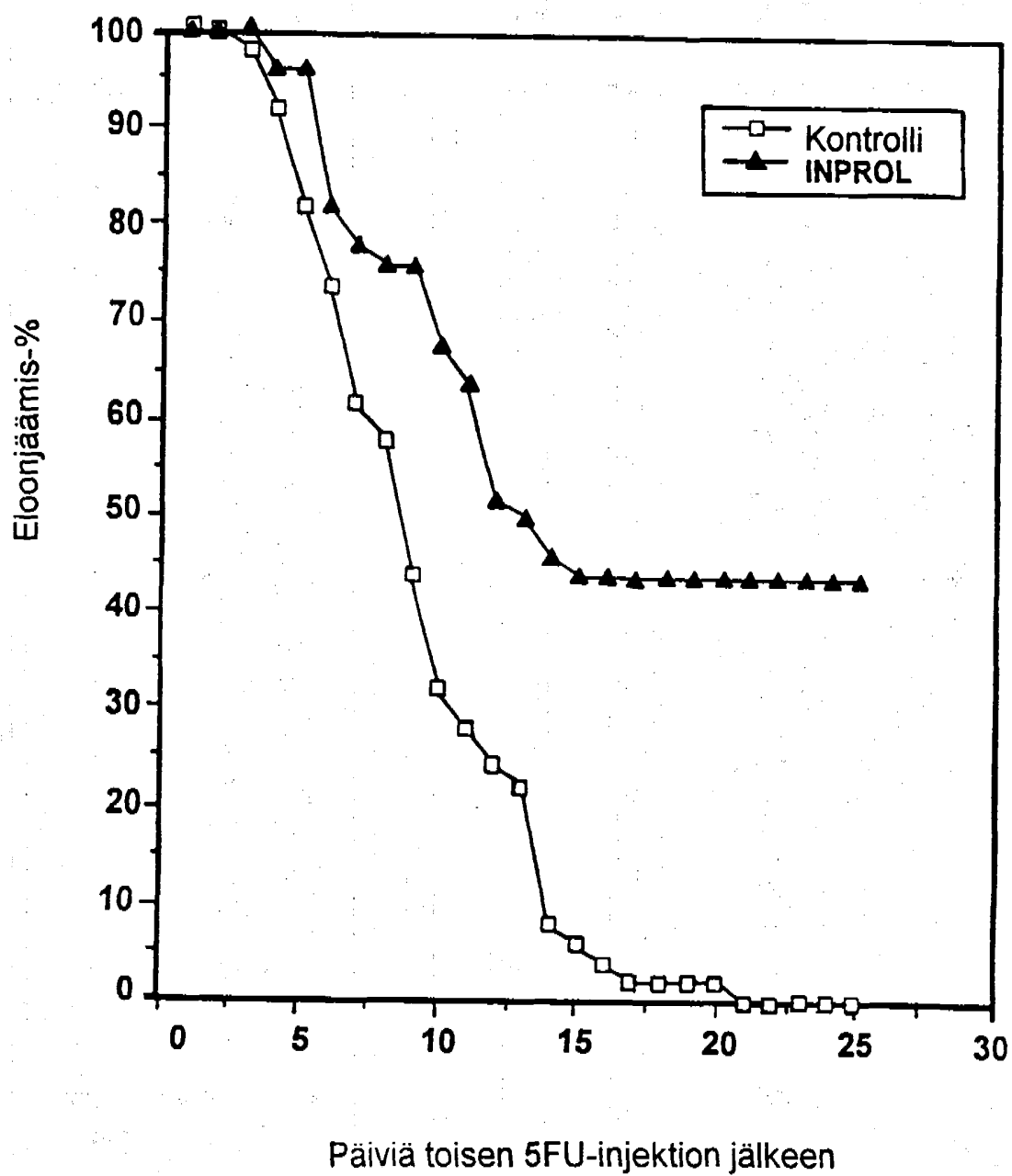
S-vaiheessa olevien pesäkkeitä muodostavien yksikköjen %-määrä



Kuvio 7

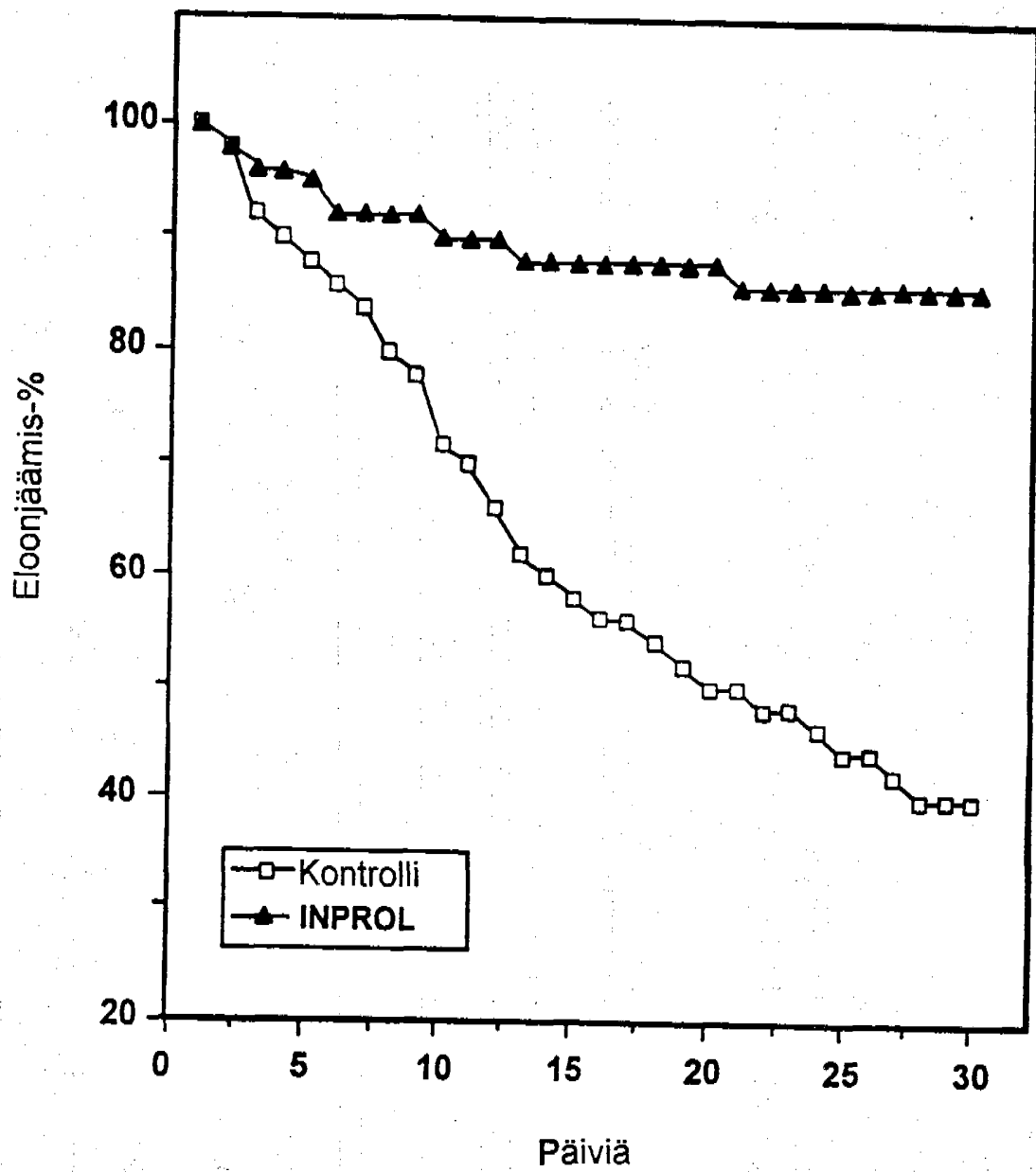
8/26

Kuvio 8

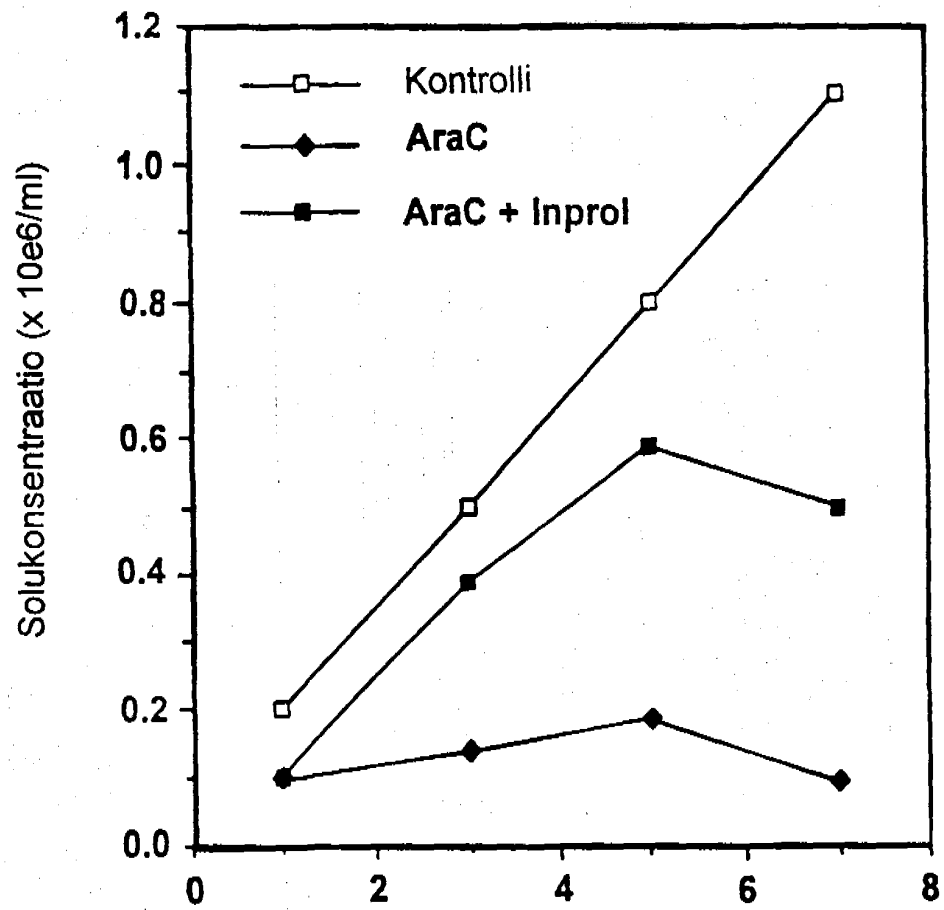


9/26

117468

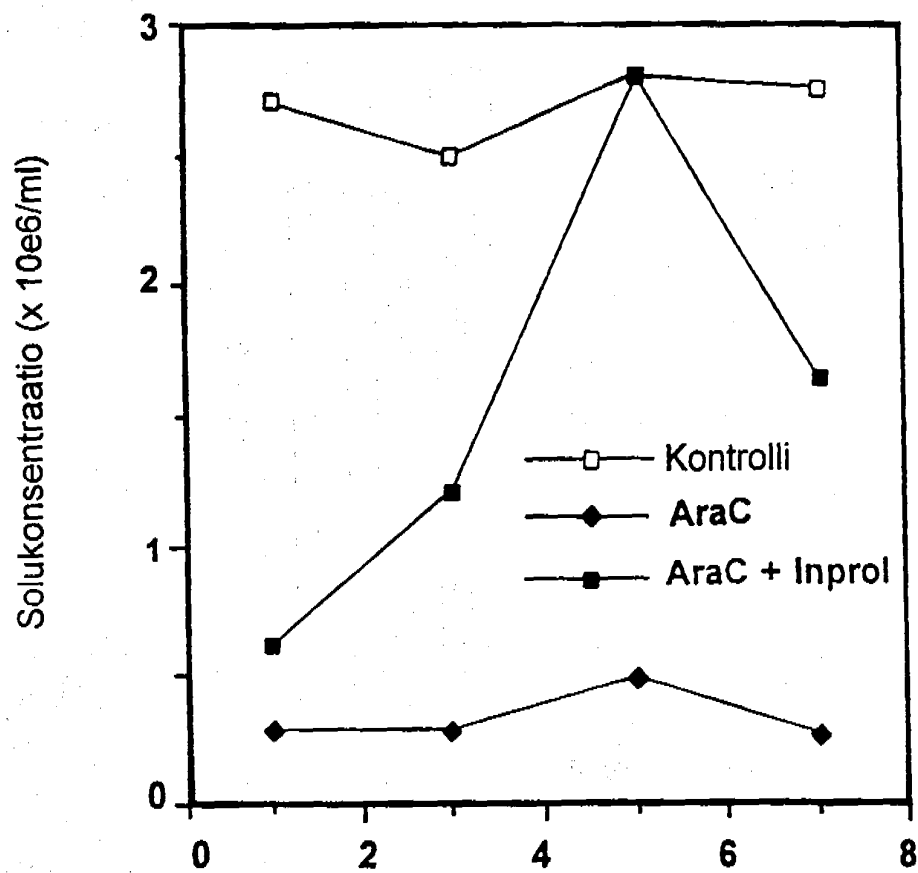


Kuvio 9



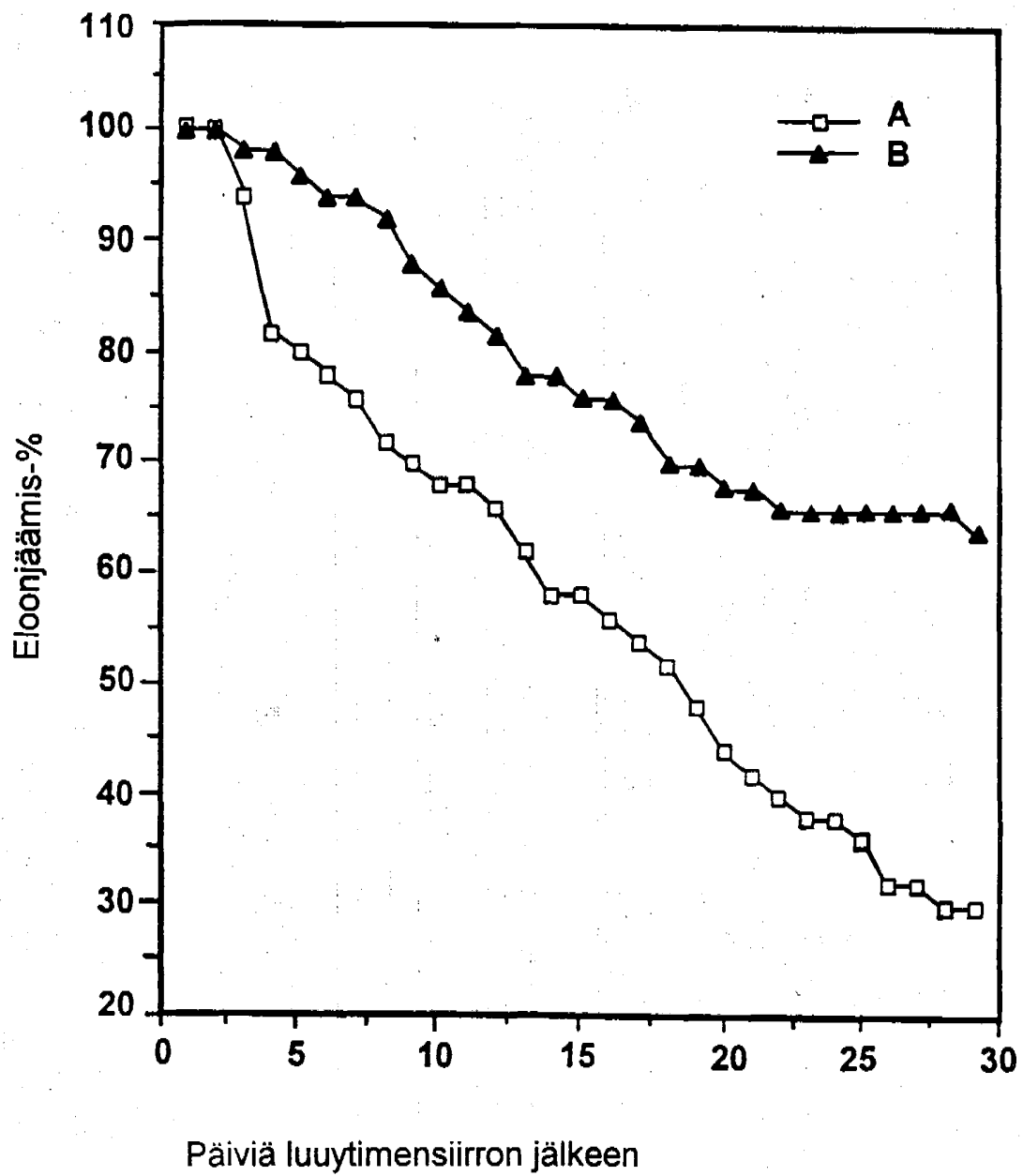
Käsittelyn jälkeisen ensimmäisen viikon päivät

Kuvio 10A

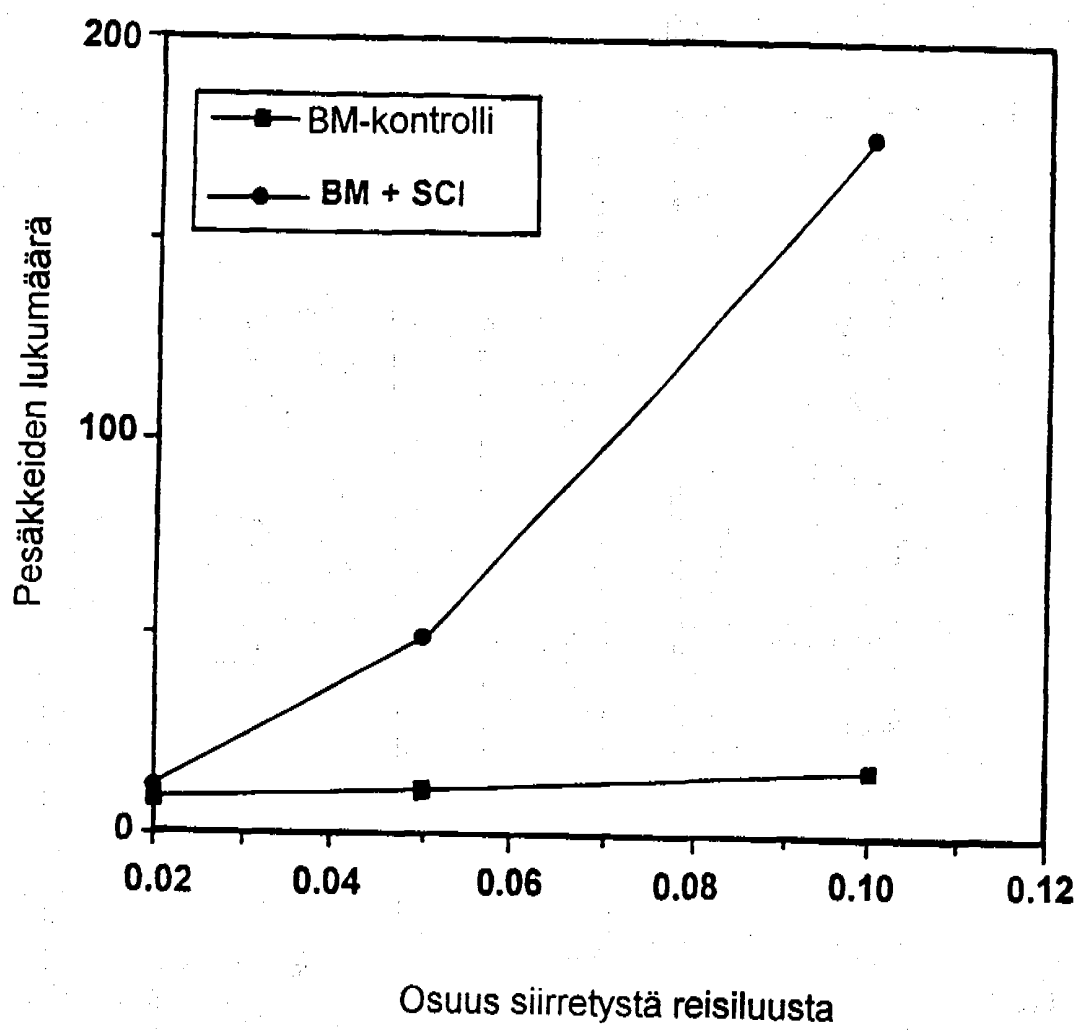


Käsittelyn jälkeisen kolmannen viikon päivät

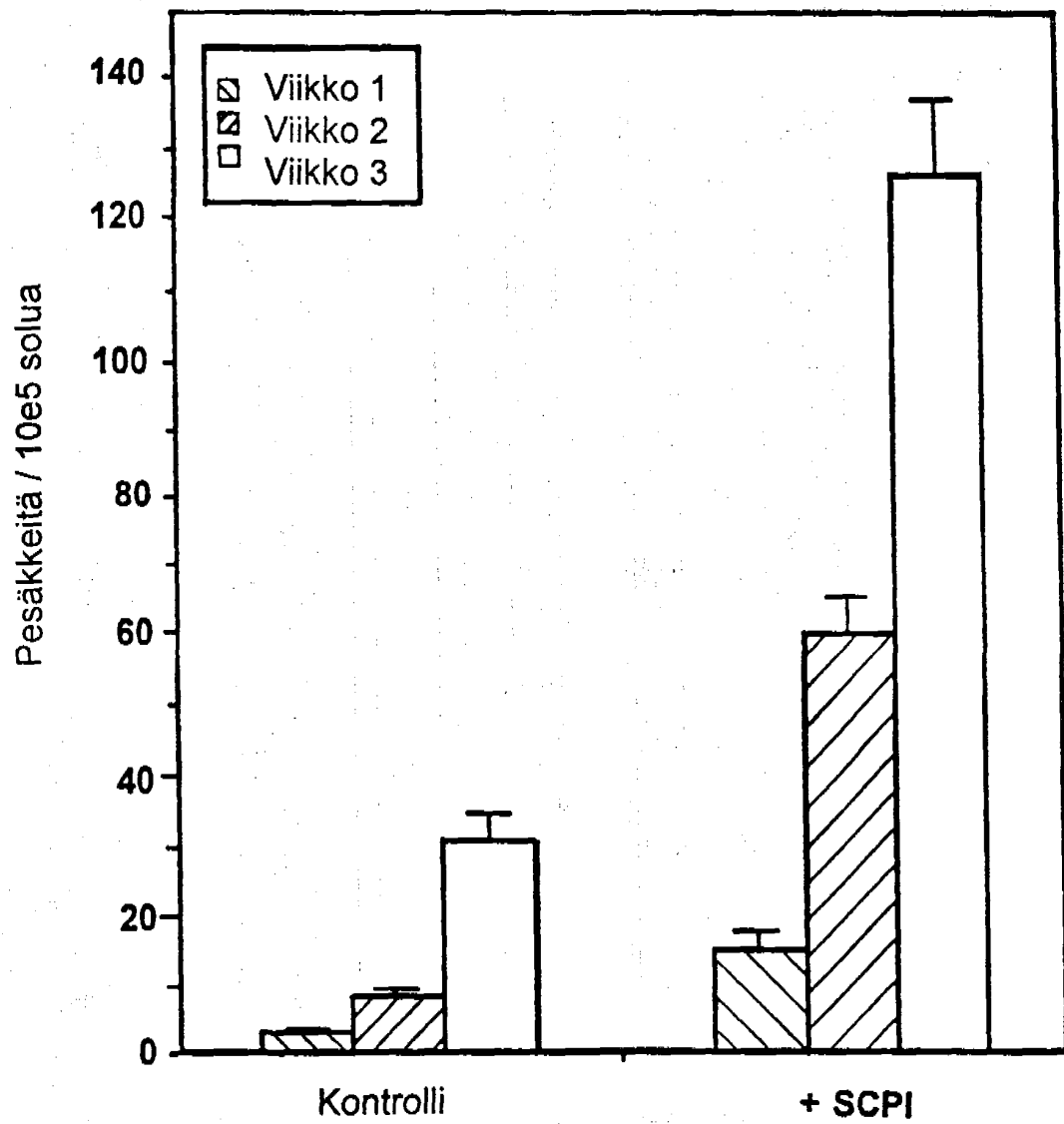
Kuvio 10B



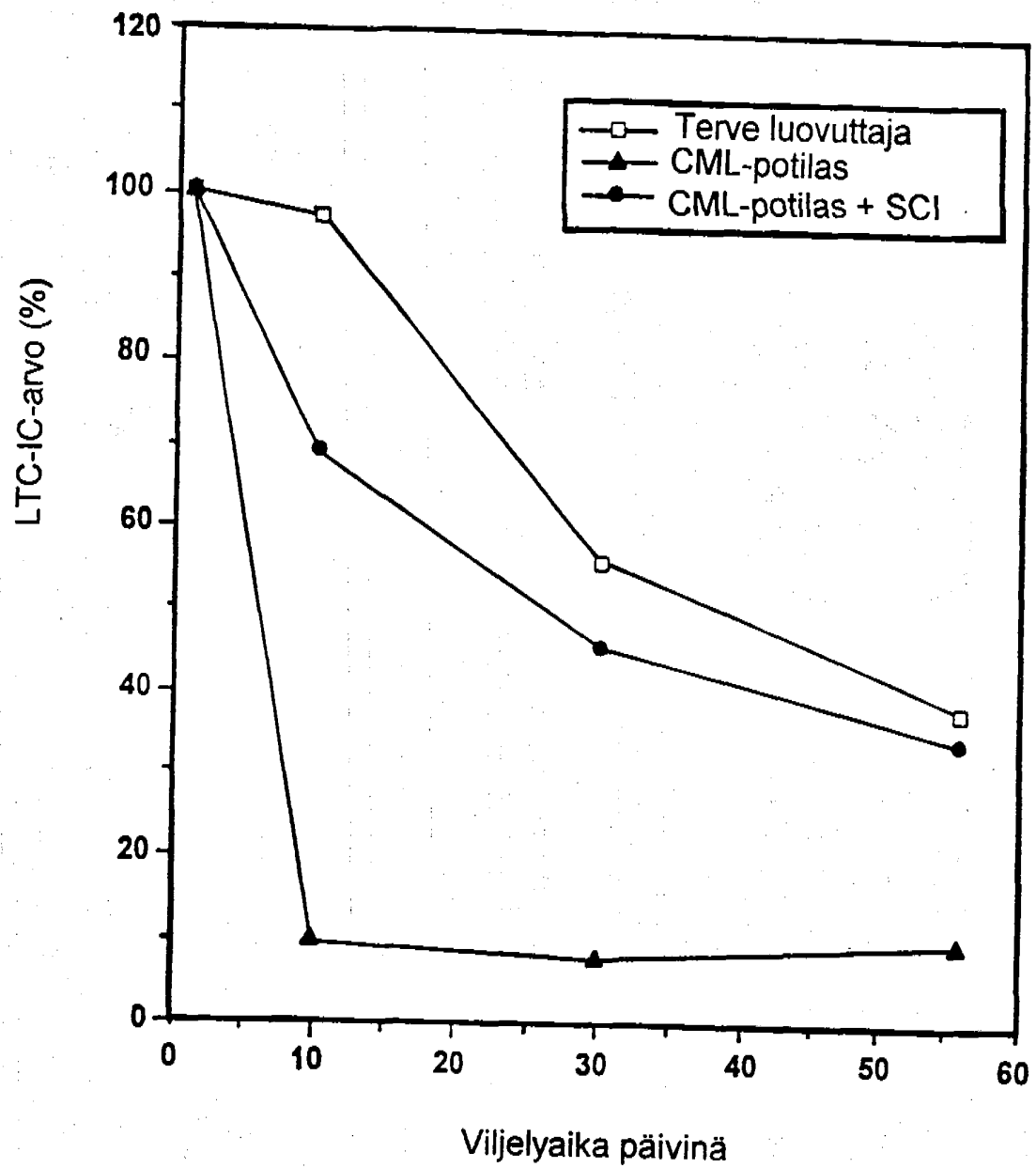
Kuvio 11



Kuvio 12



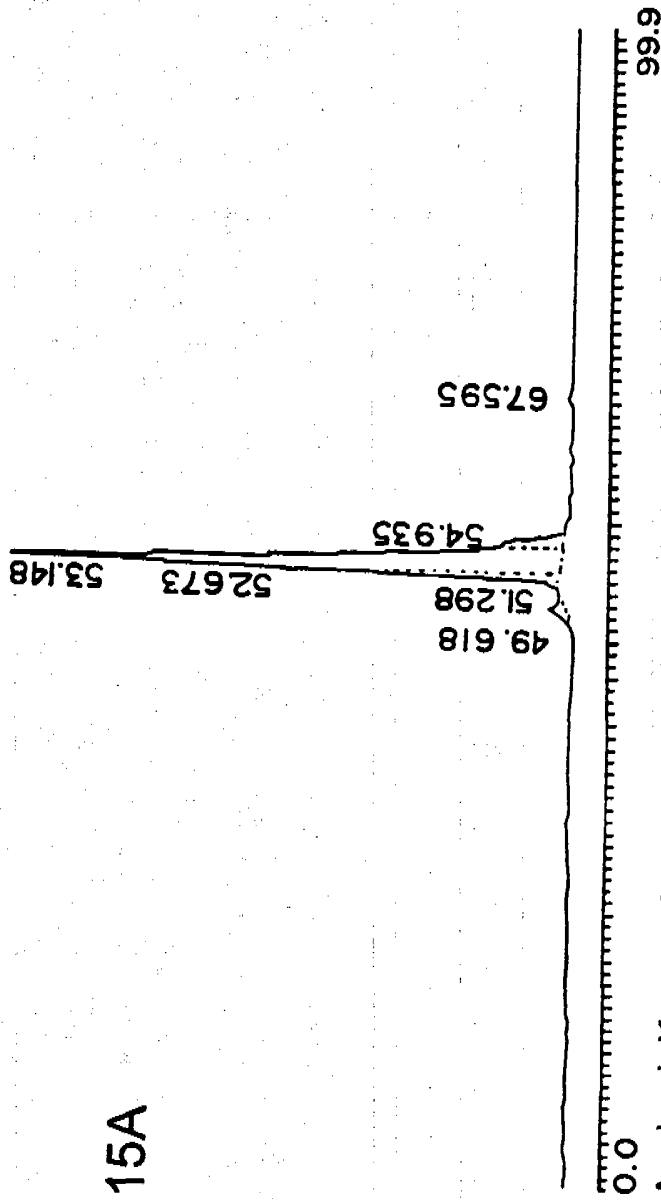
Kuvio13



Kuvio 14

000397 371000

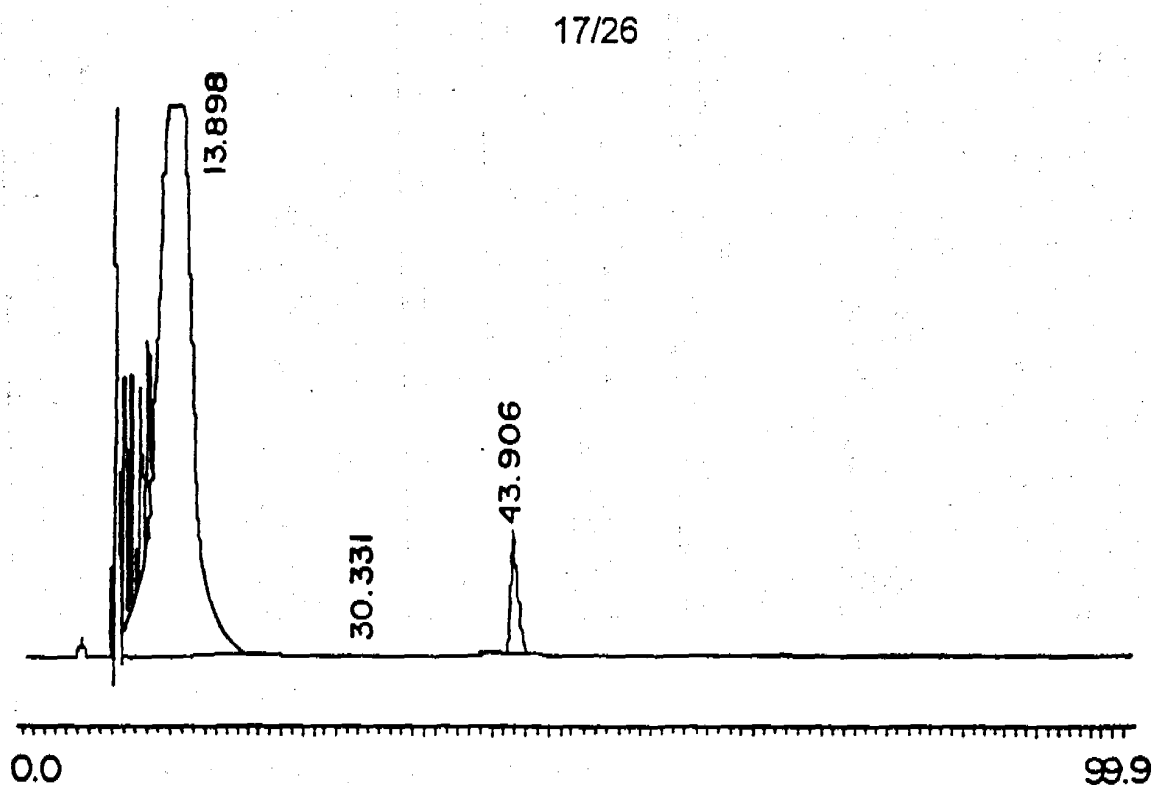
Kuvio 15A



Analyysi: Kanava A

Piikkin nro	Aika	Tyyppi	Korkeus (μY)	Pinta-ala (μY-sec)	Pinta-ala (%)
1	3.126	N1	691	7578	0.041
2	3.315	N2	1011	5150	0.027
3	49.618	N	8584	349227	1.893
4	51.298	N	1456	20274	0.109
5	52.673	N1	138069	2633395	14.278
6	53.148	N2	271587	14050458	76.181
	54.935	N3	33016	1332820	7.226
	67.595	N	3270	44507	0.241
KOKONAISPINTA-ALA				18443409	99.996

117468



Analyysi: Kanava A

Piikin nro	Aika	Tyyppi	Korkeus (μY)	Pinta-ala ($\mu Y\text{-sec}$)	Pinta-ala (%)
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

Kuvio 15B

A vertical strip of 12 small, square images showing a sequence of a person's face from a neutral expression to a full smile.

1 2 3



Kuvio 15C

117468

19/26

Kuvio 16A

[illegible]

Kuvio 16B

[illegible]

117468

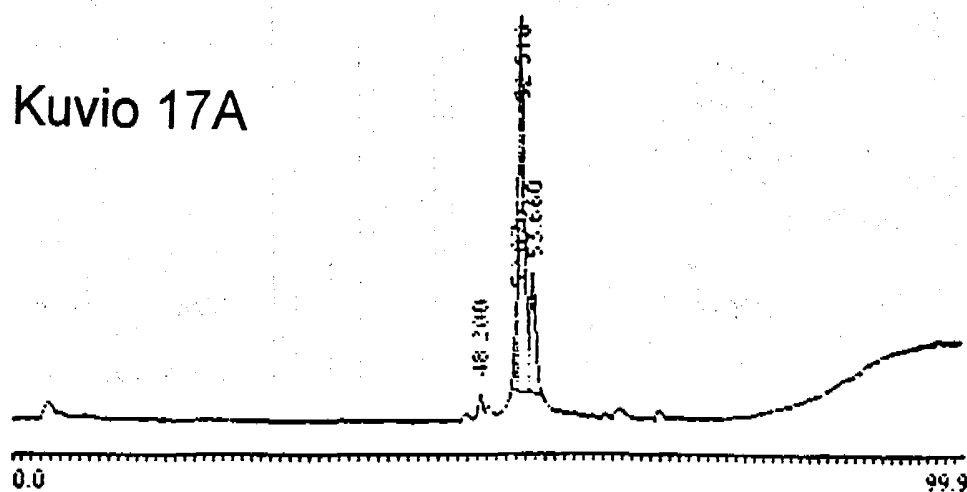
21/26

Kuvio 16 C

hHemA. pep	10	20	30	40	50
hHemB. pep	10	20	30	40	50
mHemA. pep	10	20	30	40	50
mHemB. pep	10	20	30	40	50
pHemA. pep	10	20	30	40	50
pHemB. pep	10	20	30	40	50
hHemA. pep	60	70	80	90	100
hHemB. pep	60	70	80	90	100
mHemA. pep	60	70	80	90	100
mHemB. pep	60	70	80	90	100
pHemA. pep	60	70	80	90	100
pHemB. pep	60	70	80	90	100
hHemA. pep	110	120	130	140	150
hHemB. pep	110	120	130	140	150
mHemA. pep	110	120	130	140	150
mHemB. pep	110	120	130	140	150
pHemA. pep	110	120	130	140	150
pHemB. pep	110	120	130	140	150
hHemA. pep	160	170	180	190	200
hHemB. pep	160	170	180	190	200
mHemA. pep	160	170	180	190	200
mHemB. pep	160	170	180	190	200
pHemA. pep	160	170	180	190	200
pHemB. pep	160	170	180	190	200

22/26

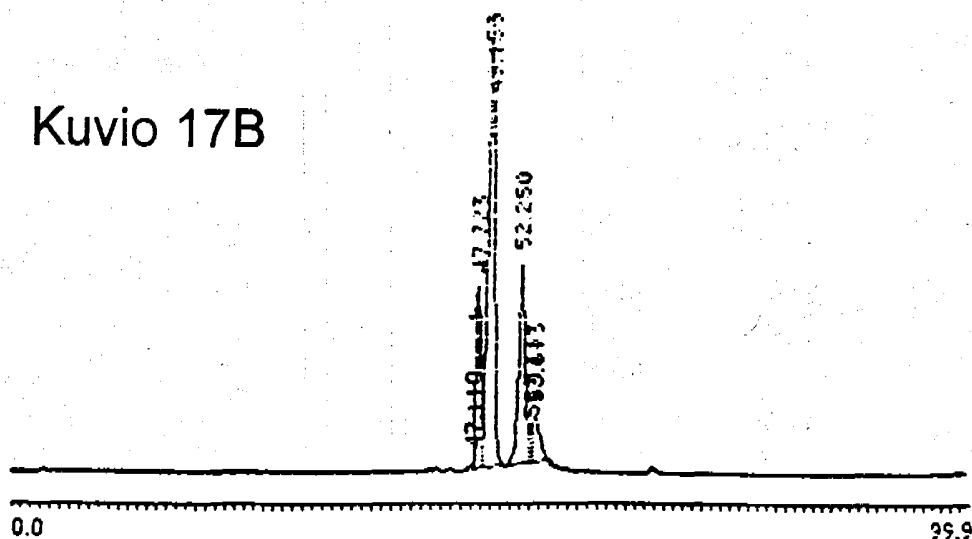
Kuvio 17A



Analyysi: Kanava A

Piikin nro	Aika	Tyyppi	Korkeus (μ Y)	Pinta-ala (μ Y-sec)	Pinta-ala-%
1	48.200	N	1677	20438	1.515
2	52.076	N1	7629	116393	8.631
3	52.510	N2	32010	881490	65.369
4	53.560	N3	10066	330153	24.485
Kokonaispinta-ala				1340474	99.998

Kuvio 17B

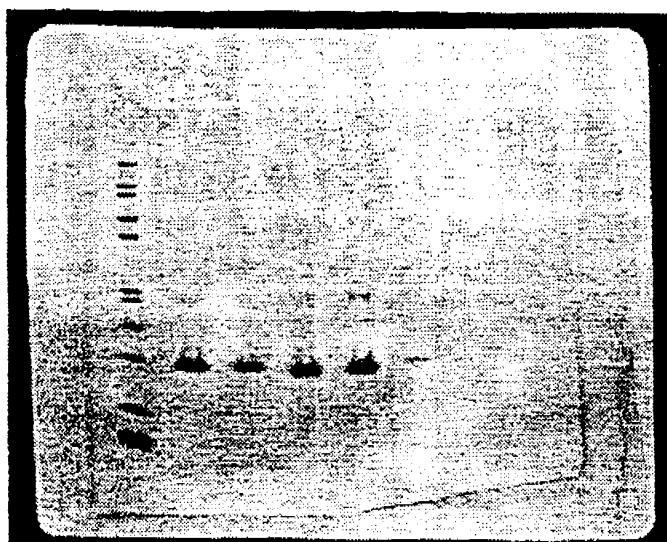


Analyysi: Kanava A

Piikin nro	Aika	Tyyppi	Korkeus (μ Y)	Pinta-ala (μ Y-sec)	Pinta-ala-%
1	47.110	N1	1727	24840	0.204
2	47.723	N2	75067	1738939	14.321
3	49.153	N3	188795	6206410	51.114
4	52.250	N1	81476	3046748	25.092
5	53.113	N2	15195	202166	1.664
6	53.613	N3	19211	914954	7.535
	65.753	N	813	8066	0.066
Kokonaispinta-ala				12142123	99.996

117468

23/26

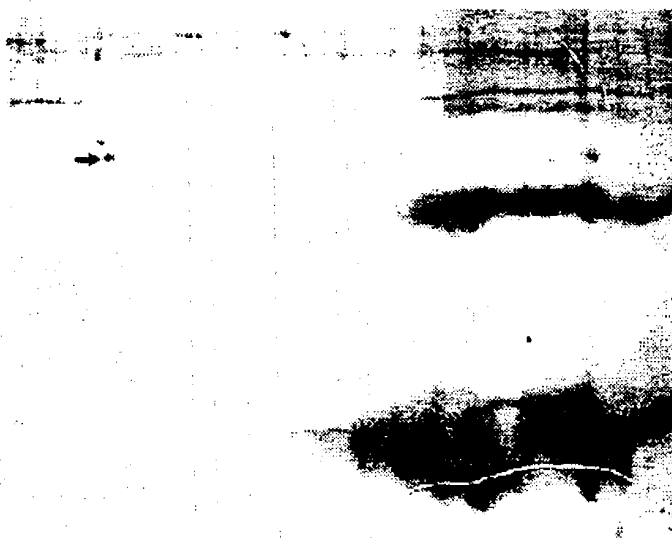


Kuvio 18

[illegible]



Kuvio 19A



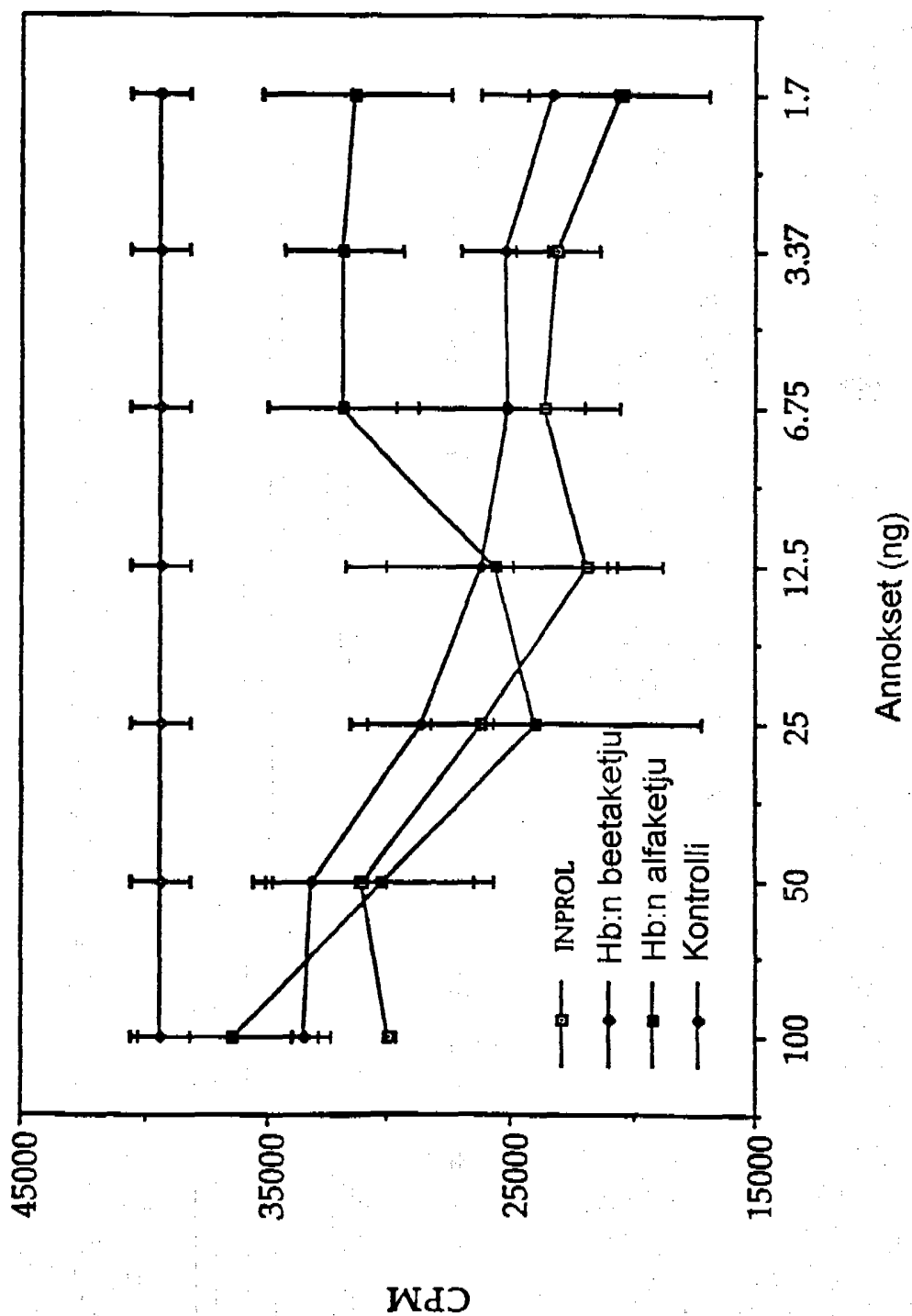
Kuvio19B

28.03.97 971000

25/26

117468

Kuvio 20

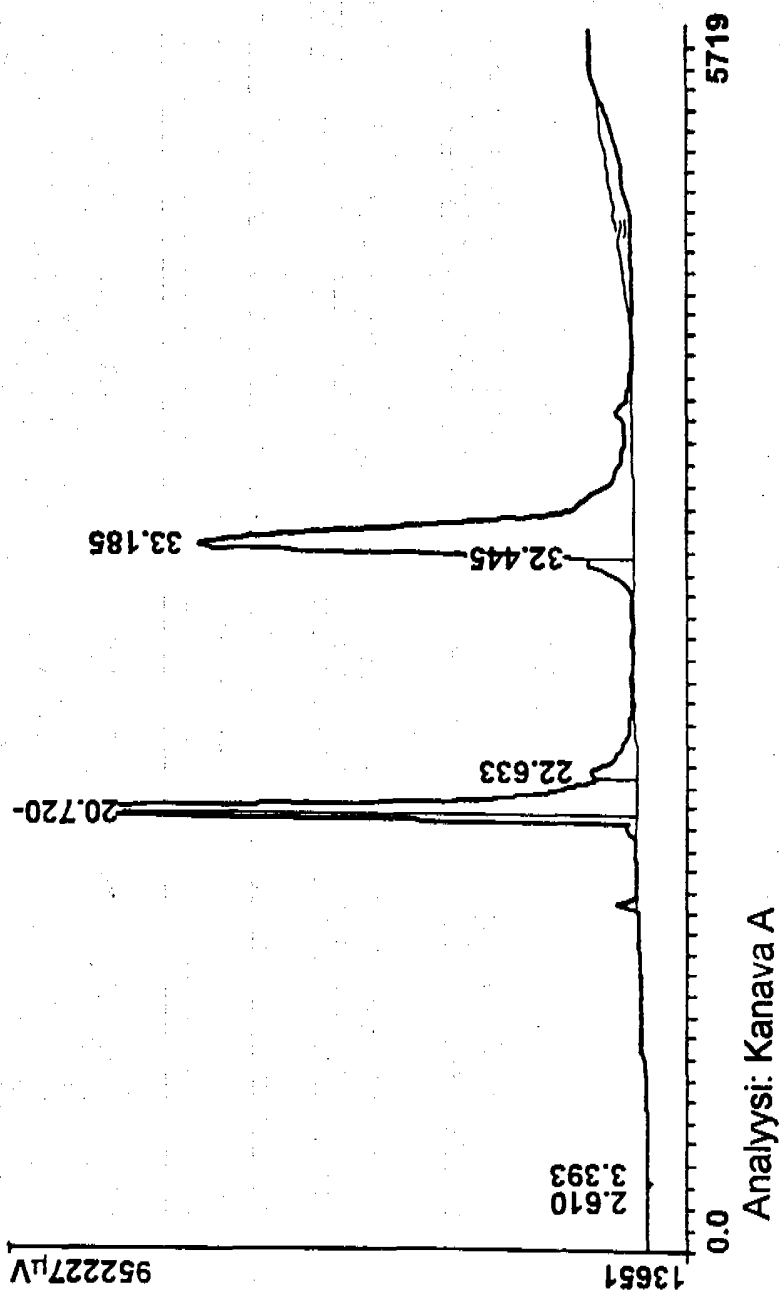


00055 271000

26/26

117468

Kuvio 21



Analys: Kanava A