



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 32 813 T2 2005.03.17**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 784 677 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 813.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/12268**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 935 119.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/010634**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **11.04.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.07.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **31.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.03.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/00**

C12N 5/00, A61K 38/00, C07K 1/00,

B01D 61/42, C08L 51/04

(30) Unionspriorität:

316424 30.09.1994 US

535882 28.09.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Wellstat Therapeutics Corp., Gaithersburg, Md.,
US**

(72) Erfinder:

**KOZLOV, Vladimir, Novosibirisk, RU; TSyrLOVA,
Irena, Gaithersburg, US; WOLPE, D., Stephen,
Rockville, US**

(74) Vertreter:

Buschhoff-Hennicke-Althaus, 50672 Köln

(54) Bezeichnung: **INHIBITOR DER STAMMZELLENPROLIFERATION UND DESSEN VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Inhibitoren der Stammzellproliferation zur Regulierung des Stammzellzyklus bei der Behandlung von Menschen oder Tieren, die Autoimmunkrankheiten, Altern, Krebs, Myelodysplasie, Präleukämie, Leukämie, Psoriasis oder andere Krankheiten haben, die hyperproliferative Zustände mit sich bringen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Behandlung von Menschen oder Tieren, die chemotherapeutischen Mitteln, anderen im Zellzyklus befindliche Stammzellen schädigenden Mitteln oder Bestrahlungen ausgesetzt werden sollen oder ausgesetzt waren. Schließlich bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine Verbesserung bei Stammzellen-Erhaltungs- und -Expansionskulturen für Auto- oder Allotransplantationsverfahren oder für Gentransfer.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die meisten Endstadiumzellen in sich erneuernden Systemen sind kurzlebig und müssen kontinuierlich im Laufe des Lebens ersetzt werden. Zum Beispiel stammen Blutzellen von einer selbsterneuernden Population an multipotenten, blutbildenden Stammzellen (hematopoietic stem cells; HSC) ab. Die blutbildenden Stammzellen sind eine Untergruppe der blutbildenden Zellen. Blutbildende Zellen können z.B. aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripherem Blut (entweder immobilisiert oder mobilisiert mit einem Mittel wie G-CSF) erhalten werden; blutbildende Zellen enthalten die Stammzellenpopulation, Vorläuferzellen, differenzierte Zellen, Hilfszellen, Stromazellen und andere Zellen, die zu der für die Bildung von reifen Blutzellen notwendigen Umgebung beitragen. Da die blutbildenden Stammzellen für die Entwicklung aller reifen Zellen des blutbildenden und des Immunsystems notwendig sind, ist ihr Überleben essentiell, um ein voll funktionsfähiges Abwehrsystem des Wirts in Subjekten wiederherzustellen, die mit Chemotherapie oder anderen Mitteln behandelt wurden.

[0003] Die Produktion von blutbildenden Zellen wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert, die das Wachstum und die Differenzierung der blutbildenden Zellen stimulieren, von denen einige, z.B. Erythropoietin und G-CSF, derzeit in der klinischen Praxis verwendet werden. Ein Teil des Kontrollnetzwerkes, der jedoch nicht umfassend charakterisiert wurde, ist der Rückkopplungsmechanismus, der den negativen Arm des Regulierungsprozesses darstellt (Eaves et al., Blood 78:110–117, 1991).

[0004] Frühere Untersuchungen von Lord und Mitarbeitern zeigten die Existenz eines löslichen Proteinfaktors in normalen Knochenmarksextrakten von Mäusen und Schweinen, der fähig war, den Zyklus von HSC reversibel zu hemmen (Lord et al., Br. J. Haem. 34:441–446, 1976). Diese Hemmaktivität (50–100 kD Molekulargewicht) wurde Stammzellinhibitor (stem cell inhibitor; SCI) genannt.

[0005] Eine Reinigung dieses Faktors aus primären Quellen wurde aufgrund der Schwierigkeiten, die einem in vivo-Assay, der eine große Menge bestrahlter Mäuse erfordert, innewohnen, nicht realisiert. Bei einem Versuch, diese Probleme zu lösen, haben Pragnell und Mitarbeiter einen in vitro-Assay für primitive blutbildende Zellen (CFU-A) entwickelt und sie haben Zelllinien als eine Quelle der Hemmaktivität untersucht (siehe Graham et al., Nature 344: 442–444, 1990).

[0006] Da frühere Untersuchungen Makrophagen als mögliche Quellen für SCI identifiziert haben (Lord et al., Blood Cells 6:581–593, 1980), wurde eine Mäuse-Makrophagen-Zelllinie, J774,2 ausgewählt (Graham et al., Nature 344: 442–444, 1990). Das konditionierte Medium von dieser Zelllinie wurde von Graham et al. für die Reinigung verwendet; ein hemmendes Peptid wurde isoliert, das sich als identisch zu dem vorbeschriebenen Cytokin MIP-1 α (makrophage inflammatory protein 1-alpha) erwies. MIP-1 α wurde also aus einer Zelllinie, nicht aus primärem Material isoliert. Während Graham et al. beobachteten, dass Antikörper zu MIP-1 α die Aktivität eines unbehandelten Knochenmarksextraktes aufhoben, haben andere gezeigt, dass andere hemmende Aktivitäten wichtig sind. Zum Beispiel haben Graham et al. (J. Exp. Med. 178: 925–32, 1993) vorgeschlagen, dass TGF β , nicht MIP-1 α , ein primärer Inhibitor von blutbildenden Stammzellen ist. Weiters haben Eaves et al. (PNAS 90:12015–19, 1993) vorgeschlagen, dass sowohl MIP-1 α als auch TGF β in suboptimalen Gehalten im normalen Knochenmark vorhanden sind und dass eine Inhibition eine Synergie zwischen den beiden Faktoren benötigt.

[0007] Andere Forscher haben zusätzliche Stammzellinhibitorfaktoren beschrieben. Frindel und Mitarbeiter haben ein Tetrapeptid aus fetalem Kalbsknochenmark und aus Leberextrakten isoliert, das Stammzellinhibitoraktivitäten hat (Lenfant et al., PNAS 86:779–782, 1989). Paukovits et al. (Cancer Res. 50:328–332, 1990) ha-

ben ein Pentapeptid charakterisiert, das in seiner monomeren Form ein Inhibitor und in seiner dimeren Form ein Stimulator des Stammzellzyklus ist. Von anderen Faktoren wurde ebenfalls behauptet, dass sie in verschiedenen in vitro-Systemen hemmend sind (siehe Wright und Pragnell in Bailliere's Clinical Haematology v. 5, pp. 723–39, 1992 (Bailliere Tindall, Paris)).

[0008] Tsyrova et al., SU 1561261 A1, offenbart ein Reinigungsverfahren für einen Stammzellproliferationsinhibitor.

[0009] Bisher wurde keiner dieser Faktoren für die klinische Verwendung zugelassen. Es besteht jedoch Bedarf an wirksamen Stammzellinhibitoren. Die mit Chemotherapie oder Bestrahlungsbehandlung hauptsächlich verbundene Toxizität ist die Zerstörung von normalen proliferierenden Zellen, die zu Knochenmarksuppression oder Gastrointestinaltoxizität führen kann. Ein wirksamer Stammzellinhibitor würde diese Zellen schützen und die Optimierung dieser therapeutischen Behandlungen erlauben. So wie ein nachgewiesener Bedarf an einer Vielzahl von stimulierenden Cytokinen (i.e. Cytokine wie 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, Erythropoietin, Thrombopoietin, Stammzellfaktor, flk2/flt3-Ligand etc., welche den Zyklus von blutbildenden Zellen stimulieren), abhängig von der klinischen Situation, vorhanden ist, so ist es auch wahrscheinlich, dass eine Vielzahl von inhibierenden Faktoren benötigt wird, um unterschiedliche klinische Bedürfnisse anzusprechen.

[0010] Hämoglobin ist ein hochkonserviertes tetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 64 000 Dalton. Es besteht aus zwei Alpha- und zwei Betaketten. Jede Kette bindet ein einzelnes Hämmolekül (Ferroprotoporphyrin IX), eine Eisen enthaltende prosthetische Gruppe. Die Alpha- und Betaketten von Wirbeltieren wurden wahrscheinlich von einem einzigen Stammgen erhalten, das sich dupliziert hat und dann divergierte; die beiden Ketten enthalten ein großes Ausmaß an Sequenzidentität sowohl untereinander als auch zwischen verschiedenen Wirbeltieren (siehe **Fig. 16A**). Bei Menschen enthält der Alphaketten-Cluster auf Chromosom 16 zwei Alphagene (α_1 und α_2), die für identische Polypeptide kodieren, sowie Gene, die für andere alpha-ähnliche Ketten kodieren: Zeta, Theta und mehrere nichttranskribierte Pseudogene (siehe **Fig. 16B** in Bezug auf cDNA und; Aminosäure-Sequenzen von menschlicher Alphakette). Der Betaketten-Cluster auf Chromosom 11 besteht aus einem Betakettengen und mehreren beta-ähnlichen Genen: Delta, Epsilon, G Gamman und A Gamma, sowie mindestens zwei nicht-exprimierten Pseudogenen (siehe **Fig. 16C** in Bezug auf cDNA und Aminosäure-Sequenzen von menschlicher Betakette).

[0011] Die Expression dieser Gene variiert während der Entwicklung. Bei der menschlichen Blutbildung, die ausführlich beschrieben wurde, synthetisieren embryonale Erythroblasten sukzessive Tetramere von zwei Zetaketten und zwei Epsilonketten (Gower I), zwei Alphaketten und zwei Epsilonketten (Gower II) oder zwei Zetaketten und zwei Gammaketten (Hb-Portland). Wenn die Embryogenese fortschreitet, besteht die prädominante Form aus fetalem Hämoglobin (Hb-F), das aus zwei Alphaketten und zwei Gammaketten zusammengesetzt ist. Adultes Hämoglobin (zwei Alpha- und zwei Betaketten) beginnt während der fetalen Periode synthetisiert zu werden; bei der Geburt sind etwa 50% des Hämoglobins von der adulten Form und die Umwandlung ist in etwa im Lebensalter von 6 Monaten abgeschlossen. Die überwiegende Mehrheit des Hämoglobins (ungefähr 97%) beim Erwachsenen ist in der Variante zwei Alpha- und zwei Betaketten (Hb-A), wobei geringe Mengen Hb-F oder Deltakette (Hb-A₂) nachweisbar sind.

[0012] Häm wurde ausführlich untersucht in Hinblick auf seinen Einfluss auf die Blutbildung (siehe S. Sassa, Seminars Hemat. 25:312–20, 1988, und N. Abraham et al., Int. J. Cell Cloning 9:185–210, 1991, für den Überblick). Häm ist für die Reifung von Erythroblasten erforderlich; in vitro erhöht Hämin (Chlorerprotoporphyrin IX – d.h. Häm mit einem zusätzlichen Chlorid-Ion) die Proliferation von CFU-GEMM, BFU-E und CFU-E. Ebenso erhöht Hämin die zelluläre Beschaffenheit in Langzeit-Knochenmark-Kulturen.

I. Chemotherapie und Bestrahlungstherapie bei Krebs

[0013] Produktive Forschung über stimulierende Wachstumsfaktoren führte zur klinischen Verwendung einer Reihe dieser Faktoren (Erythropoietin, G-CSF, GM-CSF etc.). Diese Faktoren haben die Mortalität und die Morbidität, die mit chemotherapeutischen und Bestrahlungsbehandlungen verbunden sind, reduziert. Weitere klinische Vorteile für Patienten, die eine Chemotherapie oder Bestrahlung erhalten, konnten durch eine alternative Strategie der Blockierung des Eintritts von Stammzellen in den Zellzyklus realisiert werden, wodurch sie vor den toxischen Nebenwirkungen geschützt wurden.

II. Knochenmarktransplantation

[0014] Knochenmarktransplantation (BMT) ist eine wirksame Behandlung für eine Vielzahl von hämatologischen, autoimmunen und malignen Erkrankungen; derzeitige Therapien schließen hämatopoetische Zellen ein, die aus Nabelschnurblut oder peripherem Blut (entweder nicht mobilisiert oder mobilisiert mit Mitteln wie G-CSF) sowie Knochenmark erhalten werden. Ex vivo-Manipulation von blutbildenden Zellen wird derzeit verwendet, um primitive Stammzellen auf eine für Transplantation geeignete Population zu vermehren. Die Optimierung dieses Verfahrens erfordert:

1. eine ausreichende Anzahl von Stammzellen, die zur Aufrechterhaltung eines langfristigen Wiederaufbaus der Blutbildung befähigt sind,
2. die Erschöpfung von Transplantat-versus-Wirt-induzierenden T-Lymphocyten und
3. die Abwesenheit von restlichen malignen Zellen.

[0015] Dieses Verfahren kann durch Verwendung von Stammzellinhibitor(en) für die ex vivo-Expansion optimiert werden. Die Wirksamkeit der Reinigung von blutbildenden Zellen mit cytotoxischen Arzneimitteln, um die restlichen malignen Zellen zu eliminieren, ist aufgrund der Toxizität dieser Verbindungen für normale blutbildende Zellen und insbesondere Stammzellen begrenzt. Es besteht eine Notwendigkeit eines wirksamen Schutzes von normalen Zellen während der Reinigung; der Schutz kann geleistet werden, indem Stammzellen aus dem Zyklus mit einem wirksamen Inhibitor herausgenommen werden.

III. Gewinnung von peripheren Stammzellen

[0016] Stammzellen aus peripherem Blut (peripheral blood stem cells; PBSC) bieten gegenüber Knochenmark eine Reihe von möglichen Vorteilen für die autologe Transplantation. Patienten ohne geeignete Stellen für die Ernte von Knochenmark aufgrund von Tumorbeteiligung oder vorangegangenen Bestrahlungen können immer noch PBSC-Sammlungen unterzogen werden. Die Verwendung von Blutstammzellen eliminiert die Notwendigkeit einer Allgemeinnarkose und eines chirurgischen Eingriffs bei Patienten, die diesen nicht gut vertragen würden. Die Apheresetechnologie, die notwendig ist, um Blutzellen zu sammeln, ist effizient und an den meisten großen medizinischen Zentren verfügbar. Die Hauptgrenzen der Methode sind sowohl die niedrige Frequenz von Stammzellen im peripheren Blut im „steady state“ und ihr hoher Zyklusstatus nach dem Mobilisationsverfahren mit Arzneimitteln oder Wachstumsfaktoren (z.B. Cyclophosphamid, G-CSF, Stammzellfaktor). Ein wirksamer Stammzellinhibitor wäre nützlich, um solche Zellen in einen Ruhezustand zurückzubringen und dadurch ihren Verlust durch Differenzierung zu verhindern.

IV. Behandlung von hyperproliferativen Störungen

[0017] Eine Anzahl von Erkrankungen ist durch einen hyperproliferativen Zustand gekennzeichnet, in dem dysregulierte Stammzellen eine Überproduktion von Zellen im Endstadium fördern. Diese Erkrankungszustände schließen Psoriasis, wo eine Überproduktion von epidermalen Zellen vorhanden ist, und prä-maligne Zustände im Gastrointestinaltrakt, die durch das Auftreten von Intestinalpolypen gekennzeichnet sind, ein, sind jedoch nicht darauf eingeschränkt. Ein Stammzellinhibitor wäre bei der Behandlung solcher Zustände nützlich.

V. Gentransfer

[0018] Die Möglichkeit, genetische Information in blutbildende Zellen zu transferieren, wird derzeit im klinischen Einsatz genutzt. Blutbildende Zellen sind ein nützliches Ziel für Gentherapie, weil sie leicht zugänglich sind, weil es ausführliche Erfahrung bei der Manipulation und Behandlung dieses Gewebes ex vivo gibt und aufgrund der Fähigkeit der Blutzellen, Gewebe zu durchdringen. Weiters kann die Korrektur bestimmter humaner genetischer Defekte durch das Einbringen eines funktionalen Gens in die primitive Stammzelle des menschlichen hämatopoetischen Systems möglich gemacht werden.

[0019] Es gibt mehrere Grenzen für das Einführen von Genen in menschliche, blutbildende Zellen unter Verwendung entweder von Retrovirusvektoren oder physikalischen Techniken für den Gentransfer:

1. Die geringe Frequenz von Stammzellen in blutbildendem Gewebe hat die Entwicklung von hoch effizienten Gentransfertechniken notwendig gemacht; und
2. rasch einen Zyklus durchlaufende Stammzellen sind nachweislich anfälliger für Vektorinfektion, aber die Erhöhung der Infektionsfrequenz durch Stimulieren der Stammzellproliferation mit Wachstumsfaktoren erzeugt negative Effekte bei der Langzeit-Genexpression, da Zellen, die die Transgene enthalten, gezwungen werden, irreversibel zu differenzieren, und ihre Selbsterneuerung verlieren.

[0020] Diese Probleme können durch die Verwendung eines Stammzellinhibitors zum Verhindern von Differenzierung und dem Verlust der Selbsterneuerung verbessert werden

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, die Inhibitoren der Stammzellproliferation ("INPROL") sind, und ihre Verwendung.

[0022] Die vorliegende Erfindung beinhaltet einen Inhibitor der Stammzellproliferation, gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften:

- a) spezifische Aktivität (IC_{50}) geringer als oder gleich 20 ng- in einem Assay bezüglich Milzkolonien (CFU-S) bei der Maus (siehe Beispiel 4),
- b) Molekulargewicht größer als 10 000 und kleiner als 100 000 Dalton (durch Ultrafiltration),
- c) Aktivität empfindlich gegenüber Abbau durch Trypsin,
- d) mehr hydrophob als MIP-1 α oder TGF β und von beiden unterscheidbar durch Umkehrphasenchromatographie (siehe Beispiel 12),
- e) biologische Aktivität nach Erhitzen für eine Stunde auf 37°C, 55°C oder 75°C in wässriger Lösung beibehalten und
- f) biologische Aktivität nach Fällung mit 1-%iger Salzsäure in Aceton beibehalten.

[0023] Die vorliegende Erfindung ist weiters gekennzeichnet und unterschieden von anderen möglichen Stammzellinhibitoren (z.B. MIP-1 α , TGF β und verschiedene Oligopeptide) durch die Fähigkeit, eine Inhibition bei einem in vitro-Test nach einer kurzen Präinkubationsdauer zu erzielen (siehe Beispiel 5).

[0024] Die vorliegende Erfindung umfasst auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die INPROL enthalten, für die Behandlung einer Vielzahl von Störungen.

[0025] Die vorliegende Erfindung schafft ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts, das erwartet, einem Mittel ausgesetzt zu werden, das fähig ist, Stammzellen zu töten oder zu schädigen, indem dem Subjekt eine wirksame Menge einer Stammzellinhibitor-Zusammensetzung verabreicht wird. Die Stammzellen, die durch dieses Verfahren geschützt werden, können blutbildende Stammzellen sein, die normalerweise im Knochenmark vorhanden sind und sich teilen. Alternativ können die Stammzellen epithelial sein, beispielsweise lokalisiert in den Gedärmen, auf der Kopfhaut oder in anderen Bereichen des Körpers, oder Keimzellen, die in Geschlechtsorganen lokalisiert sind. Das Verfahren dieser Erfindung kann zweckmäßigerweise an Menschen angewendet werden, wenngleich eine Behandlung von Tieren auch mit diesem Verfahren umfasst ist. Der Begriff "Subjekt" oder "Patient", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf ein Tier, wie ein Säugetier, einschließlich des Menschen.

[0026] Gemäß einem anderen Aspekt schafft die Erfindung ein Verfahren zum Schutz und zur Wiederherstellung des hämatopoetischen, Immun- oder anderer Stammzellensysteme eines Patienten, der sich einer Chemotherapie unterzieht, welches Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge INPROL an den Patienten umfasst, wobei INPROL eine Peptidsequenz wie unten definiert hat.

[0027] In einem weiteren Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung einer wirksamen Menge INPROL für die Herstellung eines Arzneimittels für die adjuvante Behandlung irgendeines Krebses, einschließlich jener, die durch solide Tumore charakterisiert sind, zum Schutz der Stammzellen des Knochenmarks, des Gastrointestinaltraktes oder anderer Organe vor den toxischen Wirkungen der Chemotherapie oder der Bestrahlungstherapie.

[0028] Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung beinhaltet die Verwendung einer wirksamen Menge INPROL zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Leukämie, umfassend die Behandlung blutbildender Zellen, die proliferierende Leukämiezellen darin enthalten, zur Hemmung der Proliferation von normalen Stammzellen, und Behandlung des Knochenmarks mit einem cytotoxischen Mittel, um die Leukämiezellen zu zerstören. Dieses Verfahren kann verstärkt werden durch eine Nachbehandlung des Knochenmarks mit anderen Mitteln, die die Proliferation stimulieren; z.B. koloniestimulierende Faktoren. In einer Ausführungsform wird das Verfahren in vivo durchgeführt. Alternativ ist dieses Verfahren auch für ex vivo Reinigung und Expansion von blutbildenden Zellen für Transplantation nützlich.

[0029] In noch einem weiteren Aspekt betrifft das Verfahren die Behandlung eines Subjekts, das eine Störung durch proliferierende Stammzellen hat. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung einer

wirksamen Menge INPROL für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Störungen, wie Psoriasis, Myelodysplasie, einigen Autoimmunerkrankungen, Immundepression im Alterungsprozess, durch teilweise Hemmung der Proliferation der betreffenden Stammzellen.

[0030] Die vorliegende Erfindung schafft ein Verfahren für den reversiblen Schutz von Stammzellen vor Schädigung durch cytotoxische Mittel, die fähig sind, Stammzellen zu töten oder zu schädigen. Die Methode beinhaltet die Verabreichung einer wirksamen Menge INPROL an ein Subjekt, das einem solchen Mittel ausgesetzt werden soll.

[0031] Die vorliegende Erfindung schafft auch:
die Verwendung eines Inhibitors der Stammzellproliferation zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Menschen oder Tieren durch Verbesserung der Immunsuppression, die durch Stammzellen-Hyperproliferation verursacht wird.

[0032] Die vorliegende Erfindung schafft auch:
Ein Verfahren zur Behandlung von Menschen oder Tieren, bei dem der Inhibitor der Stammzellproliferation verabreicht wird, nachdem die Stammzellen durch cytotoxische Arzneimittel oder ein Bestrahlungsverfahren zur Proliferation veranlasst wurden. Stammzellen sind normalerweise im Ruhezustand, werden aber nach der Chemotherapie zum Eintreten in den Zellzyklus stimuliert. Das macht sie empfindlicher gegenüber einer zweiten Verabreichung von Chemotherapie; das vorliegende Verfahren schützt sie vor dieser Behandlung.

[0033] Die vorliegende Erfindung schafft auch:
die Verwendung des Inhibitors der Stammzellproliferation zur Herstellung eines Adjuvans für Menschen oder Tiere, vor oder zusammen mit einer Impfung zum Zwecke der Erhöhung der Immunantwort.

[0034] Die vorliegende Erfindung schafft auch:
die Verwendung einer wirksamen Menge des Inhibitors der Stammzellproliferation zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Menschen oder Tieren, die cytotoxische Arzneimittel oder Bestrahlungsbehandlung erhalten, um die Stammzellen vor Schaden zu schützen.

[0035] Die Erfindung enthält auch Peptide mit den Sequenzen:

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,

wo die beiden Cys-Reste eine Disulfidbindung bilden,

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

wo die beiden Cys-Reste durch eine Kohlenbrücke (carbon bridge) verbunden sind, und

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

[0036] In der Erfindung sind auch DNA-Sequenzen enthalten, die für die obengenannten Peptide kodieren, Vektoren, die diese DNA-Sequenzen enthalten, und Wirtszellen die diese Vektoren enthalten. Diese Peptide können durch Verwendung von chemischen Standardtechniken (z.B. Festphasensynthese) synthetisiert werden oder durch die Verwendung von rekombinanten Techniken (z.B. Fusionssysteme, wie jene, die Glutathion-S-transferase (D.B. Smith and K.S. Johnson, Gene 67:3140, 1988), Thioredoxin (LaVallie et al, Biotechnology 11:187-193, 1993) oder Ubiquitin (Butt et al., PNAS 86:2540-4, 1989; US-Patent 5 391 490) einsetzen).

[0037] Die Erfindung enthält auch ein Verfahren zur Hemmung der Stammzellproliferation, das das Inkontaktbringen blutbildender Zellen mit einem Peptid, das aus der Gruppe der Hemorphin-Peptide mit der Sequenz:

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

ausgewählt ist, umfasst. Die obigen Peptide haben Sequenzähnlichkeit mit anderen opiatähnlichen Peptiden, wie jenen der Tyr-MIF-1-Familie (siehe Reed et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:519–25, 1994, zur Übersicht), aus Casein erhaltenen Casomorphinen (Brantl et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360:1211–16, 1979; Loukas et al., *Biochem.* 22:45674573, 1983; Fiat und Jolles, *Mol. Cell. Biochem.* 87:5–30, 1989), von Cytochrom b abgeleiteten Peptiden, Cytochrome genannt (Brantl et al., *Eur. J. Pharm.* 111:2934, 1985), sowie Peptiden, die von kombinatorischen Datenbanken erhalten wurden, die auf Bindung an Opiatrezeptoren untersucht wurden (siehe Dooley et al., *Peptide Research* 8:124–137, 1995, zur Übersicht).

[0038] Die Erfindung enthält auch ein Verfahren zur Durchführung von ex vivo-Stammzellexpansion, umfassend die Behandlung der blutbildenden Zellen mit INPROL und zumindest einem stimulierenden Cytokin. INPROL wird mit den blutbildenden Zellen vor, während und/oder nach Kontakt mit dem stimulierenden Cytokin in Kontakt gebracht.

[0039] Die Erfindung enthält auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend (a) INPROL und (b) zumindest eine hemmende Verbindung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus MIP-1 α , TGF β , TNF α , INF α , INF β , INF γ , dem Pentapeptid pyroGlu-Glu-Asp-Cys-Lys, dem Tetrapeptid N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro und dem Tripeptid Glutathion (Gly-Cys- γ Glu).

[0040] Die Erfindung enthält auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend (a) INPROL und (b) zumindest eine stimulierende Verbindung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 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, Thrombopoietin, Stammzellfaktor und flk2/flt3-Ligand.

[0041] Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Inhibitor für Stammzellen (INPROL), der sich von jenen des Standes der Technik, wie MIP-1 α , TGF β , dem Tetrapeptid von Frindel und Kollegen oder dem Pentapeptid von Paukovits und Mitarbeitern (cf., Wright & Pragnell, 1992 (op cit)) unterscheidet. Natürlich vorkommendes INPROL hat ein Molekulargewicht, das 10 000 Dalton, nach Ultrafiltration, übersteigt, was es sowohl vom Tetrapeptid als auch vom Pentapeptid unterscheidet. Es ist hydrophober als MIP-1 α oder TGF β in Umkehrphasenchromatographiesystemen, wodurch es sich von diesen Cytokinen unterscheidet. Weiters ist seine Wirkungsweise insofern verschieden von derjenigen jeglicher zuvor beschriebener Inhibitoren, als es in einem in vitro-Assay aktiv ist, wenn es nur während einer Präinkubationsdauer verwendet wird. Zum Beispiel ist MIP-1 α nicht wirksam, wenn es nur während einer Präinkubationsdauer verwendet wird (Beispiel 5). Weiters ist natürlich vorkommendes INPROL in einem Assay aktiv, der "Zellen mit hohem proliferativen Potential" (HPP-PFC) misst, während MIP-1 α dies nicht ist (Beispiel 6).

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0042] Die Fig. 1 bis 4 zeigen einen SDS-Polyacrylamidgel-Lauf des Produktes nach jeder Stufe der Reinigung.

- [0043] Fig. 1** – Bahn 1 ist Chymotrypsinogen, Bahn 2 ist Ovalbumin, Bahn 3 ist BSA, Bahn 4 sind Fraktionen <30 kD, Bahn 5 sind Fraktionen 30–50 kD und Bahn 6 sind Fraktionen 50–100 kD.
- [0044] Fig. 2** – Bahn 1 ist nach Ammoniumsulfatfällung (40–80%), und die Bahnen 2–5 sind DEAE-Fraktionen (Bahn 2 stellt die aktive Fraktion dar).
- [0045] Fig. 3** – Bahn 1 ist der Überstand nach der Ammoniumsulfatfällung, Bahn 2 ist die aktive DEAE-Fraktion, die Bahnen 3–5 stellen Gelfiltrationsfraktionen dar (Bahn 5 stellt die aktive Fraktion dar).
- [0046] Fig. 4** – Bahn 2 stellt das Endprodukt dar.
- [0047] Fig. 5** zeigt ein Umkehrphasen-HPLC-Chromatogramm der Endreinigung.
- [0048] Fig. 6** zeigt das Einbringen von tritiiertem Thymidin (cpm) in Zellen der FDCP-mix-Linie ohne (Kontrolle = 0% Hemmung) und mit verschiedenen Konzentrationen von INPROL, das aus Schweineknorpelmark (pINPROL) gereinigt wurde. Die Daten sind gegen den Kontrollwert normalisiert.
- [0049] Fig. 7** zeigt den Prozentsatz der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus nach der Behandlung von Mäusen mit Testosteronpropionat (TSP), TSP plus pINPROL oder mit einem Träger (Kontrolle). Jede Gruppe enthielt 25 Tiere (3 bis 4 pro Zeitpunkt).
- [0050] Fig. 8** zeigt das Überleben von Mäusen, die mit zwei Dosen 5-FU behandelt wurden, mit oder ohne pINPROL-Behandlung. Jede Gruppe enthielt 30 Tiere.
- [0051] Fig. 9** zeigt das Überleben von bestrahlten Mäusen mit und ohne pINPROL-Behandlung. Jede Gruppe enthielt 50 Tiere.
- [0052] Fig. 10A und 10B** zeigen die Regeneration von normalen Langzeitkultur-Knochenmarkzellen, 1 Woche (10A) und 3 Wochen (10B) nach der Behandlung mit Ara-C oder Ara-C plus pINPROL.
- [0053] Fig. 11** zeigt das Überleben von Mäusen (75 pro Gruppe) nach letaler Bestrahlung und Transplantation von 3×10^4 Knochenmarkzellen nach Präinkubation mit einem Medium (Kontrolle) oder pINPROL (25 ng/ml) für 4 Stunden. Das Überleben wurde für 30 Tage beobachtet.
- [0054] Fig. 12** zeigt die CFU-GM-Anzahl, gebildet nach 14 Tagen in Kultur durch Knochenmarkzellen von Mäusen nach letaler Bestrahlung und Wiederherstellung mit Spenderknochenmarkzellen, die mit pINPROL oder einem Medium 4 Stunden präinkubiert wurden.
- [0055] Fig. 13** zeigt Suspensionszellen von Lymphoid-Langzeitkulturen, die jede Woche entnommen, gewaschen und mit IL-7 (10 ng/ml) nach Präinkubation mit Medium oder pINPROL für 4 Stunden plattiert wurden.
- [0056] Fig. 14** zeigt die verbesserte Repopulationsfähigkeit von leukämischen, peripheren Blutzellen, die mit pINPROL behandelt wurden. Langzeitkulturstartzellen (LTC-IC) wurden gemessen, indem adhärenzte und nicht-adhärenzte LTC-Zellen mit und ohne pINPROL plattiert wurden und CFU-GM am Tag 7 ausgewertet wurde. Die Daten sind gegen die Kontrollwerte normalisiert.
- [0057] Fig. 15A** zeigt ein C4-Umkehrphasenchromatogramm von gereinigtem pINPROL, eluiert bei 53% Acetonitril. Bahn 1 ist das Rohmaterial, Bahn 2 sind Molekulargewichtsmarker und Bahn 3 ist das gereinigte Material. **Fig. 15B** zeigt eine C4-Umkehrphasenchromatogramm von MIP-1 α , eluiert bei 43,9 % Acetonitril. **Fig. 15C** zeigt ein SDS-PAGE-Chromatogramm der rohen pINPROL-Zubereitung und der gereinigten Zubereitung nach Umkehrphase.
- [0058] Fig. 16** zeigt Hämoglobinsequenzen: **Fig. 16A** zeigt die cDNA- und Aminosäuresequenzen von menschlichem Alpha-Hämoglobin und **Fig. 16B** zeigt die cDNA- und Aminosäuresequenzen von menschlichem Beta-Hämoglobin. Die Nummerierung entspricht der Aminosäure. **Fig. 16C** zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich der Alpha- und Betaketten von Hämoglobin des Menschen, der Maus und des Schweins.
- [0059] Fig. 17** zeigt einen Vergleich der C₄-Umkehrphasen-HPLC-Spuren von pINPROL (**Fig. 17A**) und von kristallisiertem Schweinehämoglobin (**Fig. 17B**).

[0060] Fig. 18 zeigt ein SDS-PAGE-Gel von Fraktionen von einer C₄-Umkehrphasen-HPLC-Trennung von kristallisiertem Schweinehämoglobin. Bahn 1 zeigt Molekulargewichtsmarker, Bahn 2 zeigt Fraktionen 48–49, erhalten aus dem ersten Peak (bei 47,11 min), Bahn 3 zeigt Fraktionen 50–51, erhalten vom zweiten Peak (bei 49,153 min), Bahn 4 zeigt Fraktionen 54–55, erhalten vom dritten Peak (bei 52,25 min) und Bahn 5 zeigt Fraktionen 56–57, erhalten vom vierten Peak (bei 53,613 min).

[0061] Fig. 19 zeigt einen Vergleich der zweidimensionalen Gelelektrophorese von pINPROL (Fig. 19A) und eines gereinigten Schweine-Betahämoglobins (Fig. 19B).

[0062] Fig. 20 zeigt einen Vergleich der Wirkungen von gereinigtem Schweine-Alpha-hämoglobin, Betahämoglobin oder pINPROL im FDCP-MIX-Assay.

[0063] Fig. 21 zeigt die Umkehrphasentrennung von Schweinehämoglobin bei Verwendung eines flachen Eluierungsgradienten.

[0064] Damit die hier beschriebene Erfindung vollständiger verstanden wird, wird die folgende detaillierte Beschreibung gegeben. Diese Beschreibung soll, da sie beispielhaft für die vorliegende Erfindung ist, nicht als die Erfindung einschränkend ausgelegt werden und Variationen, die im Aufgabenbereich des Fachmannes liegen, müssen als in den Bereich der Erfindung fallend betrachtet werden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0065] INPROL hemmt reversibel die Teilung von Stammzellen. Insbesondere ist INPROL wirksam bei der vorübergehenden Hemmung der Zellteilung von blutbildenden Stammzellen. Daher kann das Verfahren dieser Erfindung zur Erleichterung der unerwünschten Nebenwirkungen von Chemotherapie auf das blutbildende, myeloide und Immunsystem des Patienten durch Schutz der Stammzellen vor Schaden, der durch chemotherapeutische Mittel oder Bestrahlungen, die verwendet werden, um Krebs oder virusinfizierte Zellen zu zerstören, eingesetzt werden. In einer Ausführungsform der Erfindung wird INPROL dem Patienten in einer Dosis verabreicht, die ausreicht, um die Stammzellteilung zu hemmen, während das chemotherapeutische Mittel auf die kranken Zellen wirkt. Nachdem das chemotherapeutische Mittel seine Funktion erfüllt hat, werden die durch INPROL gehemmten Stammzellen ohne weitere Behandlung zu sich teilenden Zellen zurückkehren. Falls es gewünscht ist, die Regeneration der Blutbildung zu verbessern, können zusätzlich stimulierende Wachstumsfaktoren oder Cytokine verwendet werden.

[0066] Wie hier verwendet, umfasst der Ausdruck "INPROL" Säugetierproteine, die, wie in den Beispielen, gereinigt wurden, Hämoglobin, die Alphakette von Hämoglobin (mit oder ohne die Hämgruppe), die Betakette von Hämoglobin (mit oder ohne die Hämgruppe), Mischungen von Alpha- und Betaketten (mit oder ohne die Hämgruppe) und Fragmente oder Analoge dieser Proteine, einschließlich embryonaler, fetaler oder adulter Formen (z.B. Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- oder Zetaketen, entweder alleine oder als Mischungen, Dimere oder Multimere, mit oder ohne die Hämgruppe), die die Fähigkeit haben, die Stammzellproliferation zu hemmen. Der Ausdruck "INPROL" schließt natürlich vorkommende sowie nicht natürlich vorkommende (z.B. rekombinant hergestellte) Formen dieser Proteine ein.

[0067] In einer typischen klinischen Situation wird INPROL einem Patienten in einer Tageskur durch intravenöse Injektion oder Infusion in Dosiseinheitenform unter Verwendung von z.B. 0,01 bis 100 mg/kg, vorteilhafterweise 0,1 bis 1,0 mg/kg, des INPROL verabreicht, z.B. 4 bis 60 Stunden vor einer Standardchemotherapie oder Bestrahlungsbehandlung.

[0068] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung erlaubt eine Vorbehandlung mit INPROL erhöhte Dosen der chemotherapeutischen Mittel oder der Bestrahlung, die über die Dosen gehen, die normalerweise vom Patienten toleriert werden.

[0069] Eine große Fraktion blutbildender Stammzellen ist normalerweise im Ruhezustand (nicht im Zyklus befindlich). Aber als kompensatorische Antwort auf durch Chemotherapie verursachte Schäden in der Blutbildung tritt ein größerer Anteil von Stammzellen nach der Chemotherapie in den Zyklus, was sie besonders verwundbar für folgende Dosen von cytotoxischen Chemotherapien oder therapeutischen Bestrahlungen macht. Durch Hemmen des Zyklus solcher Stammzellen erlaubt die INPROL-Behandlung eine frühere und häufigere Verabreichung von folgenden Dosen von cytostatischen Chemotherapien, entweder bei normalen oder erhöhten Dosen.

[0070] In einer Ausführungsform der Erfindung wird INPROL (0,1 mg bis 6 g vorteilhafterweise 1,0 bis 60 mg) etwa 24 Stunden bis 10 Tage nach der ersten Chemotherapiedosis verabreicht. Nach weiteren 4 bis 60 Stunden, vorteilhafterweise 24 bis 48 Stunden, wird eine weitere Chemotherapiedosis verabreicht. Dieser Zyklus des Abwechselns von Chemotherapie und INPROL wird entsprechend dem therapeutischen Erfolg fortgesetzt. Chemotherapiemittel und Protokolle für die Verabreichung werden je nach Eignung für bestimmte Tumortypen in der normalen klinischen Praxis ausgewählt. Optional werden stimulierende Wachstumsfaktoren, wie G-CSF, Stammzellfaktor, nach Chemotherapie oder Bestrahlungsbehandlung verwendet, um die Wiederherstellung der Blutbildung zu verbessern.

[0071] Für ex vivo-Applikationen werden 0,1 ng bis 100 ng/10⁶ Zellen/ml, vorteilhafterweise 20 bis 50 ng/10⁶ Zellen/ml, INPROL verwendet.

[0072] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird INPROL in einem Verfahren zur Herstellung autologer blutbildender Zellen für Transplantation eingesetzt. Die blutbildenden Zellen werden ex vivo mit einer wirksamen Menge INPROL zur Hemmung der Stammzellteilung behandelt und dann von Krebszellen gereinigt, indem den Knochenmarkkulturen eine wirksame Menge chemotherapeutischer Mittel oder Bestrahlung verabreicht wird. Chemotherapeutische Mittel mit Spezifität für im Zyklus befindliche Zellen sind bevorzugt. Das so behandelte Mark wird dem autologen Spender reinjiziert. Optional wird der Patient mit einem Mittel behandelt, von dem bekannt ist, dass es die Blutbildung stimuliert, um die Wiederherstellung der Blutbildung des Patienten zu verbessern.

[0073] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird INPROL als begleitende Therapie bei der Behandlung von Leukämie eingesetzt. Beispielsweise werden in Krankheitsstadien, in denen die leukämischen Zellen nicht auf INPROL ansprechen, die leukämischen blutbildenden Zellen ex vivo mit INPROL behandelt. Die Proliferation von normalen Stammzellen wird durch Verabreichung von INPROL verhindert. Während der Zeit, in der die proliferierenden leukämischen Zellen mit einem Zellzyklusspezifischen cytotoxischen Mittel behandelt werden, wird eine Population von normalen Stammzellen vor Schaden bewahrt. Zusätzlich wird ein stimulierendes Cytokin, wie IL-3 oder GM-CSF, optional verabreicht, um das Durchlaufen des Zyklus unter den leukämischen Zellen während der Arzneimittel- oder Strahlungsbehandlung zu veranlassen, während die normalen Stammzellen mit INPROL geschützt werden. Der Patient wird mit chemotherapeutischen Mitteln oder Bestrahlung zur Zerstörung der leukämischen Zellen behandelt, und das gereinigte Mark wird dann dem Patienten retransplantiert, um die Wiederherstellung der Blutbildung aufzubauen.

[0074] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung zur Behandlung von Patienten mit ernststen Virusinfekten, die Blutzellen und Lymphozyten betreffen, wie HIV-Infektion, werden die blutbildenden Zellen ähnlich ex vivo mit INPROL behandelt, gefolgt von antiviralen Mitteln, Arzneimitteln, welche die infizierten Zellen zerstören, oder Systemen auf Antikörper-Basis für die Entfernung von infizierten Zellen. Nach der myeloablativen antiviralen oder myeloablativen Chemotherapie, um die viralen Wirtszellen aus dem Patienten zu eliminieren, werden die mit INPROL behandelten Markzellen dem Patienten zurückgegeben.

[0075] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird INPROL eingesetzt, um mit hyperproliferativen Stammzellen verbundene Störungen zu behandeln. Beispielsweise ist Psoriasis eine Störung, die durch hyperproliferierende epitheliale Zellen der Haut verursacht wird und die manchmal mit cytotoxischen Arzneimitteln behandelt wird. Andere präneoplastische Läsionen, an denen Stammzellproliferation beteiligt ist, sind ebenfalls für wirksame Mengen INPROL zugänglich, die eingesetzt werden, um die Proliferation der Stammzellen vollständig oder teilweise zu hemmen. Für diese Anwendungen werden INPROL enthaltende Zusammensetzungen für die topische oder transdermale Verabreichung (z.B. Salben, Lotionen, Gele oder Pflaster) wo es adäquat ist, als eine Alternative zur parenteralen Verabreichung eingesetzt. In den meisten Fällen von Leukämie sind die Leukämievorläufer differenzierte Zellpopulationen, die durch INPROL nicht beeinflusst werden und die daher durch Verfahren unter Verwendung von INPROL, wie jene die oben beschrieben wurden, behandelt werden. In Fällen, in denen die Leukämievorläufer sehr primitiv und direkt empfindlich für die Hemmung durch INPROL sind, wird die Proliferation von Leukämiezellen durch die Verabreichung wirksamer Mengen INPROL geschwächt.

[0076] Antikörper, monoklonal oder polyklonal, werden durch Standardtechniken zu den INPROL-Polypeptiden entwickelt. Diese Antikörper oder INPROL-Polypeptide werden mit detektierbaren Markern markiert, von denen viele Arten im Stand der Technik bekannt sind. Markiertes INPROL oder markierte Anti-INPROL-Antikörper werden dann als Stammzellenmarker eingesetzt, um Stammzellen zu identifizieren und zu isolieren, indem sie einem Patienten direkt für diagnostische Zwecke verabreicht werden. Alternativ werden diese markierten Polypeptide oder Antikörper ex vivo eingesetzt, um Stammzellen in einer Zubereitung hämatopoetischer

Zellen zu identifizieren, um ihre Entfernung vor der Reinigung neoplastischer Zellen im Mark zu ermöglichen. In ähnlicher Art werden solche markierten Polypeptide oder Antikörper eingesetzt, um epitheliale oder andere Stammzellen zu isolieren und zu identifizieren. Zusätzlich werden solche Antikörper, markiert oder unmarkiert, therapeutisch durch Neutralisation von INPROL-Aktivität oder diagnostisch durch Detektion von zirkulierenden INPROL-Mengen eingesetzt.

[0077] INPROL kann von menschlichen Genen oder cDNA-Bibliotheken für die Expression von rekombinantem menschlichen INPROL unter Verwendung von Standardtechniken geklont werden. Beispielsweise werden unter Verwendung der Sequenzinformation, die aus gereinigtem Protein gewonnen wurde, Oligonukleotidsonden hergestellt, die z.B. mit 32-Phosphor markiert und verwendet werden können, um eine entsprechende cDNA-Bibliothek (z.B. von Knochenmark) zu screenen. Alternativ wird eine Expressionsbibliothek von einer geeigneten Quelle (z.B. Knochenmark) nach cDNAs durchsucht, die für INPROL kodieren, wobei Antikörper oder ein entsprechender Funktions-Assay (z.B. jener, der in Beispiel 2 beschrieben ist) verwendet werden. Hämoglobin selbst sowie die einzelnen Alpha- und Betaketten wurden geklont und exprimiert unter Verwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik (siehe Pagnier et al., *Rev. Fr. Transfus. Hemobiol.* 35:407–15, 1992; Looker et al., *Nature* 356:258–60, 1992; *Methods in Enzymology* vol. 231, 1994).

[0078] Die vorliegende Erfindung beinhaltet DNA-Sequenzen, die enthalten: die Integration von Codons, die für die Expression bei ausgewählten Wirten, die nicht Säugetiere sind, „bevorzugt“ sind; das Vorsehen von Stellen für die Spaltung durch Restriktionsendonuklease-Enzyme; und das Vorsehen zusätzlicher Anfangs-, End- oder Zwischen-DNA-Sequenzen, die die Konstruktion von unmittelbar exprimierten Vektoren oder die Herstellung oder Reinigung der Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und/oder Zetakette von Hämoglobin erleichtern.

[0079] Die vorliegende Erfindung schafft auch DNA-Sequenzen, die für Polypeptid-Analoga oder Derivate von Hämoglobin Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und/oder Zetaketten kodieren, die sich von den natürlich vorkommenden Formen in Bezug auf die Identität oder Lokalisation eines oder mehrerer Aminosäurereste unterscheiden (d.h. Deletionsanaloga, die weniger als alle spezifizierten Reste enthalten; Substitutionsanaloga, bei denen einer oder mehrere der spezifizierten Reste durch andere Reste ersetzt sind; und Additionsanaloga, bei denen ein oder mehrere Aminosäurereste an einen End- oder Mittelabschnitt des Polypeptids hinzugefügt wird) und die einige oder alle Eigenschaften der natürlich vorkommenden Formen teilen.

[0080] In einer vorteilhaften Ausführungsform ist INPROL das Produkt von Expression durch einen prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt (z.B. durch Bakterien-, Hefe-, höhere Pflanzen-, Insekten- und Säugetierzellen in Kultur) von exogenen DNA-Sequenzen, die durch genomisches oder cDNA-Klonen oder durch Gensynthese erhalten werden. D.h., in einer bevorzugten Ausführungsform ist INPROL ein "rekombinantes INPROL". Das Produkt der Expression in typischen Hefe- (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) oder prokaryotischen (z.B. *E. coli*) Wirtszellen ist frei von jeglicher Assoziation mit irgendwelchen Säugetierproteinen. Diese Produkt der Expression in Zellen von Wirbeltieren (z.B. nichtmenschliche Säugetierzellen (z.B. COS oder CHO) und aviäre Zellen) sind frei von Assoziation mit irgendwelchen menschlichen Proteinen. Abhängig vom eingesetzten Wirt können die Polypeptide der Erfindung glycosyliert oder nicht glycosyliert sein. Polypeptide der Erfindung enthalten optional auch einen initialen Methionin-Aminosäurerest (bei Position -1).

[0081] Die vorliegende Erfindung umfasst auch andere Produkte wie Polypeptid-Analoga der Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und/oder Zetakette von Hämoglobin. Solche Analoga enthalten Fragmente der Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und/oder Zetaketten von Hämoglobin. Gut bekannten Verfahren folgend, kann man unmittelbar Gene entwerfen und herstellen, die für mikrobielle Expression von Polypeptiden mit Primärsequenzen kodieren, welche von den hier dargestellten in Bezug auf die Identität oder Lokalisation eines oder mehrerer Reste differieren (z.B. Substitutionen, terminale und intermediäre Additionen und Deletionen). Alternativ können Modifikationen von cDNA und genomischen Genen unmittelbar durch gut bekannte ortsgerichtete Mutagenese-Techniken realisiert und eingesetzt werden, um Analoga und Derivate der Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- oder Zetakette von Hämoglobin herzustellen. Solche Produkte haben zumindest eine der biologischen Eigenschaften von INPROL gemeinsam, können aber in anderen differieren. Als Beispiele umfassen die Produkte der Erfindung die Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- oder Zetaketten, die z.B. durch Deletionen verkürzt sind; oder jene, die gegen Hydrolyse stabiler sind (und daher ausgeprägtere oder länger anhaltende Wirkungen als natürlich vorkommende haben können); oder welche, die geändert wurden, um eine oder mehrere mögliche Stellen für O-Glycosylierung und/oder N-Glycosylierung zu deletieren oder hinzuzufügen, oder die einen oder mehrere Cysteinreste deletiert oder ersetzt durch z.B. Alanin- oder Serinreste haben und leichter in aktiver Form vom mikrobiellen System isoliert werden können; oder welche einen oder mehrere Tyrosinreste durch Phenylalanin ersetzt haben und mehr oder weniger unmittelbar an Targetpro-

teine oder an Rezeptoren auf Targetzellen binden. Ebenfalls umfasst sind Polypeptidfragmente, die nur einen Teil der kontinuierlichen Aminosäuresequenz oder Sekundärkonformationen in Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- oder Zetaketten duplizieren, welche Fragmente eine Eigenschaft von INPROL (z.B. Rezeptorbindung) enthalten können und andere (z.B. Stammzellen-Hemmaktivität) nicht. Es muss erwähnt werden, dass Aktivität für keines der Produkte der Erfindung notwendig ist, um therapeutische Nützlichkeit (siehe Weiland et al., Blut 44:173-5, 1982) oder Nützlichkeit in anderen Zusammenhängen, wie in Assays bezüglich Hemmfaktor-Antagonismus zu haben. Kompetitive Antagonisten sind nützlich in Fällen der Überproduktion von Stammzellinhibitoren oder des Rezeptors.

[0082] Zusätzlich können Peptide, die von der Proteinsequenz abgeleitet sind, die biologische Aktivität behalten, unter Verwendung von Standardmethoden chemisch synthetisiert werden. Die vorliegende Erfindung schafft auch Sequenzen, die für Peptid-Analoga oder Derivate von Hämoglobin Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- und/oder Zetaketten kodieren, die von natürlich vorkommenden Formen in Bezug auf die Identität oder Lokalisation eines oder mehrerer Aminosäurereste differieren (z.B. Deletions-Analoga, die weniger als alle der spezifizierten Reste enthalten; Substitutions-Analoga, bei denen einer oder mehrere spezifizierte Reste durch andere Reste ersetzt sind, entweder natürlich vorkommend oder andere beim Stand der Technik bekannte Analoga, wie D-Aminosäuren; und Additions-Analoga, bei denen ein oder mehrere Aminosäurereste chemisch modifiziert sind, um die Stabilität, Löslichkeit und/oder Proteolyseresistenz erhöhen) und die einige oder alle der Eigenschaften von natürlich vorkommenden Formen teilen.

[0083] Peptidsequenzen, wie oben beschrieben, können durch eine Reihe von Mitteln identifiziert werden. Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von nativen Hämoglobinketten, die in dem Assay aktiv sind (z.B. Alphaketten), mit strukturell damit verwandten Proteinen, die inaktiv (z.B. Myoglobin) sind, kann Regionen identifizieren, die andere Konformationen im dreidimensionalen Raum haben und die daher Kandidatenregionen für aktive Peptide sind. Ein anderer Zugang verwendet selektive Proteolyse, bei der proteolytische Enzyme im begrenzten Verdauen von Hämoglobinketten verwendet werden, was zu Peptiden führt, die z.B. durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und dann bezüglich Stammzellinhibition getestet werden können. Peptide können auch durch chemische Synthese (z.B. Festphasensynthese) erzeugt werden; eine Reihe von überlappenden Peptiden (z.B. 15-mere), die die Sequenz der Hämoglobinkette, die von Interesse ist (z.B. Alphakette) einschließen, kann leicht erzeugt und in Stammzellen-Assays getestet werden. Kombinatorische Datenbanken können erzeugt werden, in denen zahlreiche chemische Synthesen geführt werden und wo ausgewählte Aminosäurepositionen variabel gemacht werden, so dass eine große Anzahl von Peptid-Analogen zum Screenen entsteht (z.B. Dooley et al., Peptide Research 8:124-137, 1995). Alternativ können rekombinante Verfahren eingesetzt werden. Ortsgerichtete Mutagenese kann verwendet werden, um kritische Reste zu identifizieren, die für die Aktivität einer bestimmten Hämoglobinkette notwendig sind. Regionen einer Kette, von der man weiß, dass sie als Stammzellinhibitor aktiv ist (z.B. Alphakette), können durch Regionen eines ähnlichen, aber inaktiven Proteins (z.B. Myoglobin) ersetzt und in Stammzellen-Assays getestet werden, wodurch die Identifizierung von Regionen, die für Aktivität notwendig sind, möglich wird. Solche identifizierten Regionen können als Peptide exprimiert und auf Aktivität in Stammzellzyklus-Assays getestet werden.

[0084] Homologe oder analoge Versionen von INPROL von anderen Spezies werden bei verschiedenen veterinären Verwendungen eingesetzt, ähnlich den therapeutischen Ausführungsbeispielen der Erfindung, die oben beschrieben wurden.

[0085] INPROL wirkt auf im Zyklus befindliche Stammzellen, indem es sie reversibel in einen nicht teilenden "Ruhe"-Zustand bringt. Wenn es erwünscht ist, die im Ruhezustand befindlichen Stammzellen zur Teilung zu stimulieren, z.B. nach der Behandlung eines Patienten mit Krebs-Chemotherapiemitteln oder Bestrahlung, werden dem Subjekt koloniestimulierende Faktoren oder andere blutbildende Stimulanzen verabreicht. Beispiele für solche Faktoren beinhalten, sind jedoch nicht beschränkt auf: M-CSF (CSF-1), GM-CSF, G-CSF, Megakaryocyten-CSF, Thrombopoietin, Stammzellsfaktor oder andere Cytokine, wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 oder Erythropoietin.

[0086] INPROL-Polypeptide oder aktive Fragmente, die Stammzellenhemmaktivität haben, werden gereinigt oder synthetisiert durch konventionelle chemische Verfahren, kombiniert mit geeigneten Bioassays hinsichtlich Stammzellenhemmaktivität, wie in den unten beschriebenen Protokollen beispielhaft angegeben ist.

[0087] In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine therapeutisch wirksame Menge von INPROL-Protein oder ein therapeutisch wirksames Fragment davon in Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger eingesetzt. Diese INPROL-Zusammensetzung wird im Allgemeinen durch parenterale Injektion oder Infusion verabreicht. Subkutane, intravenöse oder intramuskuläre Injektionswege werden entsprechend der erziel-

ten therapeutischen Wirkung ausgewählt.

[0088] Die therapeutische Zusammensetzung für die Verwendung in dieser Erfindung ist, wenn sie systemisch verabreicht wird, in Form einer pyrogenfreien, parenteral akzeptablen wässrigen Lösung. Eine pharmazeutisch annehmbare, sterile Proteinlösung, unter Berücksichtigung des pH-Wertes, der Isotonie, Stabilität, Trägerproteine und dgl., ist Stand der Technik.

[0089] Ebenfalls umfasst von der Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die therapeutisch wirksame Mengen von Polypeptidprodukten der Erfindung zusammen mit geeigneten Verdünnungsmitteln, Konservierungsmitteln, Lösungsvermittlern, Emulgatoren, Adjuvantien und/oder Trägern enthalten, die in der INPROL-Therapie nützlich sind. Der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf jene Menge, die einen therapeutischen Effekt für einen gegebenen Zustand und ein Verabreichungsschema ergibt. Solche Zusammensetzungen sind Flüssigkeiten, Gele, Salben oder lyophilisierte oder auf andere Weise getrocknete Formulierungen und enthalten Verdünnungsmittel mit unterschiedlichem Puffergehalt (z.B. Tris-HCl, Acetat, Phosphat), pH-Wert und Ionenstärke, Additive, wie Albumin oder Gelatine zur Vermeidung der Adsorption an Oberflächen, Detergentien (z.B. Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, Gallensäuresalze), Lösungsvermittler (z.B. Glycerol, Polyethylenglykol), Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure, Natriummetabisulfit), Konservierungsmittel (z.B. Thimerosal, Benzylalkohol, Parabene), Füllstoffe oder Tonizitätsmodifizierer (z.B. Lactose, Mannit), kovalente Anbindung von Polymeren, wie Polyethylenglykol an das Protein, Komplexierung mit Metallionen oder Einbringen des Materials in oder auf teilchenförmige Zubereitungen von polymeren Verbindungen, wie Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Hydrogele usw., oder in Liposomen, Niosomen, Mikroemulsionen, Micellen, unilamellare oder multilamellare Vesikel, biologisch abbaubare, injizierbare Mikrokapseln oder Mikrokugeln oder Proteinmatrizen Erythrozyten-, "Ghosts", Sphäroplasten, Hautpflaster oder andere bekannte Verfahren zur Abgabe oder Verpackung von Pharmazeutika. Solche Zusammensetzungen beeinflussen den physikalischen Zustand, die Löslichkeit, die Stabilität, die in vivo-Abgaberate und in vivo-Clearance-Rate von INPROL. Zusammensetzungen mit gesteuerter oder verzögerter Abgabe schließen Formulierungen in lipophilen Depots (z.B. Fettsäuren, Wachse, Öle) ein. Ebenfalls von der Erfindung umfasst sind teilchenförmige Zusammensetzungen, die mit Polymeren (z.B. Poloxomere oder Poloxamine) beschichtet sind und INPROL, das an Antikörper gekoppelt ist, die gegen gewebsspezifische Rezeptoren, Liganden oder Antigene gerichtet sind, oder das an Liganden gewebsspezifischer Rezeptoren gekoppelt ist. Andere Ausführungsvarianten der Zusammensetzungen der Erfindung beinhalten teilchenförmige Formen von Schutzüberzügen, Proteasehemmfaktoren, Permeationsverbesserer für verschiedene Abgabewege einschließlich parenterale, pulmonale, nasale, topische (Haut oder Schleimhaut) und orale Wege. In einer anderen Ausführungsform wird die INPROL enthaltende Zusammensetzung topisch oder durch ein transdermales Pflaster verabreicht.

[0090] In einem Ausführungsbeispiel sind die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in sterilen Phiole oder Ampullen in Dosiseinheitenform abgepackt.

[0091] Die Erfindung umfasst auch Zusammensetzungen, die einen oder mehrere zusätzliche Faktoren, wie chemotherapeutische Mittel (z.B. 5-Fluorouracil (5FU), Cytosinarabinsid, Cyclophosphamid, Cisplatin, Carboplatin, Doxyrubicin, Etoposid, Taxol, Alkylierungsmittel), antivirale Mittel (z.B. AZT, Acyclovir), TNF, Cytokine (z.B. Interleukine), antiproliferative Arzneimittel, Antimetabolite und Arzneimittel, die in den DNA-Metabolismus eingreifen.

[0092] Das Dosierungsschema im Zusammenhang mit einem Verfahren zur Behandlung des Subjekts, das solchen cytotoxischen Mitteln ausgesetzt werden soll, oder zur Behandlung von hyperproliferierenden Stammzellen wird durch den zuständigen Arzt bestimmt, wobei verschiedene Faktoren, die die Wirkung von Arzneimitteln ändern, berücksichtigt werden; z.B. der Zustand, Körpergewicht, Geschlecht und Ernährung des Patienten, die Schwere einer Infektion, Verabreichungszeitraum und andere klinische Faktoren.

[0093] Nachdem das Subjekt den cytotoxischen Mitteln oder Bestrahlung ausgesetzt wurde, setzt das therapeutische Verfahren der vorliegenden Erfindung optional die Verabreichung eines oder mehrerer Lymphokine, koloniestimulierender Faktoren oder anderer Cytokine, Hämatopoietine, Interleukine oder Wachstumsfaktoren an das Subjekt ein, um allgemein das Wachstum und die Teilung der Stammzellen (und ihrer Nachkommen) zu stimulieren, die durch die vorangegangene Behandlung mit INPROL gehemmt wurden. Solche therapeutische Mittel, die die Blutbildung fördern, schließen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Meg-CSF, M-CSF (CSF-1), GM-CSF, G-CSF oder Erythropoietin ein. Die Dosierungen dieser Mittel werden gemäß dem Wissen, das bei ihrer Verwendung in klinischen Versuchen hinsichtlich der Wirksamkeit bei der Förderung der Wiederherstellung der Blutbildung nach Chemotherapie oder hämatopoetischer Stammzellen-Transplantation erhalten wurde, ausgewählt. Diese Dosierungen werden angepasst, um die Variationen im körperlichen Zustand

des Patienten und die Menge und die Art des chemotherapeutischen Mittels oder der Bestrahlung, denen das Subjekt ausgesetzt war, zu kompensieren. Der Fortschritt bei der Aufhebung der Hemmung der Stammzellen, die durch die Abgabe von INPROL in behandelten Patienten verursacht wurde, wird durch konventionelle Verfahren überwacht.

[0094] Bei der Behandlung von Leukämie ist es vorteilhaft, INPROL zum Hemmen des normalen Stammzellzyklus und einen Stimulator des Leukämiezellwachstums, wie IL-3 oder GM-CSF, gleichzeitig mit der Behandlung mit cytotoxischen Arzneimitteln oder während der Bestrahlung zu verabreichen. Durch diese Prozedur ist es möglich, die größten Unterschiede zwischen den Zykluszuständen und Arzneimittlempfindlichkeiten von normalen und leukämischen Zellen zu erzielen.

Beispiel 1 – In vivo-Stammzellproliferations-Hemmversuch

[0095] Für den Nachweis von Stammzellproliferation wurde die Anzahl der CFU-S in der S-Phase des Zellzyklus durch die ^3H -Thymidin-"Suicide"-Methode (Becker et al., Blood 26:296–308, 1965) gemessen.

[0096] Unreife blutbildende Vorläufer – koloniebildende Einheiten in der Milz (CFU-S) – können in vivo durch Bildung makroskopischer Kolonien in den Milzen von letal bestrahlten Mäusen 8 bis 12 Tage nach der intravenösen Injektion von blutbildenden Zellen festgestellt werden (Till & McCulloch, 1961).

[0097] Für den Standard-CFU-S-Proliferations-Assay wird üblicherweise die ^3H -Thymidin-"Suicid"-Methode angewandt (Becker et al., 1965). Die Methode basiert auf dem Einbringen von radiomarkiertem Thymidin (^3H -Thymidin), eine Vorstufe von DNA, in Zellen während der DNA-Synthese. Die CFU-S, die zum Zeitpunkt des Assays in der S-Phase des Zyklus sind, werden durch die hohe Radioaktivität getötet und können daher keine Kolonien in der Milz bilden. Die Differenz zwischen der Anzahl der CFU-S, gebildet durch die Injektion der Zellprobe, die ohne ^3H -Thymidin inkubiert wurde, und den gleichen Zellen, die mit ^3H -Thymidin inkubiert wurden, zeigt den Prozentsatz der proliferierten CFU-S in der ursprünglichen Probe.

[0098] Der Inhibitor test kann nicht mit der Knochenmark-Stammzellpopulation von nicht stimulierten Tieren durchgeführt werden, da der Inhibitor nur auf die im Zyklus befindliche CFU-S wirkt, die so gering wie 7 bis 10% der gesamten CFU-S-Population im Knochenmark von normalen Mäusen ist.

[0099] Um die CFU-S-Proliferation zu stimulieren, wurden Phenylhydrazin (PHZ) oder subletale Bestrahlung verwendet (Lord 1976).

[0100] Wir haben das Verfahren der Verwendung von Testosteronpropionat (TSP), basierend auf seinem stimulierenden Effekt auf den CFU-S-Zyklus (Byron et al., Nature 228:1204, 1970), entwickelt, was das Testen vereinfachte und keine Nebenwirkungen verursachte. Die TSP-induzierte Stimulation von CFU-S-Proliferation innerhalb von 20 bis 24 Stunden nach Injektion und die Wirkung konnten zumindest 7 Tage gesehen werden.

[0101] Die Prozedur, die für das Screening der Fraktionen während der Reinigung des Inhibitors verwendet wurde, war wie folgt: Mäuse: BDF₁ oder CBF₁-Mausstämme wurden für alle Tests verwendet. Spendermäuse wurde mit einer 10 mg/100 g Dosis von TSP durch intraperitoneale Injektion von 0,2 ml/Maus behandelt, um 30–35% der CFU-S in die S-Phase zu bringen.

[0102] 24 Stunden später wurde Knochenmark aus den Oberschenkelknochen für die Herstellung der Zellsuspension entnommen. 5 bis 10 Millionen Zellen pro ml wurden dann mit verschiedenen Kontroll- und Testfraktionen für 3,5 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert, mit zwei Röhrchen für jede Gruppe (eine für heiß (radioaktiv) und die andere für kalt (nicht radioaktiv)).

[0103] Nach 3,5 Stunden wird ^3H -Thymidin (1 mCi/ml, spezifische Aktivität 18–25 Ci/mmol) zu jedem heißen Röhrchen in einem Volumen von 200 µl pro 1 ml Zellsuspension zugegeben; den kalten Röhrchen wurde nichts hinzugefügt. Die Inkubation wird für 30 Minuten bei 37°C fortgesetzt.

[0104] Nach der 30-minütigen Inkubation ist die Abtötungsreaktion durch Hinzufügen von 10 ml kalten (4°C) Medium, enthaltend 400 µg/ml nicht radioaktives Thymidin, abgeschlossen. Die Zellen werden ausführlich (3 Mal) gewaschen.

[0105] Die Zellen werden auf eine gewünschte Konzentration für die Injektionen resuspendiert und verdünnt, normalerweise 2 - 4 × 10⁴ Zellen pro Maus in 0,3–0,5 ml. Empfängermause, 8 bis 10 pro Gruppe, werden nicht

später als 6 Stunden vor den Injektionen bestrahlt.

[0106] Die Empfängerhilzen werden am Tag 9–12 entnommen und in Tellesnitsky-Lösung fixiert; die Kolonien werden mit dem Auge gezählt. Der Prozentsatz an Zellen in der S-Phase wurde unter Verwendung der Formel

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

errechnet,

worin a – CFU-S-Anzahl ohne ^3H -Thymidin

worin b – CFU-S-Anzahl mit ^3H -Thymidin ist.

[0107] Die Testdaten von INPROL, die in Tabelle 1 dargestellt sind, zeigen, dass im Zyklus befindliche Stammzellen nach der Behandlung mit INPROL gegen die Wirkung von

[0108] ^3H -Thymidin resistent werden. Für dieses und alle folgenden Beispiele bezieht sich der Ausdruck "pINPROL" auf das gereinigte Protein von Schweineknorpelmark. Derselbe Schutz wurde für die S-Phase-spezifischen cytotoxischen Arzneimittel Cytosinarabinsid und Hydroxyharnstoff (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Wenn die behandelten Stammzellen dann mit dem kalten Medium gewaschen werden, das nicht radioaktives Thymidin enthält, proliferieren die überlebenden Stammzellen in Mausmilzen, um normal Kolonien zu bilden.

TABELLE 1

Hemmende Aktivität von pINPROL auf CFU-S-Proliferation während 4-stündiger Inkubation mit Knochenmarkzellen			
Gruppe	- ^3H -TdR	+ ^3H -TdR	Prozent CFU-S getötet durch ^3H -TdR
keine Inkubation	22,2 ± 2,0*	13,7 ± 2,4*	38,3 ± 1,7
4 Stunden mit Medium	18,7 ± 3,0*	11,4 ± 1,3*	43,1 ± 1,4
4 Stunden mit pINPROL	21,2 ± 2,3*	20,7 ± 2,6*	2,1 ± 0,08

* CFU-S pro 2×10^4 Zellen

Beispiel 2: In vitro-Stammzellproliferations-Hemmversuch

[0109] Unter Verwendung des folgenden Testsystems (Lord et al., in: The Inhibitors of Hematopoiesis pp. 227–239, 1987) wurde die direkte Wirkung von INPROL gezeigt. Die Multilineage-Faktor (IL-3)-abhängige Stammzelllinie, FDCP-mix A4 (A4), wurde in IMDM-Medium gehalten, das mit 20% Pferdeserum und 10% WEHI-3-konditioniertem Medium als Quelle von koloniestimulierendem IL-3 ergänzt war.

[0110] Ein Assay zum Einbringen von tritiiertem Thymidin wurde verwendet, um die Proliferation zu messen: A4-Zellen (5×10^4 in 100 µl Medium mit 20% Pferdeserum und 50% WEHI-3 CM) wurden bei 37°C in 5% CO₂ für 16 Stunden inkubiert.

[0111] pINPROL oder das rohe BME (Fraktion IV) wurden am Beginn zugesetzt. Tritiiertes Thymidin (^3H -Tdr) 3,7 KBq in 50 µl bei 740 GBq/mmol) wurde dann jeder Gruppe für weitere 3 Stunden Inkubation zugesetzt. Das Proliferationsniveau wurde durch Entnahme von Zellen gemessen und die % Hemmung unter Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = \frac{\text{cpm ohne INPROL} - \text{cpm mit INPROL}}{\text{cpm ohne INPROL}} \times (100 \%)$$

[0112] Das Einbringen von tritiiertem Thymidin (^3H -Tdr) durch FDCP-mix-A4 Zellen, die in Anwesenheit von abgestuften Dosen von normalem Knochenmarkextrakt oder pINPROL gewachsen sind, ist in **Fig. 6** dargestellt. Man kann sehen, dass die gereinigte Zusammensetzung von pINPROL zumindest 1000 mal aktiver ist

als das Ausgangsmaterial. Die Expositionszeit (16 Stunden) ist ein wichtiger Faktor für die wirksame Hemmung und zeigt den Nachweis des direkten Effektes von pINPROL auf Stammzellen der A4-Zelllinie.

Beispiel 3: Hemmung der CFU-S-Proliferation durch in vivo injiziertes INPROL: Dosen und Wirkungsdauer

[0113] Die Untersuchungen der Wirkung von in vivo injiziertem INPROL offenbarte, dass INPROL wirksam die Rekrutierung von CFU-S in den Zyklus blockieren kann und so diese Zellen vor der cytotoxischen Wirkung weiterer Behandlung schützt, wobei es sein Potential für klinische Verwendung zeigt.

[0114] Das Versuchsprotokoll hatte zwei Ziele: die Wirkung von INPROL auf CFU-S zu überprüfen, wenn es in vivo injiziert wird, und die Wirkungsdauer von INPROL-Aktivität in Bezug auf im Zyklus befindliche Stammzellen zu bestimmen.

[0115] Um die CFU-S-Proliferation zu stimulieren, wurde die Injektion von Testosteronpropionat, basierend auf der Wirkung, die oben in Beispiel 1 beschrieben wurde, verwendet.

[0116] BDF1-Mäusen wurde TSP (10 mg/100 g) am Tag 0 injiziert; 24 Stunden später erhielten Mäuse jeder Versuchsgruppe (4 Mäuse pro Gruppe) eine einzelne pINPROL-Injektion mit einer Dosis von 0 µg, 5 µg, 10 µg und 15 µg pro Maus i.p.

[0117] 24 Stunden nach der pINPROL-Injektion wurden die Mäuse getötet und der Prozentsatz an im Zyklus befindlicher CFU-S wurde durch den Assay, der in Beispiel 1 beschrieben ist, gemessen. Die TSP-Injektion brachte etwa 50% CFU-S in den Zyklus, im Vergleich mit 7% bei unbehandelten Mäusen. pINPROL war in so geringen Dosen wie 2 µg pro Maus war in der Lage, TSP-induzierte Proliferation auf das normale Niveau zu hemmen.

[0118] Für die Evaluierung der Wirkungsdauer wurde einer Gruppe von Mäusen (21 Mäuse pro Gruppe) nur TSP und einer anderen Gruppe sowohl TSP als auch pINPROL (24 Stunden nach TSP) injiziert. Der CFU-S-Zyklus wurde alle 24 Stunden während einer Woche gemessen, indem drei Spender von jeder Gruppe genommen wurden und der CFR-S-Zyklusstatus in ihrem Knochenmark durch die beschriebene Methode (siehe Beispiel 1) gemessen wurde. Die in **Fig. 7** dargestellten Daten zeigen, dass, während die Wirkungsdauer von TSP zumindest 7 Tage beträgt, eine einzelne Injektion von pINPROL die CFU-S in den Ruhezustand versetzen und sie für nicht mehr als 48 bis 72 Stunden aus dem Zyklus halten kann. Da die Mehrheit der chemotherapeutischen Mittel, die für Krebs- und Leukämie-Chemotherapie verwendet werden, eine relativ kurze in vivo Halbwertszeit haben, normalerweise geringer als 24 Stunden, wird die INPROL-Wirkung entsprechen den erhaltenen Daten länger aufrechterhalten als die wirksame Zeit, während derer die chemotherapeutischen Mittel, wie Cytosin-arabinsäure oder Hydroxycarbamid, in vivo aktiv sind. Noch wichtiger, für chemotherapeutische und Bestrahlungsbehandlungen, die ein längeres Intervall (mehr als 24 Stunden und weniger als 96 Stunden) zwischen der ersten (nicht schädlich für die Stammzellen) und der zweiten (schädlich für die CFU-S) Behandlung haben, sollte eine einzige Injektion von INPROL während den Intervallen zwischen den beiden Anwendungen von chemotherapeutischen Mitteln oder Bestrahlung ausreichend sein. Für mehrere wiederholte Zyklen von cytotoxischer Therapie oder Bestrahlung kann die gleiche Strategie, basierend auf der Dauer der INPROL-Wirksamkeit, angewandt werden.

Beispiel 4: Die meisten primitiven, blutbildenden Stammzellen, die nach der Behandlung mit 5-FU stimuliert werden, rasch den Zyklus zu durchlaufen, werden durch INPROL vor der zweiten S-FU-Exposition geschützt

[0119] Das Arzneimittel 5-Fluorouracil (5-FU) reduziert drastisch die Anzahl der Zellen in myeloiden und lymphoiden Kompartimenten. Es wird normalerweise als zellzyklusspezifisch, rasch auf proliferierende Zellen abzielend angesehen, da das Einbringen von des Nukleotid-Analogen in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus oder davor im Zelltod resultiert. Das Langzeitüberleben und die immunhämatopoetische Rekonstitution des Knochenmarks von Mäusen ist durch eine einzelne Dosis von 5-FU nicht betroffen; es wurde jedoch gezeigt (Harrison et al. Blood 78:1237–1240, 1991), dass pluripotente blutbildende Stammzellen (PHSC) durch eine zweite Dosis an 5-FU für eine kurze Zeitdauer von etwa 3 bis 5 Tagen nach der anfänglichen Dosis angreifbar werden. Es kann erklärt werden, dass PHSC normalerweise zu langsam den Zyklus durchlaufen, als dass eine einzelne Dosis von 5-FU wirksam ist, und dass sie in rasches Durchlaufen des Zyklus durch Stimuli, die aus der anfänglichen 5-FU-Behandlung resultieren, stimuliert werden. Wir haben vorgeschlagen, dass PHSC durch INPROL in einen langsamen Zyklusstatus zurückgebracht werden können und daher vor der zweiten 5-FU-Behandlung geschützt werden.

[0120] Die Mäuse, die in diesen Versuchen verwendet wurden, waren männliche BDF1-Mäuse. Eine Stamm-lösung von 5-FU (Sigma) wurde in physiologischer Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml hergestellt. Jede behandelte Maus erhielt 2 mg 5-FU pro 10 g Körpergewicht über eine Schwanzvene am Tag 0 des Versuches; 24 Stunden später wurde den Mäusen pINPROL (10 µg/100 g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert, und am Tag 3 wurde ihnen eine zweite Dosis 5-FU injiziert. Die Überlebensstudie wurde durchgeführt, indem der Tod von Mäusen in einer Versuchsgruppe (Behandlung mit pINPROL) und einer Kontrollgruppe von je 30 Mäusen beobachtet wurde. Die Überlebenskurven sind in **Fig. 8** gezeigt.

Beispiel 5: Wirkungen von Präinkubation mit INPROL vs MIP-1α in Knochenmarkzellen

[0121] Das Ziel dieses Versuches war der Vergleich der Hemmwirkungen von Präinkubation mit pINPROL und MIP-1α auf Mäuse-Knochenmarkzellen in vitro.

[0122] Das folgende Verfahren wurde verwendet:

in vivo: BDF1-Mäusen, 6 bis 15 Wochen alt, wurden 200 mg/kg 5-FU i.p. 48 Stunden vor Entnahme von Mark aus den Oberschenkelknochen injiziert.

in vitro: Eine gepoolte Einzelzellsuspension wird gezählt und 5×10^6 Zellen werden insgesamt in 2 ml mit oder ohne pINPROL oder MIP-1α mit 5% Pferdeserum, IMDM-Medium mit zugesetztem L-Glutamin, bei 37°C und 5% CO₂ für 4 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal gewaschen und nochmals gezählt. Sie werden in Methylcellulose unter den folgenden Endbedingungen plattiert:

0,8 % Methylcellulose

25 % Pferdeserum

20 ng/ml rekombinantes murines IL3

L-Glutamin zugesetzt

5×10^5 Zellen pro ml

IMDM-Medium

[0123] Platten wurden 11 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in 100% Feuchtigkeit inkubiert. Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden gezählt.

TABELLE 2

Gruppen	Koloniezahl	Prozent der Kontrolle
Kontrolle	31,0	100 %
pINPROL	21,25	68,5 %
MIP-1α	35,25	114 %

Beispiel 6: INPROL hemmt HPP-CFC-Proliferation

[0124] Ein in vitro-Assay zur Beurteilung der murinen wiederhergestellten Stammzellen und früher Vorgänger ist der Assay hinsichtlich Kolonien mit hohem proliferativem Potential (high proliferative potential colony, HPP-PFC); andere ähnliche Assay, z.B. CFU-A, CFU-GM, CFU-E und CFU-GEMM, weisen zunehmend eingeschränkte Vorläuferpopulationen nach (M. Moore, Blood 177:2122–2128, 1991). Dieses Beispiel zeigt, dass die Vorbehandlung von Zellen mit pINPROL ihre Proliferation hemmt, wohingegen MIP-1α dies unter diesen Versuchsbedingungen nicht tut.

[0125] BDF1-Mäuse wurden mit 5 Fluorouracil (200 mg/kg i.p.) behandelt, bevor ihr Knochenmark auf HPP-CFC-Zahlen untersucht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gewaschen und bei Dichten von 10^6 bis 5×10^6 /ml in einem Medium für 4 Stunden inkubiert, das entweder kein zugesetztes Mittel (Kontrollen), pINPROL (25 ng/ml) oder MIP-1α (200 ng/ml) enthielt. Nach Inkubation wurden die Zellen gewaschen und in Agar (0,3%) mit 30% FCS und kombiniertem konditioniertem Medium aus 5637 und WEHI-3B-Zelllinien (7,5% jedes konditionierten Mediums, wie durch Sharp et al., 1991, empfohlen) plattiert. Die Plattierkonzentration war 5×10^4 Zellen/ml in 60-mm-Schalen. Kolonien wurden am 14 Tag gezählt, und die Resultate sind nachstehend angegeben.

TABELLE 3

Gruppe	HPP-CFU	Prozent der Kontrolle
Kontrolle	15,5 ± 1,2	100 %
pINPROL	8,3 ± 0,7	53,5 %
MIP-1α	15,8 ± 0,9	101 %

[0126] Entsprechend diesen Resultaten verhinderte MIP-1α die Proliferation der meisten unreifen Vorgänger nicht, wenn es nur während der Präinkubationszeit vorhanden war. pINPROL hemmte wirksam die Proliferation unter diesen Bedingungen, was grundlegende Unterschiede zwischen pINPROL und MIP-1α in Bezug auf die biologische Aktivität anzeigt.

Beispiel 7: INPROL-Therapieeffekt bei der Erholung von strahlungsinduzierter Knochenmark-Aplasie

[0127] Knochenmark-Aplasie ist die hauptsächlich begrenzende Toxizität von Krebsbestrahlungstherapie. Es wurde gezeigt, dass einige Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF, GM-CSF, Erythropoietin) die Erholung von strahlungsinduzierter Knochenmark-Aplasie beschleunigen kann. Das Konzept des Schutzes durch Verwendung eines Inhibitors der Stammzellproliferation ist ein anderer und komplementärer Zugang beim Bewältigen von hämatologischem Schaden. Um den vorher entwickelten Behandlungsverfahren (Beispiele 3, 4) zu folgen, wurde ein Modell von letaler Bestrahlung von Mäusen etabliert. Im Stand der Technik ist bekannt, dass Mäuse, die 9Gy Kobalt 60 erhalten, nach 10 bis 14 Tagen zu sterben beginnen; am Tag 30 nähert sich die Mortalität 50%. Diese letale Dosis wurde in unserem Modell verwendet, indem sie in zwei aufeinanderfolgende Anwendungen von jeweils 4,5 Gy in einem Intervall von 3 Tagen zwischen den Dosen aufgeteilt wurde. Vorherige Daten zeigten, dass die Überlebenskurve in diesem Modell sehr nahe zu jener war, die für eine einzelne Bestrahlung mit 9Gy bekannt war; weiters zeigte der Test bezüglich CFU-S-Proliferation, dass 24 Stunden nach der ersten Bestrahlung 35 bis 50% der CFU-S veranlasst sind zu proliferieren. Solche Zeilen können durch einen Stammzellinhibitor, der vor der zweiten Dosis verabreicht wird, geschützt werden.

[0128] Um diese Möglichkeit zu untersuchen, erhielten Mäuse (50 Mäuse pro Gruppe) 4,5 Gy am Tag 0. 24 Stunden später erhielt eine Gruppe pINPROL (2 µg pro Maus i.p.) und einer anderen, der Kontrollgruppe, wurde Kochsalzlösung injiziert. Die zweite Bestrahlungsdosis (4,5 Gy) wurde am 3. Tag verabreicht.

[0129] Die Fig. 9 zeigt das verbesserte Überleben nach einer einzigen Dosis pINPROL. Die Bedingungen des Modells sind klinisch relevant für die Behandlung jeder Krebsart, einschließlich jener, die durch solide Tumore gekennzeichnet sind; eine solche Behandlung würde an einem Patienten, der Krebs hat, durchgeführt, indem eine wirksame Dosis INPROL zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bestrahlungsdosen verabreicht wird, wodurch ermöglicht wird, dass höhere Bestrahlungsdosen für die Behandlung des Krebses eingesetzt werden. Es sollte auch möglich sein, diese Modalität auf chemotherapeutische Mittel zu erstrecken.

Beispiel 8: INPROL-Verwendung für die autologe Knochenmarktransplantation

[0130] Knochenmarktransplantation ist die einzige bekannte heilende Therapie für mehrere Leukämien (CML, AML und andere). Die ex vivo-Konditionierung autologer BMT für Infusionen sollte leistungsfähige autologe Quellen von normalen Stammzellen, frei von leukämischer Kontamination und fähig zur Repopularisierung des blutbildenden Systems des Empfängers, schaffen, um eine aggressive und wirksame Therapie zu erlauben.

1. Langzeitknochenmarkkultur L1210 als Leukämie-Modell für die Untersuchung der INPROL-Wirkung, die normale Blutbildung während der Reinigung mit AraC zu bewahren

[0131] Langzeitknochenmarkkulturen (LTBMC) wurden gemäß Toksoz et al. (Blood 55:931-936, 1980) etabliert, und die Leukämiezelllinie L1210 wurde zu der LTBMC aufgenommen durch Co-Kultivierung während 2 Wochen. Das gleichzeitige Wachstum von normalen und leukämischen Vorgängern fand in diesen kombinierten LTBMC/L1210-Kulturen statt, ähnlich der Situation im Knochenmark eines Leukämiepatienten. Eine Unterscheidung zwischen normalen koloniebildenden Einheiten CFU und leukämischen CFU war möglich, indem sie als Agar-Kolonien unter Vorhandensein oder Abwesenheit des konditionierten Mediums aus WEHI-3 (eine Mäuse-IL-3 produzierende Zelllinie) gezüchtet wurden. Normale Zellen unterliegen der Apoptose bei Abwesenheit von IL-3, wohingegen leukämische Zellen in seiner Abwesenheit Kolonien formen können. Suspensi-

onszellen der LTBMCL1210-Zusammensetzung ergeben pro 50 000 plattierter Zellen ungefähr 150 Kolonien in Anwesenheit von IL-3 (normale blutbildende Klone) und 70 Kolonien, wenn sie ohne IL-3 wachsen (leukämische Klone).

[0132] Das Reinigungsverfahren war wie folgt: Am Tag 0 wurden alle Suspensionszellen und Medien (10 ml/Flasche) aus den Flaschen mit LTBMCL1210 entnommen und mit 2 ml Medium ersetzt, das 200 µg Cytosinarabinsid (AraC) (Tsyrova et al. in: Leukemia: Advances in Biology and Therapy v. 35, 1988) enthielt; nach 20 Stunden Inkubation wurden die Flaschen ausgewaschen und mit 2 ml frischem Medium allein (Kontrollgruppe) oder Medium, enthaltend pINPROL mit 25 ng/ml, für 4 Stunden ersetzt. Nach dieser Präinkubation wurden die Zellen nochmals mit 100 µg/Flasche AraC für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Jede Gruppe enthielt 4 Flaschen. LTBMCL1210-Kulturen wurden dreimal gewaschen und frisches LTBC-Medium ersetzt; sie wurden wie zuvor für die Regenerationsuntersuchungen 3 bis 4 Wochen aufbewahrt.

[0133] Die Daten sind in **Fig. 10** dargestellt. Man konnte kein Zellwachstum in den Kontrollkulturen, die nur mit AraC behandelt wurden, sehen, während in den INPROL-geschützten Flaschen eine Regeneration der Blutbildung durch Proliferation von Vorläufern aus der adhärennten Schicht viel rascher stattfand. Weiters wuchsen die Zellen aus der Versuchsgruppe, als sie in Agar plattiert wurden, nur in Gegenwart von IL-3, wobei sie ungefähr 100 CFU pro 50 000 Zellen ergaben; zumindest während vier Wochen konnte kein Leukämiezellenwachstum festgestellt werden. Knochenmark, das ex vivo mit einer wirksamen Dosis AraC in Kombination mit INPROL behandelt wurde, kann von Krebszellen gereinigt werden, während die Stammzellen geschützt sind. Es sollte möglich sein, diese Modalität auf andere Formen der Chemotherapie- oder Bestrahlungsbehandlung auszudehnen.

2. Knochenmarkrepopulationsfähigkeit (MRA) und 30 Tage Bestrahlungsschutz werden durch INPROL-Behandlung in vitro erhöht

[0134] MRA, die Fähigkeit von Zellen, das Knochenmark letal bestrahlter Mäuse zu repopulieren, zusammen mit der Möglichkeit, Bestrahlungsschutz für 30 Tage zu erteilen, ist eine direkte in vivo Messung des Potentials, myelosupprimierte Tiere zu retten (Visser et al., Blood Cells 14:369–384, 1988).

[0135] Für Bestrahlungsschutzuntersuchungen wurden BDF1-Mäuse mit 9,5 Gy bestrahlt und durch Transplantation von Knochenmark von Testosteron-stimulierten Spendern wiederhergestellt. Eine Gruppe von Empfängern wurde mit Knochenmarkzellen wiederhergestellt, die für 4 Stunden mit Medium (Kontrolle – Gruppe A) präinkubiert wurden, und die andere (Gruppe B) mit 25 ng/ml pINPROL. Die Zellen beider Gruppen wurden gewaschen, und 30 000 Zellen pro Maus wurden den bestrahlten Tieren transplantiert. Die Überlebensdaten sind gezeigt (**Fig. 11**). Die Summe dreier Experimente ist dargestellt, mit Kontrollen normalisiert auf 100%. pINPROL-Inkubation erhöhte das Überleben von Mäusen von 36,5% in der Kontrollgruppe auf 61,8% am Tag 30.

[0136] Die Zunahme der MRA, induziert durch die Präinkubation mit INPROL, könnte einer der Mechanismen zur Verbesserung des Bestrahlungsschutzes sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde MRA gemäß Visser et al. (op.cit.) gemessen. Kurz, die Spender-BDF1-Mäuse wurden mit Testosteron vorbehandelt, ihr Knochenmark wurde mit Medium oder pINPROL für 4 Stunden präinkubiert und bestrahlten Tieren injiziert. Am Tag 13 wurden die Knochenmarkzellen aus den Oberschenkeln der Empfänger in Agar in drei verschiedenen Konzentration (0,01, 0,05, 0,1 Äquivalente eines Oberschenkelknochens) in Gegenwart von 20% Pferdeserum und 10% WEHI-CM plattiert. Die Anzahl der Kolonien am Tag 7 repräsentiert die MRA, da die kolonieformenden Zellen im Knochenmark der Empfänger zu diesem Zeitpunkt die Vorläufer der unreifen Stammzellen des Spenders waren.

[0137] Wie man in **Fig. 12** sehen kann, ist die MRA der mit INPROL präinkubierten Zellpopulation größer als in der Kontrollgruppe (B).

Beispiel 9: Antihyperproliferative Wirkung von INPROL auf Stammzellen kann ihre Differenzierungsabnormalitäten ändern

[0138] Hyperproliferation von CFU-S ist nicht nur während der Wiederherstellung nach cytotoxischen Arzneimitteln oder Bestrahlung, sondern auch als eine Folge normalen Alterns zu sehen und wird daher als Hauptmerkmal beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) angesehen. Es wird begleitetet durch Differenzierungsstörungen, wie ein Überwiegen von Erythroiddifferenzierung, während die Differenzierung entlang des granulocytischen Weges reduziert ist.

[0139] Knochenmarkszellen wurden für 4 Stunden bei 37°C mit 25 ng/ml pINPROL oder Medium (Kontrolle) inkubiert, gewaschen und dann in Agar mit 20% Pferdeserum, 2 U/ml Erythropoietin und 10% WEHI-CM plattiert. Die Anzahl von BFU-E und GM-CFU-Kolonien wurde am Tag 7 gezählt. Die Daten, die in Tabelle 4 dargestellt sind, wurden von drei Versuchen summiert – 4 Tiere pro Punkt wurden von jeder Gruppe genommen: 4 Schalen wurden plattiert.

[0140] Es ist aus Tabelle 4 offensichtlich, dass die Inkubation von normalem Knochenmark (NBM) von intakten jungen Tieren (BDF₁ 8–12 Wochen alt) mit INPROL die Anzahl oder den Anteil von verschiedenen Kolonietypen nicht geändert hat. BDF₁-Spender, die mit Testosteronpropionat (TSP) vorbehandelt wurden, zeigten denselben Zuwachs in CFU-S-Proliferation wie zuvor gesehen (Beispiel 1, 3, 4), einen leichten Zuwachs in der Erythroidprogenitoranzahl (BFU-E-Kolonien) und eine Abnahme von GM-CFU, die durch die Inkubation mit INPROL vollständig aufgehoben wurden. Zusätzlich wurde das abnormal hohe Niveau von CFU-S-Proliferation auf 10% CFU-S in der S-Phase des Zellzyklus zurückgebracht. CFU-S-Hyperproliferation ist ein bekanntes Merkmal einiger Mäusestämme, die empfänglich für virale Leukämieinduktion sind, z.B. Balb/c-Mäuse (Tabelle 4), und kann auch bei älteren Tieren (Tabelle 4) beobachtet werden. Dieselbe Neuverteilung von Vorläufern, die in TSP-behandelten BDF₁-Mäuse zu sehen waren, wird bei Balb/c und bei älteren (23 bis 25 Monate alt) BDF₁-Mäusen beobachtet, die im Allgemeinen das abnormal hohe Niveau an CFU-S-Proliferation haben. Die Korrektur sowohl der Proliferation von CFU-S und der Differenzierung wurde durch die Inkubation mit INPROL induziert. Was klinisch noch relevanter ist, die Untersuchung zeigte, dass die in vivo-Injektion von INPROL (2 µg pro Maus) sowohl die Proliferation von CFU-S als auch das Verhältnis von Erythroid (BFU-E) und GM-Kolonien (Tabelle 4) beeinflusste.

TABELLE 4

INPROL-Wirkung auf CFU-S-Differenzierung in erwartete Vorläufer BFU-E und CFU-GM				
Knochenmark-spender	p-INPROL	Prozent CFU-S getötet durch ³ HTdR	BFU-E	CFU-GM
BDF ₁ jung	-	12,0 ± 0,3	28,33 ± 1,91	46,22 ± 3,44
	- +	15,0 ± 1,3	22,00 ± 3,74	47,70 ± 3,72
BDF ₁ alt	-	47,1 ± 1,9	43,75 ± 1,54	24,0 ± 1,33
	+	11,4 ± 0,7	15,25 ± 1,45	44,0 ± 7,63
BDF ₁ stimuliert durch TSP	-	53,2 ± 1,6	32,67 ± 2,44	15,71 ± 2,28
	+	7,2 ± 0,4	12,00 ± 1,83	35,50 ± 1,4
Balb/C	-	57,0 ± 1,9	47,60 ± 2,96	33,57 ± 3,45
	+	23,0 ± 2,4	24,86 ± 2,53	70,60 ± 4,96

Beispiel 10: Immunstimulierende Aktivität von INPROL

[0141] Es wurde beobachtet, dass die Inkubation von Knochenmarkszellen, die einen hohen Anteil von proliferierenden CFU-S enthalten, mit INPROL nicht nur den Zyklus von CFU-S ändert, sondern auch ihre Differenzierung, wobei die vorherrschende Enthroiddifferenzierung zugunsten von Granulozyten- und Lymphoid-Vorgängern umgestellt wird. Diese Eigenschaft von INPROL ist von Bedeutung aufgrund der immunsuppressiven Nebenwirkung von cytotoxischer Chemotherapie oder Bestrahlungstherapie sowie auch aufgrund der Immun-

suppression, die mit hyperproliferativen Stammzellenstörungen und Altern einhergehen.

[0142] Das Beispiel zeigt die direkte Wirkung von INPROL auf die Differenzierung von unreifen Vorläufern aus der Lymphoid-Langzeitkultur (LLTC), die etabliert ist gemäß Wittlock & Witte (Ann. Rev. Immun. 3:213–35, 1985) in Prä-B-Vorläufer, gemessen durch die Bildung von Kolonien in IL-7 enthaltender Methylcellulose LLTC wurde, wie beschrieben, etabliert und mit frischem LLTC-Medium (Terry Fox Labs., Vancouver, Kanada) zweimal pro Woche versorgt. Nicht-adhärenente Zellen wurden einmal in der Woche entnommen, frei von Faktoren gewaschen und für 4 Stunden mit 25 ng/ml pINPROL oder Medium alleine als Kontrolle inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und bei einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml in Methylcellulose, enthaltend 30% FCS und 10 ng/ml IL-7, plattiert. Daten von drei Wochen sind in **Fig. 13** gezeigt. Die Anzahl großer Prä-B-Kolonien variierte in der Kontrolle, nahm mit der Zeit zu, aber die Präinkubation mit INPROL stimulierte immer das Wachstum der Kolonien vier- bis achtfach über dem Kontrollniveau. Dies demonstriert eine immunstimulierende Eigenschaft von INPROL, die zur Korrektur von immunschwachen Zuständen und zum Erhöhen gewünschter Immunantworten, z.B. Impfung, nützlich ist.

Beispiel 11: INPROL verbessert die Repopulationsfähigkeit von Stammzellen – Langzeitkultur initiiierenden Zellen von Patienten mit CML

[0143] Chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine tödliche maligne Krankheit der blutbildenden Stammzellen. Die Behandlung von CML in der chronischen Phase durch Chemotherapie mit einem einzelnen Mittel, Kombinations-Chemotherapie, Splenektomie oder Milzbestrahlung kann die klinischen Zeichen und Symptome kontrollieren, verlängert aber das Überleben nicht signifikant. Da CML von der chronischen zur beschleunigten Stufe fortschreitet, ist die Standardtherapie nicht wirksam. Zurzeit ist Knochenmarktransplantation (BMT) die einzige bekannte heilende Therapie für CML. Therapie mit nicht verwandtem Spender-BMT ist schwierig aufgrund von Histoinkompatibilitätsproblemen. Weniger als 40% von ansonsten in Frage kommenden CML-Patienten haben einen geeigneten, passenden verwandten Spender; autologe Transplantation wird daher bevorzugt. Die ex vivo-Konditionierung von autologem BMT für Infusionen zusammen mit der Möglichkeit, nichtleukämische (Ph-negative) myeloide Vorläufer von Ph-positiven Patienten auszuwählen, die in Langzeitkulturen (LTC) wachsen, lässt das Potential von autologen Quellen von normalen Stammzellen vermuten, um eine aggressive und wirksame Therapie von CML zu ermöglichen.

[0144] Im Zusammenhang mit BMT kann eine blutbildende Stammzelle definiert werden als eine, die die Fähigkeit hat, über ausgedehnte Zeiträume reife Blutzellen zu erzeugen. Wir haben das humane LTC-System, entwickelt von C. Eaves & A. Eaves, verwendet, sowohl für die Quantifizierung der Stammzellzahl als auch als Mittel zur Manipulation derselben für therapeutische Verwendung. Dies umfasst das Aussäen von Zellen auf eine voretablierte, bestrahlte adhärenente Schicht aus menschlichem Mark; diese Kulturen wurden dann für 5 Wochen erhalten. Der Endpunkt ist der gesamte klonogene Zellgehalt (adhärenent und nicht adhärenent) der Kulturen, der am Ende dieses Zeitraumes entnommen wurde. Der klonogene Zellertrag unter diesen Bedingungen ist linear mit der Anzahl der Vorläufer (Langzeitkultur initiiierende Zellen (LTC-IC)), die ursprünglich zugegeben wurden, verbunden; der mittlere Output von einzelnen menschlichen LTC-IC ist 4 klonogene Vorläufer pro LTC-IC. Es wurde zuvor gezeigt, dass, wenn Knochenmark von Patienten mit CML unter ähnlichen Bedingungen angeordnet wird, leukämische (Ph-positive) klonogene Zellen rasch abnehmen. Durch Verwendung der Quantifizierung von restlichen, normalen LTC-IC ist es bei Patienten mit CML möglich, jene auszuwählen, die wahrscheinlich von intensiver Therapie, getragen durch Transplantation von kultivierten Autotransplantaten, profitieren (Phillips et al., Bone Marrow Transplantation 8:477–487, 1991).

[0145] Das folgende Verfahren wurde verwendet, um die Wirkung von INPROL auf die Zahl der klonogenen Zellen (LTC-IC) unter Knochenmarktransplantatzellen, etabliert aus dem peripheren Blut eines Patienten mit CML, zu untersuchen.

[0146] Kulturen wurden als Langzeitkulturen auf vorbestrahltem Stroma gestartet. Das periphere Blut eines gesunden Spenders wurde als Kontrolle verwendet. Periphere Blutzellen von einem CML-Patienten wurden mit oder ohne pINPROL (25 ng/ml) für vier Stunden präinkubiert, gewaschen und für fünf Wochen in das LTC-IC-System gegeben, um die Kontrollanzahl von LTC-IC zu bestimmen. Für Versuche wurden parallel Kulturen für 10 Tage etabliert. Die Mischung von adhärenenten und nicht adhärenenten Zellen aus Kulturen, die 10 Tage gewachsen waren, wurde mit oder ohne pINPROL präinkubiert und für zusätzliche 8 Wochen auf voretablierte Feeder gebracht. Die Anzahl der LTC-IC von jeder Versuchskultur wurde durch Plattieren sowohl der adhärenenten als auch der nicht adhärenenten Zellen in Methylcellulose mit geeigneten Wachstumsfaktoren (Terry Fox Laboratories, Vancouver, Kanada) und Zählen der erhaltenen Gesamtzahl von kolonieformenden Zellen bestimmt. Die LTC-IC-Werte, die bei Verwendung dieses Verfahrens erhalten wurden, erhielt man durch Beur-

teilung des gesamten klonogenen Zellgehalts (CFC) unter Verwendung der Formel:

$$\#LTC-IC = \#CFC/4$$

[0147] Die in **Fig. 14** dargestellten Daten zeigen, dass kein Verlust an LTC-IC während der ersten 10 Tage der Kultur vorhanden war, die vom Knochenmark des gesunden Spenders gestartet wurde, und dass ungefähr 30% der Anzahl der Anfangs-LTC-IC nach 5 Wochen in der Kultur noch vorhanden waren. Die Anzahl der LTC-IC der CML-Patienten wurde während des 10-Tage-Zeitraums drastisch auf etwa 8% reduziert und erholte sich während der weiteren Inkubation nicht, wohingegen die Präinkubation von Zellen mit INPROL den LTC-IC-Level auf 30% der anfänglichen Anzahl erhöhte und während 8 Wochen aufrechterhielt.

[0148] Klinisch relevante Anwendungen von INPROL, prognostiziert durch diese vorläufigen Daten, umfassen seine Verwendung in Strategien zum selektiven Verbessern des normalen Stammzellgehaltes von frischen oder kultivierten Marktransplantaten, Strategien für die Verbesserung der Rekrutierung von restlichen normalen Stammzellen in vivo sowie Protokolle zum Transferieren neuen genetischen Materials in menschliche Knochenmarkstammzellen für die weitere Transplantation in Patienten.

Beispiel 12A: Ein Verfahren zur Isolierung von immunaktivem Inhibitor der Proliferation von Stammzellen aus Knochenmarkzubereitungen

[0149] Das Knochenmark wurde aus Schweinerippen isoliert. Die Rippen vom Rumpf der Schweine wurden abgetrennt und von Muskelfasern und Fett gereinigt, in Stücke geschnitten, und das Knochenmark wurde durch Hydropresse, hergestellt durch Biophyzpribor, extrahiert. Die Knochenmarkzellen werden durch 20-minütiges Zentrifugieren in einer Zentrifuge K-70 bei 2 000 U/min abgetrennt. Der Überstand des Extrakts wurde nacheinander Ultrafiltration durch Amicon USA Membranen XM100, PM30, PM50 unterworfen. Gemäß der Analyse durch Elektrophorese ist die Hauptkomponente des Produkts Albumin (siehe **Fig. 1**).

Biochemische Reinigung

[0150] Der Knochenmarkextrakt und Proteinkomponenten der Fraktionen wurden in jedem Schritt der Reinigung durch Gelelektrophorese in 10% Polyacrylamid, enthaltend 0,1% Natriumdodecylsulfat, analysiert. Bis zu 7% Natriumdodecylsulfat und bis zu 0,5 bis 1 % Mercaptoethanol wurden den Proben zugesetzt, die vor Beladung des Gels 5 min bei 70°C inkubiert wurden.

[0151] Die Elektrophorese wurde bei 20V cm des Gels für 5 Stunden durchgeführt. Dann wurde das Gel in 0,25% Coomassie CBBC250 in einer Mischung von Ethanol:Wasser:Essigsäure 5:5:1 für eine Stunde bei 20°C angefärbt und in mehreren Durchgängen von 7-%iger Essigsäure gewaschen. Die Aktivität des Produktes wurde durch die Methode der Hemmung der Proliferation von blutbildenden Stammzellen (CFU-S) evaluiert. Die Methode ist im Folgenden näher beschrieben.

Stufe 1: Reinigung durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat

[0152] Die Aktivität wurde durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat bei 25% mit Sättigung von 40 bis 80% gereinigt, was auf Basis der Resultate in Tabelle 5 gewählt wurde.

TABELLE 5

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

[0153] Die Menge der Zubereitung, die für das Testen nach jedem Reinigungsschritt verwendet wurde, wurde in Übereinstimmung mit dem Niveau der Reinigung und äquivalent zur Dosis von 2×10^{-2} mg des Ausgangsproduktes bestimmt. Die Aktivität wurde durch die Formel

$$\% \text{ Änderung} = \%Sa - \%Sb$$

bestimmt; wobei

%Sa gleich %S in der Kontrolle

%SB gleich %S nach Inkubation mit der Testfraktion ist.

[0154] Die Fraktion wurde vor jedem Testen der Aktivität und vor jedem folgenden Reinigungsschritt entsalzt, um die Konzentration von Ammoniumsulfat 20-fach zu senken.

Stufe 2

[0155] Der unreine Inhibitor aus der Stufe 1 wird nach Entsalzung eingesetzt und unter Verwendung von Ionenaustauschchromatographie, hier DEAE-23-Cellulose, fraktioniert und dann mit einem Gradienten eines Natriumacetatpuffers (pH 6,0) eluiert.

[0156] Die aktiven Fraktionen des Inhibitors eluieren zwischen 3 bis 5 mM.

[0157] Das Volumen der Säule war 1 ml, und die Elutionsgeschwindigkeit war 4 ml/h. Die Detektion erfolgte durch den Chromatographen Millicrome bei 230 und 280 nm. Die Fraktion 1 (siehe **Fig. 2**), die die höchste Aktivität zeigte, wurde isoliert und in 5 mM Natriumacetatpuffer (siehe Tabelle 6) eluiert.

TABELLE 6

Fraktionen	1	2	3	4	5
Aktivität	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%

[0158] Die Elektrophoresedaten zeigen an, dass die Hauptproteinverunreinigung Albumin (siehe **Fig. 3**) aus dieser Fraktion entfernt wurde, was zu einer zusätzlichen vierfachen Reinigung führt.

Stufe 3

[0159] Der teilweise gereinigte Inhibitor aus Stufe 2 wird direkt auf eine G-75 Sephadex-Säule geladen.

[0160] Das Volumen der Säule ist 20 ml (20 × 1), die Elutionsgeschwindigkeit ist 2 ml/h. Der Elutionspuffer ist 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Die Detektion erfolgte auf einem Chromatographen Millicrome bei 230 und 280 nm. Die Fraktion 5, die die höchste Aktivität hatte, wurde isoliert.

TABELLE 7

Fraktionen	1	2	3	4	5
Aktivität	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%

Stufe 4

[0161] Umkehrphasenchromatographie (Pharmacia FPLC-System) unter Verwendung von Pro-REC-Säulen wird an einer Ultrasfera-Matrix ausgeführt. Protein wird unter Verwendung von 0,1% Trifluoressigsäure in einem Acetonitril-Gradienten eluiert.

[0162] Die Homogenität eines Produktes mit MW 16–17 kD ist gleich 90%, wie in der Analyse des Acrylamid/Natriumdodecylsulfat-Gels (siehe **Fig. 6**) gezeigt wurde. Das Resultat ist in **Fig. 4** dargestellt. Die Aktivität der Fraktion 5 wurde bestimmt. Die Endausbeute des Produktes ist 5%. Daher ist die Gesamtmenge des Proteins mit MW 16 kD nach der Reinigung 650 ng/ml Ausgangsprodukt. Während des Reinigungsverfahrens wurde das Produkt für mehrere Minuten einer Wärmeinkubation bei 70°C unterworfen, aber es wurde kein Verlust der biologischen Aktivität festgestellt.

Beispiel 12B: Alternatives Verfahren zur Isolierung größerer Mengen von INPROL

Anfängliche Isolation

[0163] Rippen von frischer Schweinekarkasse werden von Muskelfasern und Fett gereinigt, dann in Stücke geschnitten und in Phosphat-gepufferter Saline in einem Verhältnis 1:1 (Gewicht/Volumen) eingeweicht. Die erhaltene Mischung wird durch eine Hydraulikpresse zermalm, um das Knochenmark vom festen Knochenmaterial zu trennen.

[0164] Die Suspension von Knochenmarkzellen wird gesammelt und durch vier Lagen Filtertuch (Cheese-cloth) von festen Teilchen freigefiltert. Das Filtrat wird 40 min bei 56°C inkubiert, dann in einem Eisbad auf 4°C gekühlt. Das resultierende Präzipitat wird durch 30-minütige Zentrifugation bei 10 000 g bei 4°C entfernt und verworfen.

[0165] Der geklärte Überstand wird tropfenweise während 30 min zu 10 Volumina gerührtem eiskalten Aceton, enthaltend 1 Vol-% konzentrierte Salzsäure, zugefügt. Die resultierende Mischung wird zur vollständigen Bildung des Präzipitates 16 Stunden bei 4°C gehalten. Dann wird das Präzipitat durch 30-minütige Zentrifugation bei 20 000 g bei 4°C pelletiert. Das Pellet wird mit kaltem Aceton gewaschen und getrocknet.

HPLC-Reinigung

[0166] Das Pellet wird in HPLC-Elutionspuffer A, enthaltend 5% Acetonitril (MeCN) und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), auf eine Endproteinkonzentration von 8–10 mg/ml gelöst. Diese Lösung (0,5 – 0,6 ml) wird auf eine 250 × 4,6 mm HPLC-Säule geladen, die mit Polysil ODS-300 (10 mcm) gepackt und mit demselben Puffer A äquilibriert ist.

[0167] Die Elution erfolgt durch den Gradienten des Puffers B (90% MeCN, 0,1% TFA) im Puffer A bei einer Durchfluss von 1 ml/min nach dem folgenden Programm:

Zeit, min	% von B
0	0
4	0
5	25
25	90

[0168] Ein zusätzlicher Schritt von 100% B für 5 min wird verwendet, um die Säule vor der Reäquilibration zu waschen. Dann wird die Säule nochmals äquilibriert, um in den ursprünglichen Zustand zurückzukehren, und die nächste Portion der Proteinlösung kann aufgebracht werden. Ein typisches Chromatogramm ist in **Fig. 5** gezeigt.

[0169] Während der Trennung wird der Säulenabfluss bei 280 nm für die Detektion von Protein-Peaks beobachtet. Fraktionen, die das Proteinmaterial enthalten, werden gesammelt, getrennte Peaks werden zusammengefasst und durch Rotationsverdampfung bei 30°C zur Trockne gebracht. Die erhaltenen Rückstände werden in destilliertem Wasser gelöst und durch einen Bioaktivitätstest und durch SDS-PAGE (14% Gel, reduzierende Bedingungen) getestet. Der das aktive Material enthaltende Peak wird zwischen 70 und 80% Puffer B eluiert und enthält die Hauptproteinbande von 16 kD und die Spuren von sich schneller bewegendenden Proteinen, wie durch SDS-PAGE getestet.

[0170] Eine Analyse des Materials, das durch Sammeln nur des zweiten HPLC-Hauptpeaks erhalten wurde, ist in **Fig. 15** (A und C) gezeigt. Material, das beide Peaks enthält (z.B. **Fig. 5**), wird hier als pINPROL-Zubereitung 1 und jenes, das nur aus dem zweiten Peak besteht, als pINPROL-Zubereitung 2 bezeichnet. 500 µg dieser aktiven, gereinigten pINPROL-Zubereitung 2 wurde auf eine C4-Umkehrphasensäule (Vydac) geladen und unter Verwendung eines linearen Gradienten von 595% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure eluiert. Das Material eluierte als ein Einzelpeak bei 53% Acetonitril (**Fig. 15A**). Wenn 250 µg von MIP-1α (R & D Systeme) unter identischen Bedingungen verwendet wurden, eluiert es bei 43,9% Acetonitril (**Fig. 15B** – beachte, dass die früheren Peaks vor 14% Acetonitril Artefakte und aufgrund von Luftblasen im Detektor vorhanden sind). Natürlich vorkommendes INPROL ist also wesentlich hydrophober als MIP-1α unter diesen Bedingungen. Von TGFβ ist bekannt, dass er bei niedrigeren Konzentrationen als jenen, die für pINPROL unter diesen Bedingungen beobachtet werden, zu eluiert (Miyazono et al., J.Biol. Chem. 263:6407–15, 1988).

[0171] Ein Gel des eluierten pINPROL-Materials ist in **Fig. 15C** gezeigt. Die Bahn 1 ist das rohe Material, Bahn 2 sind Molekulargewichtsmarker und Bahn 3 ist das gereinigte Material. Es gibt zwei Hauptbande, eine bei etwa 14 kD und eine bei etwa 35 kD. Es wird angenommen, dass die 35-kD-Bande eine multimer Form der 14-kD-Bande ist.

Beispiel 13A: Aktive INPROL-Zubereitungen enthalten Hämoglobin-Betakette

[0172] pINPROL wurde, wie in **Fig. 5** gezeigt, hergestellt (d.h. pINPROL-Zubereitung 1 (siehe Beispiel 12B)). Man ließ das Material auf SDS-PAGE laufen und übertrug es unter Verwendung von Standardtechniken auf Nitrocellulose. Das Material wurde unter Verwendung eines ABI 477A Proteinsequenators mit 120A Online PTH-AA Analysator unter Verwendung von Standardtechniken einer N-terminalen Sequenzanalyse unterworfen. Die folgende N-terminale Sequenz wurde erhalten:

VHLSAEEKEAVLGLWGKVNDEV....

[0173] Eine Computerdurchsuchung der Proteindatenbanken ergab, dass diese Sequenz Identität mit der N-terminalen Sequenz der Betakette von Schweinehämoglobin hat (cf. **Fig. 16C**).

Beispiel 13B: Aktive INPROL-Zubereitungen enthalten Hämoglobin-Alpha-kette

[0174] Wie in **Fig. 15C** gezeigt, ergab durch Sammeln des zweiten Hauptpeaks gereinigtes Protein, gezeigt in **Fig. 5**, (d.h. pINPROL-Zubereitung 2) zwei Hauptbande, die Molekulargewichten von ungefähr 15 K und 30 K entsprachen, sowie mehrere kleinere Bande. SDS-PAGE-Gele wurden durch Verwendung von Standardtechniken auf Nitrocellulose transferiert und einzelne Bande wurden ausgeschnitten und einer Analyse der N-terminalen Sequenz, wie im Beispiel 13A, unterworfen. Die folgende N-terminale Sequenz wurde für die 15-kD-Bande erhalten:

VLSAADKANVKAAWGKVGQG.....

[0175] Die 30-kD-Bande wurde begrenztem proteolytischem Verdau unterworfen, und die folgende interne Sequenz wurde erhalten:

* * FPHFNLSHGSDQVK...

[0176] Die erste Sequenz zeigt Identität mit der N-terminalen Sequenz von Schweinehämoglobin-Alpha-kette, wohingegen die zweite Sequenz Identität mit den Resten 43–56 der Schweinehämoglobin-Alpha-kette zeigt (siehe **Fig. 16C** für einen Sequenzvergleich von menschlichen, Mäuse- und Schweine-Alpha- und -Betahämoglobinketten). Wiederholtes Sequenzieren dieser Banden sowie einiger der kleineren Banden brachte gleichbleibende Abschnitte der Alpha-globin-Sequenz. Die verschiedenen beobachteten Bänder in **Fig. 15C** stellen also entweder Fragmente oder Aggregate der Schweinehämoglobin-Alpha-kette dar.

Beispiel 13C: Weitere Charakterisierungen von Schweine-INPROL

[0177] Um pINPROL mit Schweinehämoglobin weiter zu vergleichen, wurde zweimal kristallisiertes Schweinehämoglobin von Sigma Chemical Company erhalten und Umkehrphasen-HPLC, wie im Beispiel 12B für **Fig. 15** beschrieben, unterworfen. Wie man in **Fig. 17** sehen kann, ist das HPLC-Chromatogramm von intaktem Hämoglobin ähnlich jenem, das für die pINPROL-Zubereitung 1 erhalten wurde. Weiters sieht man beim direkten Vergleich, dass die pINPROL-Zubereitung 2, die in **Fig. 17A** gezeigt ist (d.h.

[0178] erhalten vom zweiten Peak der **Fig. 5**), mit dem der zweiten zwei Peaks von Schweinehämoglobin (**Fig. 17B**) überlappt, mit Retentionszeiten von 52,51 bzw. 52,25 Minuten für die Hauptpeaks. Es ist zu beachten, dass Häm mit dem ersten Hauptpeak in Hämoglobin, in diesem Fall bei 49,153 min, co-migriert; Häm ist daher eine Komponente der pINPROL-Zubereitung 1, aber nicht der Zubereitung 2. Das wird durch das Fehlen der Absorption dieser pINPROL-Zubereitung bei 575 nm, einer Wellenlänge, die für das Vorliegen von Häm diagnostisch ist, bestätigt.

[0179] Die vorhergesagten Molekulargewichte von Schweinehämoglobin-Alpha- und -Beta-ketten sind 15038 Dalton und 16034 Dalton. In dem SDS-PAGE-Chromatogramm in **Fig. 18** kann man sehen, dass die ersten zwei Peaks aus der Kette mit höherem Molekulargewicht und die zweiten zwei aus der Kette mit geringerem Molekulargewicht zusammengesetzt werden. Die ersten zwei Peaks scheinen daher die Hämoglobin-Betaketten und die zweiten zwei Peaks die Hämoglobin-Alpha-kette zu repräsentieren.

[0180] Eine zusätzliche Auftrennung von Schweinehämoglobin wurde unter Verwendung eines flachen Eluierungsgradienten (**Fig. 21**) durchgeführt. N-terminale Analysen dieser Peaks demonstrierten, dass der erste Peak eine Schweine-Alpha-Kette und der zweite Schweine-Beta-Kette ist. Ergebnisse von Bioassays bestätigen, dass beide isolierten Hämoglobinketten biologisch aktiv sind (z.B. Beispiele 14 und 15).

[0181] Um die pINPROL-Zubereitung 2 und Hämoglobin-Beta-Kette weiter zu vergleichen, wurden zweidimensionale Elektrophoresen durchgeführt (**Fig. 19**). In einer ersten Dimension wurde isoelektrisches Fokussieren in Glasröhrchen unter Verwendung von 2% pH 4–8 Ampholine für 9600 Volt-Stunden durchgeführt. Tropomyosin (MW 33 kD, pI 5,2) wurde als innerer Standard verwendet; seine Position ist am End-2D-Gel mit einem Pfeil markiert. Das Röhrchengel wurde in Puffer äquilibriert und oben auf einem Sammelgel auf ein 12,5% Acrylamid-Plattengel versiegelt. SDS Plattengelelektrophorese wurde für 4 Stunden bei 12,5 mA/Gel durchgeführt. Die Gele wurden Silber-gefärbt und getrocknet.

[0182] Ein Vergleich der 2D-Elektrophoresemuster ergab nur ein oder zwei kleine Flecken, die zwischen HPLC-gereinigter Hämoglobin-Beta-Kette und der pINPROL-Zubereitung 2 unterschiedlich waren. Western-Analysen unter Verwendung von Anti-Schweinehämoglobin-Antikörpern und entweder 1D- oder 2D-Elektrophorese bestätigen das Vorliegen von Beta-Hämoglobin in der Zubereitung. Die aktive pINPROL-Zubereitung 2, zubereitet gemäß Beispiel 12B, ist daher im wesentlichen Schweinehämoglobin-Beta-Kette.

Beispiel 14: Hämoglobin-Alpha-Kette Hämoglobin-Beta-Kette oder intaktes Hämoglobin zeigen Stammzellinhibitoraktivität

[0183] Um zu bestätigen, dass Hämoglobin-Beta-Kette INPROL-Aktivität hat, wurde ein Suicid-Assay unter Verwendung von Knochenmark von mit Testosteron behandelten Mäusen durchgeführt, wobei die Vorgangsweise, die in Beispiel 1 beschrieben wurde, unter Verwendung von gereinigtem Material wie in Beispiel 12B verwendet wurde. Wie in Tabelle 8 gezeigt, wurden 15% normale Mäuseknochenmarkzellen getötet, im Gegensatz zu 36% in den mit Testosteron behandelten Tieren. Wie erwartet, deutete dies daraufhin, dass Testosteronbehandlung den Prozentsatz der im Zyklus befindlichen Zellen erhöht (und sie daher empfindlicher gegen Abtötung macht -z.B. Beispiel 1). Im scharfen Gegensatz zeigten Zellen von testosteronbehandelten Tieren, die entweder mit pINPROL oder gereinigter Hämoglobin-Beta-Kette bei 40 ng/ml inkubiert wurden, eine dramatische Absenkung des Prozentsatzes an Zellen im Zyklus von 36% auf 0% bzw. 7%. Die höhere Dosis von 200 ng war für beide Proteine weniger wirksam. Als positive Kontrolle reduzierte der zuvor charakterisierte Stammzellinhibitor MIP-1 α das Durchlaufen des Zyklus auf 13%.

[0184] Ein ähnlicher Test kann in vitro durchgeführt werden, wobei der Zyklus-Status von CFU-MIX anstelle von CFU-S verwendet wird. Der Assay wird, wie oben für den CFU-S-Assay beschrieben, durchgeführt, außer dass Cytosinarabinsid (Ara C, 30 mg/ml) als zyklusspezifisches, toxisches Mittel anstelle von hochdosiertem, tritiiertem Thymidin verwendet wird (siehe B.I. Lord in: Haemopoiesis – A Practical Approach, N.G. Testa and G. Molineux (Eds.), IRL Press 1993; Pragnell et al. in: Culture of Hematopoietic Cells, R.I. Freshney, I.B. Pragnell and M.G. Freshney (Eds.), Wiley Liss 1994) und ein Mäusestamm mit hohen endogenen Zyklusraten (Balb/c) anstelle von testosteronbehandelten BDF₁-Mäusen verwendet wird. Wie in Tabelle 9 gezeigt, sind sowohl hochgereinigte Schweine-Beta-Ketten als auch hochgereinigte Schweine-Alpha-Ketten in diesem Assay aktiv. Zu bemerken ist, dass in diesem Assay die Zyklusniveaus für Zellen, die mit pINPROL behandelt wurden, gelegentlich negative Zahlen haben, wodurch angezeigt wird, dass sogar mehr Kolonien in dem mit Ara C behandelten Pool als in dem nicht behandelten Pool vorhanden sind.

[0185] Wie im Beispiel 2 beschrieben, hemmt pINPROL die Proliferation der Mäuse-Stammzelllinie FDCP-MIX in einem Test zur Aufnahme von tritiiertem Thymidin. **Fig. 20** zeigt, dass gereinigte Hämoglobin-Alpha- oder -Beta-Ketten beide in diesem Test aktiv sind, wobei Hemmungen bei <2ng/ml zu sehen sind.

[0186] Das Vorhergehende beweist, dass die Beta-Kette von Schweinehämoglobin INPROL-Aktivität zeigt. Andere Daten (z.B. Tabelle 9, **Fig. 20**) zeigen, dass isolierte Alpha-Kette sowie intaktes Hämoglobin ebenfalls als Stammzellinhibitoren aktiv sind. Aktive Zubereitungen enthalten auch Mischungen von Alpha- und Beta-Ketten (z.B. **Fig. 5**).

[0187] Die Beobachtungen, dass isolierte Alpha-Kette und/oder isolierte Beta-Kette aktiv sind, zeigen an, dass die hier beschriebenen Aktivitäten keine intakte dreidimensionale Hämoglobinstruktur benötigen. Fragmente von Alpha- und Beta-Kette sind ebenfalls als Stammzellinhibitoren aktiv.

TABELLE 8

Behandlung	% tot
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-1α 200 ng/ml	13

¹NBM = normales Knochenmark

²TPBM = Knochenmark von Testosteron-behandelten Mäusen

³Hbg = C₄-Umkehrphase-gereinigte Schweinehämoglobin-Betakette (erhalten von 2X kristallisiertem Schweinehämoglobin)

TABELLE 9

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	43
Schweine-Alphakette ²	-4
Schweine-Betakette ²	-14

¹Kontrolle – Knochenmark von Balb/c-Mäusen

²100 ng/ml (gereinigt wie in Fig. 21)

Beispiel 15: Gereinigtes INPROL gereinigtes Schweine-Alphahämoglobin oder gereinigtes Schweine-Betahämoglobin sind in vivo aktiv

[0188] Um die Fähigkeit von gereinigten Schweinehämoglobinketten zur Wirkung in vivo zu testen, wurde BDF₁-Mäusen Testosteronpropionat, wie in Beispiel 1 beschrieben, injiziert. 24 Stunden später erhielten die Mäuse 500 ng von entweder pINPROL, Schweinehämoglobin-Alphakette (gereinigt von peripheren, roten Blutzellen, wie in **Fig. 21**), Schweine-Betakette (gereinigt von peripheren, roten Blutzellen, wie in **Fig. 21**) oder das äquivalente Volumen eines Trägers intravenös. 48 Stunden später wurde das Knochenmark von jeder Maus entnommen und der CFU-MIX-Assay, wie in Beispiel 14 beschrieben, durchgeführt. Wie in Tabelle 10 gezeigt, waren sowohl pINPROL als auch Schweine-Alphakette und Schweine-Betakette in vivo aktiv und reduzierten den Prozentsatz von CFU-MIX im Zyklus auf Grundniveaus.

TABELLE 10

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	45
pINPROL ²	5
Schweine-Alphakette ²	5
Schweine-Betakette ²	-5
Grundwert ³	4

¹ Kontrolle – Knochenmark von testosteronbehandelten BDF₁-Mäusen

² 100 ng/ml

³ Grundwert – Knochenmark von unbehandelten BDF₁-Mäusen

Beispiel 16: Gereinigte menschliche Hämoglobin-Alphakette, biotinylierte menschliche Hämoglobin-Alphakette, biotinylierte menschliche Hämoglobin Betakette menschliche Hämoglobin-Gammakette und menschliche Hämoglobin-Deltakette zeigen alle Stammzellinhibitoraktivität in vitro

[0189] Humanhämoglobin wurde entweder von Sigma Chemical Corporation erhalten oder durch Standardmittel von adultem, menschlichem peripheren Blut oder Nabelschnurblut isoliert. Einzelne Ketten wurden durch Umkehrphasen-HPLC isoliert, in einer ähnlichen Weise wie oben für Schweine-Alpha- und -Betaketten beschrieben (siehe B. Masala and L. Manca, Methods in Enzymology vol. 231 pp. 21–44, 1994). Gereinigte Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltaketten wurden erhalten. Für biotinylierte Alpha- und Betaketten wurde 1 mg adultes, menschliches Hämoglobin mit 37 µg NHS LC Biotin (Pierce) behandelt, und die Ketten wurden durch Umkehrphasenchromatographie, wie oben, getrennt.

[0190] Wie in den Tabellen 11, 12 und 13 gezeigt, sind gereinigte menschliche Alpha-, biotinylierte menschliche Alpha-, biotinylierte menschliche Beta-, menschliche Gamma- und menschliche Deltahämoglobinketten alle im CFU-MIX-Zyklus-Assay aktiv.

TABELLE 11

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	49
menschliche Alphakette ²	-1
menschliche Betakette ²	41
menschliche Gammakette ²	-63

¹ Kontrolle – Knochenmark von Balb/c-Mäusen

² 100 ng/ml

TABELLE 12

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	47
menschliche Gammakette ²	12
menschliche Deltakette ²	-4

¹ Kontrolle – Knochenmark von Balb/c-Mäusen

² 100 ng/ml

TABELLE 13

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	68
menschliche Alphakette ²	19
biotinylierte Alphakette ²	7
menschliche Betakette ²	55
biotinylierte Betakette ²	25

¹ Kontrolle – Knochenmark von Balb/c-Mäusen

² 100 ng/ml

Beispiel 17: Gereinigte menschliche Alphakette, Alpha-Beta-Dimer oder Hämoglobin sind in vivo aktiv

[0191] Gereinigte menschliche Alphakette, Alpha-Beta-Dimer oder Hämoglobin wurden in einem in vivo- Assay, wie in Beispiel 15 beschrieben, getestet. Wie in Tabelle 14 gezeigt, war jedes davon bei einer Konzentration 500 ng/Maus aktiv.

TABELLE 14

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	49
menschliche Alphakette	-22
menschliches Alpha-Beta-Dimer	14
menschliches Hämoglobin	-31

¹ Kontrolle – Knochenmark von Testosteron-behandelten BDF₁-Mäusen

Beispiel 18: Schweine-INPROL ist in vitro für menschliche mononukleare oder CD34⁺ Schnurblutzellen aktiv

[0192] Um die Fähigkeit von gereinigtem INPROL aus Schweineknorpel, den Zyklus von menschlichen Vorläuferzellen zu beeinflussen, zu untersuchen, wurden Nabelschnurblutzellen erhalten. Entweder die gesamte erhaltene molekulare Zellfraktion nach der Trennung an Ficoll oder die CD34⁺-Fraktion nach Fraktionierung an Anti-CD34-Affinitätssäulen (CellPro Inc.) wurden verwendet. Die Zellen wurden 48 Stunden in vitro in Gegenwart von Interleukin 3 (IL-3) und Stammzellfaktor (SCF) (jeweils 100 ng/ml) inkubiert um sicherzustellen, dass die frühen Stammzellen im Zyklus sind. Nach dieser Präinkubation wurden Zyklus-Assays durchgeführt, wie in Beispiel 14 für die Maus beschrieben, außer dass CFU-GEMM (anstelle von CFU-MIX) am Tag 18 nach dem Plattieren gezählt wurden. Wie in Tabelle 15 gezeigt, hemmte Schweine-INPROL den Zyklus von

CFU-GEMM entweder in der Masse mononuklearer Zellen oder in der CD34⁺-Fraktion.

TABELLE 15

Behandlung	% tot
Mononukleare Zellen	
Kontrolle	93
pINPROL ¹	16
CD34 ⁺ -Zellen	
Kontrolle	41
pINPROL ¹	21

¹100 ng/ml

Beispiel 19: Gereinigtes menschliches Alphahämoglobin ist aktiv bei menschlichem CFU-GEMM

[0193] Mononukleare Zellen aus menschlichem Nabelschnurblut wurden erhalten und in IL-3 und SCF inkubiert und in einem Zyklus-Assay, wie in Beispiel 18 beschrieben, verwendet. Wie in der Tabelle 16 gezeigt, waren sowohl Schweine-iNPROL, gereinigt von Knochenmark, und menschliches Alphahämoglobin, gereinigt von peripherem Blut, in diesem Assay aktiv.

TABELLE 16

Behandlung	% tot
Kontrolle ¹	100
pINPROL ¹	-6
menschliche Alphakette ¹	-23

¹100 ng/ml

Beispiel 20: Peptide, die von menschlichen Alphahämoglobin- und von menschlichen Betahämoglobin-Sequenzen erhalten wurden, sind aktiv

[0194] Um aktive Peptidsequenzen zu identifizieren, wurde die dreidimensionale Struktur von Myoglobin (das in diesem Assay inaktiv ist) der nativen dreidimensionalen Struktur der Alphakette, die in adultem menschlichen Hämoglobin vorhanden ist, unter Verwendung eines Computermodellierprogrammes überlagert. Zwei Peptide (die die Aminosäuren 43–55 und 64–82 darstellen, welche Regionen sind, die strukturell von Myoglobin im dreidimensionalen Raum verschieden sind), wurden als Aktivität im CFU-MIX-Zyklus-Assay aufweisend identifiziert. Um sich der Schleife, die in der nativen Alphakette gefunden wurde, noch mehr anzunähern, wurde auch ein cyclisches Derivat des 43–55-Peptids (c43–55) (unter Verwendung einer Disulfidbindung) synthetisiert und als aktiv entdeckt.

[0195] Die Sequenz dieser Peptide ist wie folgt:

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

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

(wobei die beiden Cys-Reste Disulfid-gebunden sind)

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

[0196] Zwei Hemorphin-Sequenzen, Hemorphin 10 (Aminosäuren 32–41) der Betakettensequenz) und Hemorphin 7 (Aminosäuren 33–40), wurden getestet und als aktiv entdeckt:**[0197]** Die Sequenzen sind wie folgt:

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

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

[0198] Um die Aktivität dieser Sequenzen zu testen, wurde der CFU-MIX-Zyklus-Assay, wie in Beispiel 14 beschrieben, durchgeführt. Wie in den Tabellen 17–19 gezeigt, sind diese Peptide alle in diesem Assay aktiv.

TABELLE 17

Behandlung	% tot
Kontrolle	47
pINPROL ¹	0
Peptid (43-55)	
100 ng/ml	2
10 ng/ml	18
1 ng/ml	11

¹100 ng/ml

TABELLE 18

Behandlung	% tot
Kontrolle	43
Peptid (43-55) ¹	5
Peptid (64-82) ¹	9
Hemorphin 10 ¹	1
Hemorphin 7 ¹	0

¹Alle Peptide bei 100 ng/ml getestet

TABELLE 19

Behandlung	% tot
Kontrolle	47
zyklisches Peptid 43-55 ¹	0

¹getestet bei 100 ng/ml

SEQUENZLISTE

ALLGEMEINE INFORMATION:

I. ANMELDER: KOZLOV, VLADIMIR
TSYRLOVA, IRENA
WOLPE, STEPHEN D.

II. TITEL DER ERFINDUNG: INHIBITOR FÜR STAMMZELLPROLIFERATION
UND VERWENDUNGEN DAFÜR

III. ANZAHL DER SEQUENZEN: 33

IV. KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: NIXON & VANDERHYE P.C.
(B) STRASSE: 1100 NORTH GLEBE ROAD
(C) STADT: ARLINGTON
(D) STAAT: VIRGINIA
(E) LAND: USA
(F) ZIP: 2201-4714

V. COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMART: DISKETTE
(B) COMPUTER: IBM PC-KOMPATIBEL
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: MS-WORD

VI. AKTUELLE ANMELDEDATEN.

- (A) ANMELDENUMMER: PCT/US95/12268
- (B) ANMELDETAG: 30. SEPTEMBER 1995
- (C) KLASSIFIKATION:

VII. FRÜHERE ANMELDUNGSDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: US 08/535 882
- (B) ANMELDETAG: 28. SEPTEMBER 1995

VIII. FRÜHERE ANMELDEDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: US 08/316 424
- (B) ANMELDETAG: 30. SEPTEMBER 1994

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 1:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1:

Phe Pro His Phe Asp Leu Ser His Gly Ser Ala Gln Val
1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 2:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2:

Cys Phe Pro His Phe Asp Leu Ser His Gly Ser Ala Gln Val Cys
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 3:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 3:

```

Asp Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala
1           5           10           15
Leu Ser Ala

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 4:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 4:

```

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe
1           5           10

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 5:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 5:

```

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg
1           5

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 6:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 6:

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln

1

5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 7:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 7:

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 8:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 8:

Leu Val Val Tyr Pro Trp
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 9:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 9:

Leu Val Val Tyr Pro

1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 10:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 10:

Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 11:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 11:

Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 12:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 12:

Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg
1				5	

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 13:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 13:

Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln
1				5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 14:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 14:

Tyr	Pro	Trp	Thr
1			

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 15:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 4

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 4"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "Gly-NH2"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 15:

Tyr Pro Tyr Xaa
1

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 16:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 4

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 4"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "Gly-NH₂"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 16:

Tyr Pro Lys Xaa
1

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 17:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 4

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 4"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "Gly-NH2"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 17:

Tyr Pro Leu Xaa
1

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 18:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 3 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 3

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 3"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "Gly-NH2"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 18:

Pro Leu Xaa
1

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 19:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 1

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 1"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "pyroGlu"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 19:

Xaa Glu Asp Cys Lys
 1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 20:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 1

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 1"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "N-AcetylSer"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 20:

Xaa Asp Lys Pro
 1

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 21:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 3 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

IX. MERMAL:

(A) NAME/KEY: modifizierte Stelle

(B) ORT : 3

(D) ANDERE INFORMATION: / Produkt = "Position 3"

/ Bezeichnung = Xaa

/ Anmerkung = "GammaGlu"

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 21:

Gly Cys Xaa
1

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 22:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 423 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: DNA

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 22:

GTGCTGTCTC CTGCCGACAA GACCAACGTC AAGGCCGCCT GGGTAAGGT CGGCGCGCAC	60
GCTGGCGAGT ATGGTGCGGA GGCCCTGGAG AGGATGTTCC TGTCTTCCC CACCACCAAG	120
ACCTACTTCC CGCACTTCGA CCTGAGCCAC GGCTCTGCCC AGGTTAAGGG CCACGGCAAG	180
AAGGTGGCCG ACGCGCTGAC CAACGCCGTG GCGCACGTGG ACGACATGCC CAACGCGCTG	240
TCCGCCCTGA GCGACCTGCA CGCGCACAAG CTTCGGGTGG ACCCGGTCAA CTTCAAGCTC	300
CTAAGCCACT GCCTGCTGGT GACCCTGGCC GCCCACCTCC CCGCCGAGTT CACCCCTGCG	360
GTGCACGCCT CCCTGGACAA GTTCCTGGCT TCTGTGAGCA CCGTGCTGAC CTCCAAATAC	420
CGT	423

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 23:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 23:

Val Leu Ser Pro Ala Asp Lys Thr Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly Lys
 1 5 10 15

Val Gly Ala His Ala Gly Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg Met
 20 25 30

Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp Leu
 35 40 45

Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala Asp
 50 55 60

Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro Val
 85 90 95

Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala His
 100 105 110

Leu Pro Ala Glu Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys Phe
 115 120 125

Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg
 130 135 140

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 24:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 438 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: DNA

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 24:

```

GTGCACCTGA CTCCTGAGGA GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAA GGTGAACGTG      60
GATGAAGTTG GTGGTGAGGC CCTGGGCAGG CTGCTGGTGG TCTACCTTTG GACCCAGAGG      120
TTCTTTGAGT CCTTTGGGGA TCTGTCCACT CCTGATGCTG TTATGGGCAA CCCTAAGGTG      180
AAGGCTCATG GCAAGAAAGT GCTCGGTGCC TTTAGTGATG GCCTGGCTCA CCTGGACAAC      240
CTCAAGGGCA CCTTTGCCAC ACTGAGTGAG CTGCACTGTG ACAAGCTGCA CGTGGATCCT      300
GAGAACTTCA GGCTGCTGGG CAACGTGCTG GTCTGTGTGC TGGCCCATCA CTTTGGCAAA      360
GAATTCACCC CACCAGTGCA GGCTGCCTAT CAGAAAGTGG TGGCTGGTGT GGCTAATGCC      420
CTGGCCCAACA AGTATCAC                                     438

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 25:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 146 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 25:

```

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly
1          5          10          15
Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Leu
20          25          30
Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu
35          40          45
Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His Gly
50          55          60

Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn
65          70          75
Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu
85          90          95
His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys
100         105         110
Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln Ala
115         120         125
Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys
130         135         140
Tyr His
145

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 26:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 26:

```

Val Leu Ser Gly Glu Asp Lys Ser Asn Ile Lys Ala Ala Trp Gly Lys
1      5      10      15
Ile Gly Gly His Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg Met
20      25      30
Phe Ala Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp Val
35      40      45
Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala Asp
50      55      60
Ala Leu Ala Ser Ala Ala Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala Leu
65      70      75      80
Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro Val
85      90      95
Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ser His
100     105     110
His Pro Ala Asp Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys Phe
115     120     125
Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg
130     135     140

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 27:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 146 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 27:

```

Val His Leu Thr Asp Ala Glu Lys Ala Ala Val Ser Cys Leu Trp Gly
1          5          10          15
Lys Val Asn Ser Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Leu
20          25          30
Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Tyr Phe Asp Ser Phe Gly Asp Leu
35          40          45
Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Ala Lys Val Lys Ala His Gly
50          55          60
Lys Lys Val Ile Thr Ala Phe Asn Asp Gly Leu Asn His Leu Asp Ser
65          70          75          80
Leu Lys Gly Thr Phe Ala Ser Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu
85          90          95
His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Met Ile Val Ile
100         105         110
Val Leu Gly His His Leu Gly Lys Asp Phe Thr Pro Ala Ala Gln Ala
115         120         125
Ala Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Thr Ala Leu Ala His Lys
130         135         140
Tyr His
145

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 28:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 28:

```

Val Leu Ser Ala Ala Asp Lys Ala Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly Lys
1           5           10           15
Val Gly Gly Gln Ala Gly Ala His Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg Met
20           25           30
Phe Leu Gly Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asn Leu
35           40           45

Ser His Gly Ser Asp Gln Val Lys Ala His Gly Gln Lys Val Ala Asp
50           55           60
Ala Leu Thr Lys Ala Val Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala Leu
65           70           75           80
Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro Val
85           90           95
Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala His
100          105          110
His Pro Asp Asp Phe Asn Pro Ser Val His Ala Ser Leu Asp Lys Phe
115          120          125
Leu Ala Asn Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg
130          135          140

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 29:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 146 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 29:

```

Val His Leu Ser Ala Glu Glu Lys Glu Ala Val Leu Gly Leu Trp Gly
1           5           10           15
Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Leu
          20           25           30
Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu
          35           40           45
Ser Asn Ala Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His Gly
          50           55           60
Lys Lys Val Leu Gln Ser Phe Ser Asp Gly Leu Lys His Leu Asp Asn
65           70           75           80
Leu Lys Gly Thr Phe Ala Lys Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Gln Leu
          85           90           95
His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Ile Val Val
          100          105          110
Val Leu Ala Arg Arg Leu Gly His Asp Phe Asn Pro Asp Val Gln Ala
          115          120          125
Ala Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys
          130          135          140
Tyr His
145

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 30:

I. SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 23 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 30:

```

Val His Leu Ser Ala Glu Glu Lys Glu Ala Val Leu Gly Leu Trp Gly
1           5           10           15
Lys Val Asn Val Asp Glu Val
          20

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 31:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 31:

```

Val Leu Ser Ala Ala Asp Lys Ala Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly Lys
1           5           10           15
Val Gly Gly Gln
                20

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 32:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 32:

```

Phe Pro His Phe Asn Leu Ser His Gly Ser Asp Gln Val Lys
1           5           10

```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NR. 33:

I. SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

II. MOLEKÜLART: Peptid

XI. SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 33:

```

Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg
1           5

```

Patentansprüche

1. Peptid mit der Sequenz

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

2. Zyklisches Peptid mit der Sequenz

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

worin die zwei Cys-Reste eine Disulfidbindung bilden, oder durch eine Kohlenbrücke vereint werden.

3. Peptid mit der Sequenz

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

4. Verwendung eines der Peptide der Sequenz:

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,

(worin die zwei Cys-Reste eine Disulfidbindung bilden, oder durch eine Kohlenbrücke vereint werden),

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,

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

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

Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp,

Leu-Val-Val-Tyr-Pro,

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

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

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

Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln

und

Tyr-Pro-Trp-Thr,

für die Herstellung eines Arzneimittels für die Hemmung der Stammzellenproliferation.

5. Verwendung einer wachstumstimulierenden INPROL-Menge für die Herstellung eines Arzneimittels, um das Wachstum der B-Zellen zu stimulieren, worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

6. Verwendung einer stammzellenproliferationshemmenden INPROL-Menge für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von Krebs, insbesondere von der Leukämie, oder für die Herstellung eines Arzneimittels, um die Stammzellenteilung zu hemmen, und zwar bei Säugetieren die einem stammzellenbeschädigenden oder -zerstörenden Mittel, wie einem antiviralen Mittel, ausgesetzt sind, worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

7. Verwendung einer stammzellenproliferationshemmenden INPROL-Menge für die Herstellung eines Arzneimittels für die Hemmung der Stammzellenteilung, und zwar bei Säugetieren, die einem stammzellenbeschädigenden oder -zerstörenden Mittel ausgesetzt sind worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

8. Verfahren für die ex vivo Erhaltung der hämopoetischen Stammzellen von Säugetieren, worin die hämopoetischen Zellen mit einer stammzellenproliferationshemmenden INPROL-Menge in Kontakt gebracht werden und worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

9. Verfahren nach Anspruch 6, worin die obengenannten hämopoetischen Zellen aus der Gruppe der Knochenmarkszellen, der peripherischen Blutzellen, der mobilisierten peripherischen Blutzellen und der Nabelschnurblutzellen gewählt werden.

10. Verwendung einer hyperproliferationshemmenden INPROL-Menge für die Herstellung eines Arzneimittels zur Heilung einer myeloproliferativen oder autoimmunen Krankheit, oder einer Hyperproliferation der epithelialen Stammzellen bei einem davon leidenden Säugetier, wie ein myelodysplastisches Syndrom, worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

11. Verwendung einer stammzellenbeschützenden INPROL-Menge für die Herstellung eines Arzneimittels für die unterscheidende Beschützung gegen Chemotherapie oder Strahlungen der normalen Stammzellen und nicht der krebsartigen Zellen bei einem Säugetier, worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

12. Verwendung von INPROL für die Herstellung eines Impfstoff-Adjuvans, worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

13. Verwendung einer hyperproliferationsumkehrenden INPROL-Menge für die Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung eines Säugetieres mit einer Immundepression, die durch eine Hyperproliferation der Stammzellen verursacht wird, worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

14. Verfahren für die ex vivo Durchführung einer Expansion der Stammzellen, worin hämopoetische Zellen mit INPROL und zumindest einem stimulatorischen Zytokin in Kontakt gebracht werden, und worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung die (a) INPROL und (b) zumindest eine inhibitorische Verbindung enthält, worin diese Verbindung aus der Gruppe der MIP-1 α , TGF β , TNF α , INF α , INF β , INF γ , des Pentapeptids pyroGlu-Glu-Asp-Cys-Lys, des Tetrapeptids N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, und des Tripeptids Glutathion (Gly-Cys- γ Glu) gewählt wird, und worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung die (a) INPROL und (b) zumindest eine stimulatorische Verbindung enthält, worin diese Verbindung aus der Gruppe des 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, des Erythropoetins, des Thrombopoetins, des Stammzellenfaktors und des Ligands flk2/flt3 gewählt wird, und worin der obengenannte INPROL ein Peptid ist, das wie in Anspruch 4 definiert ist.

17. Verwendung oder Verfahren oder Zusammensetzung nach irgendeinemder Ansprüche 5 bis 16, worin der INPROL aus der Gruppe von:

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,
(worin die zwei Cys Reste eine Disulfidbindung bilden),
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,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp,
Leu-Val-Val-Tyr-Pro,
Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln,
Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe,
Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg,
Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln
und Tyr-Pro-Trp-Thr

gewählt wird.

Es folgen 25 Blatt Zeichnungen

1 2 3 4 5 6

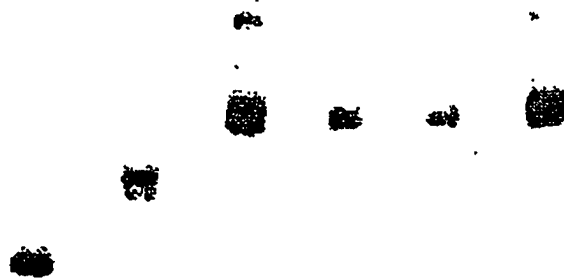


FIG. 1

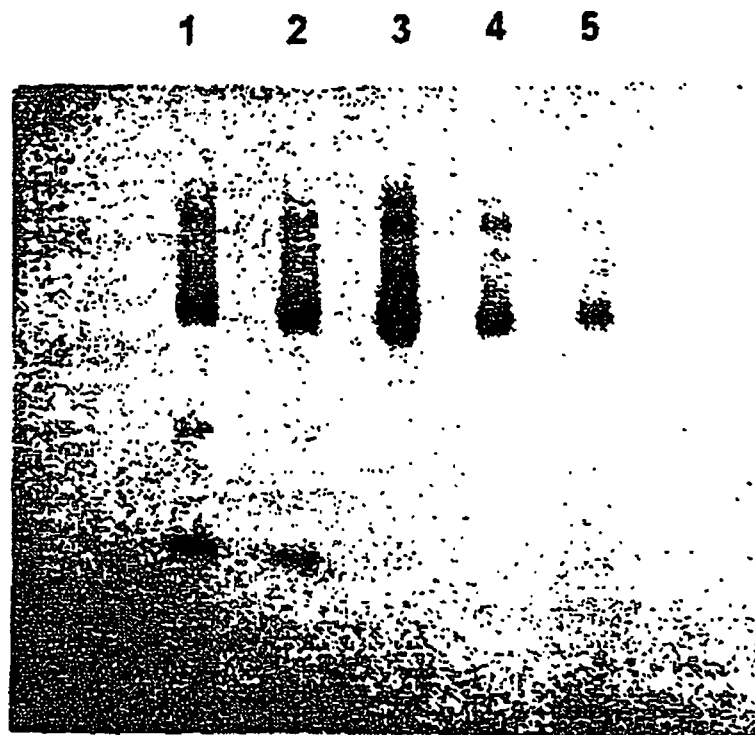


FIG. 2

1 2 3 4 5 6

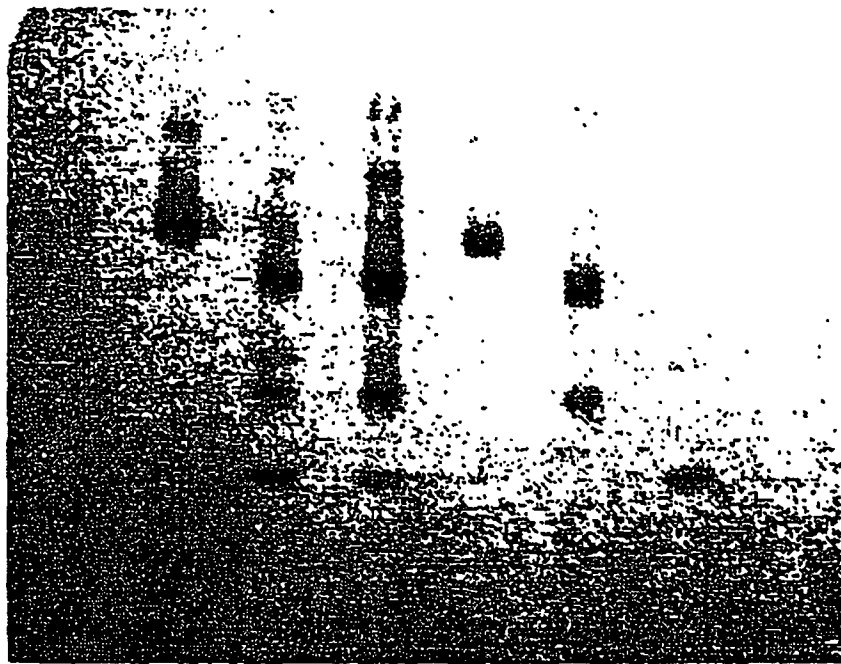


FIG. 3

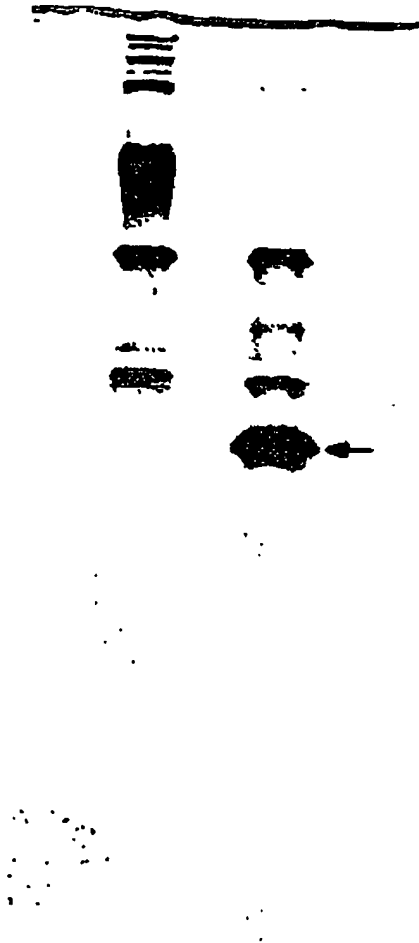


FIG. 4

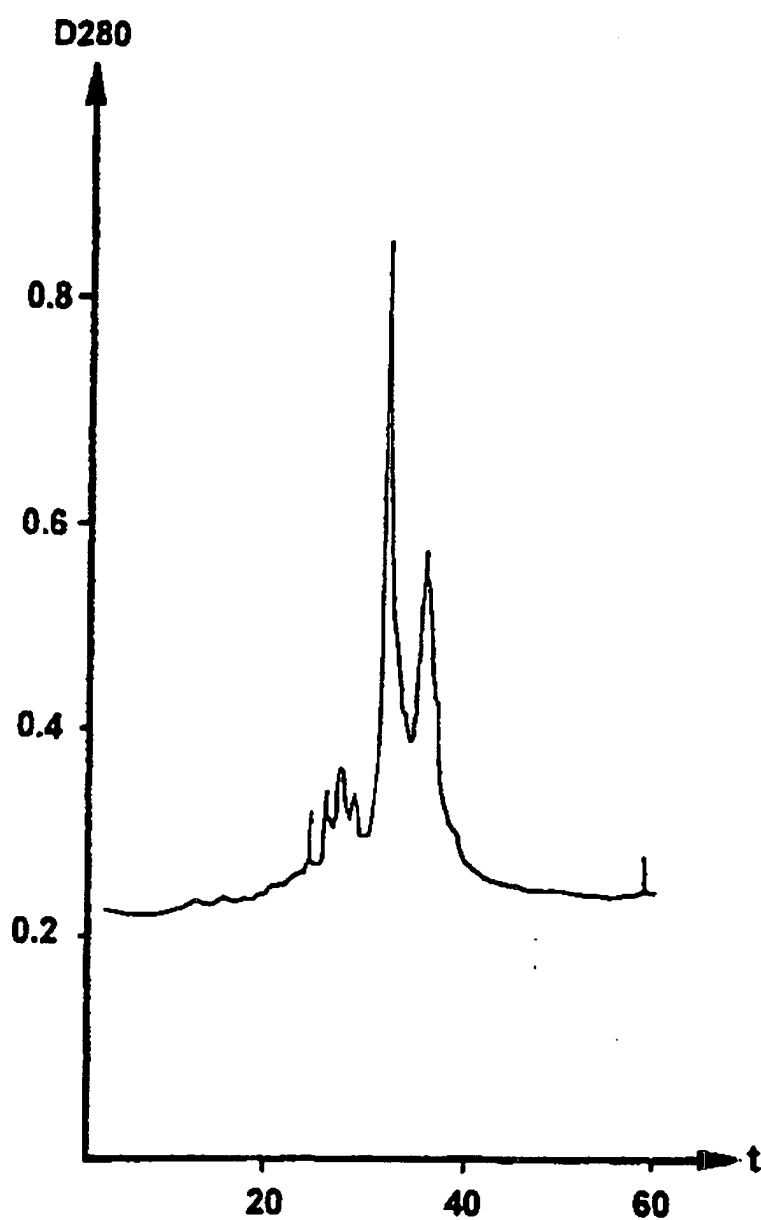
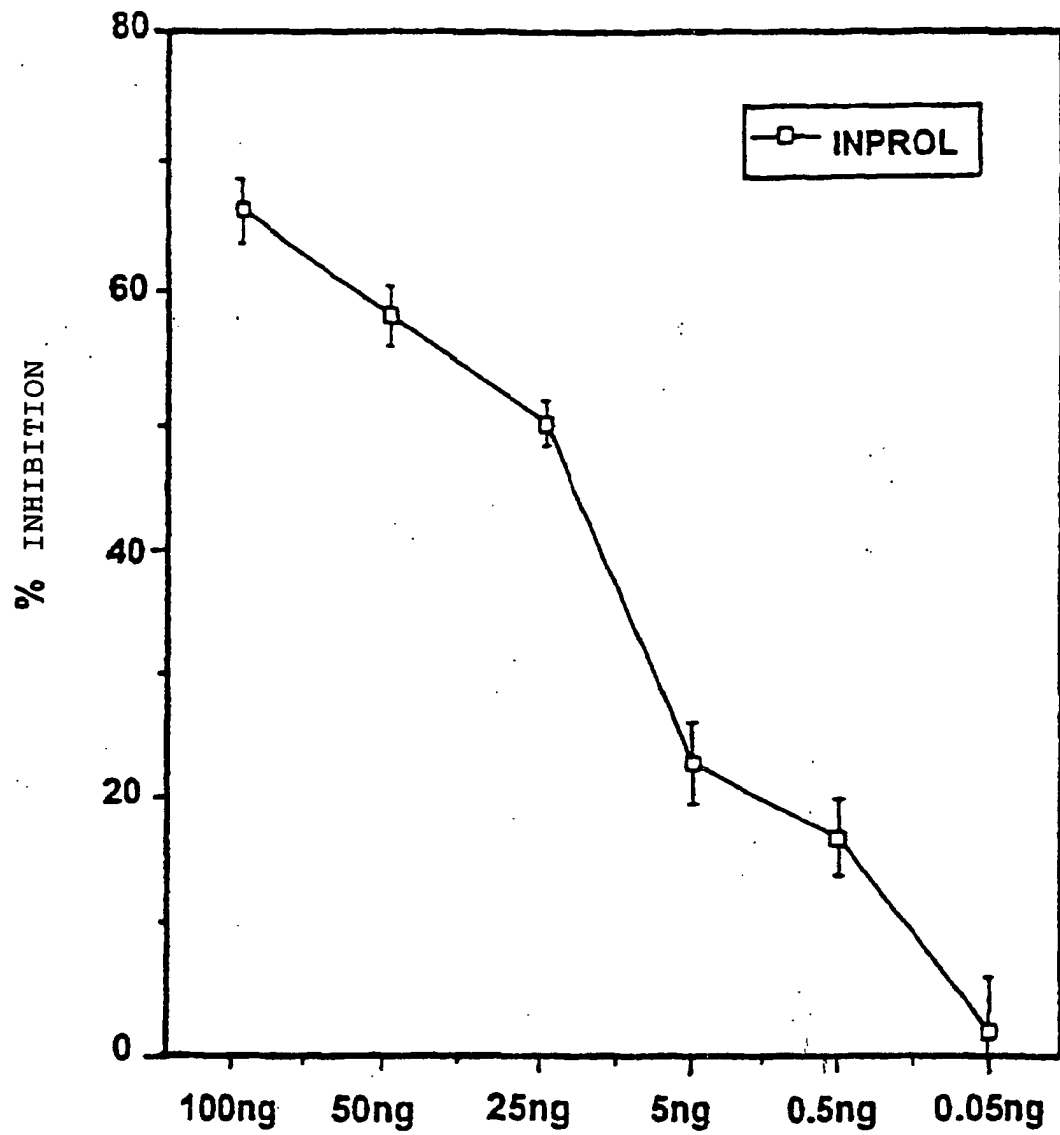


FIG. 5



DOSIS INPROL
FIG. 6

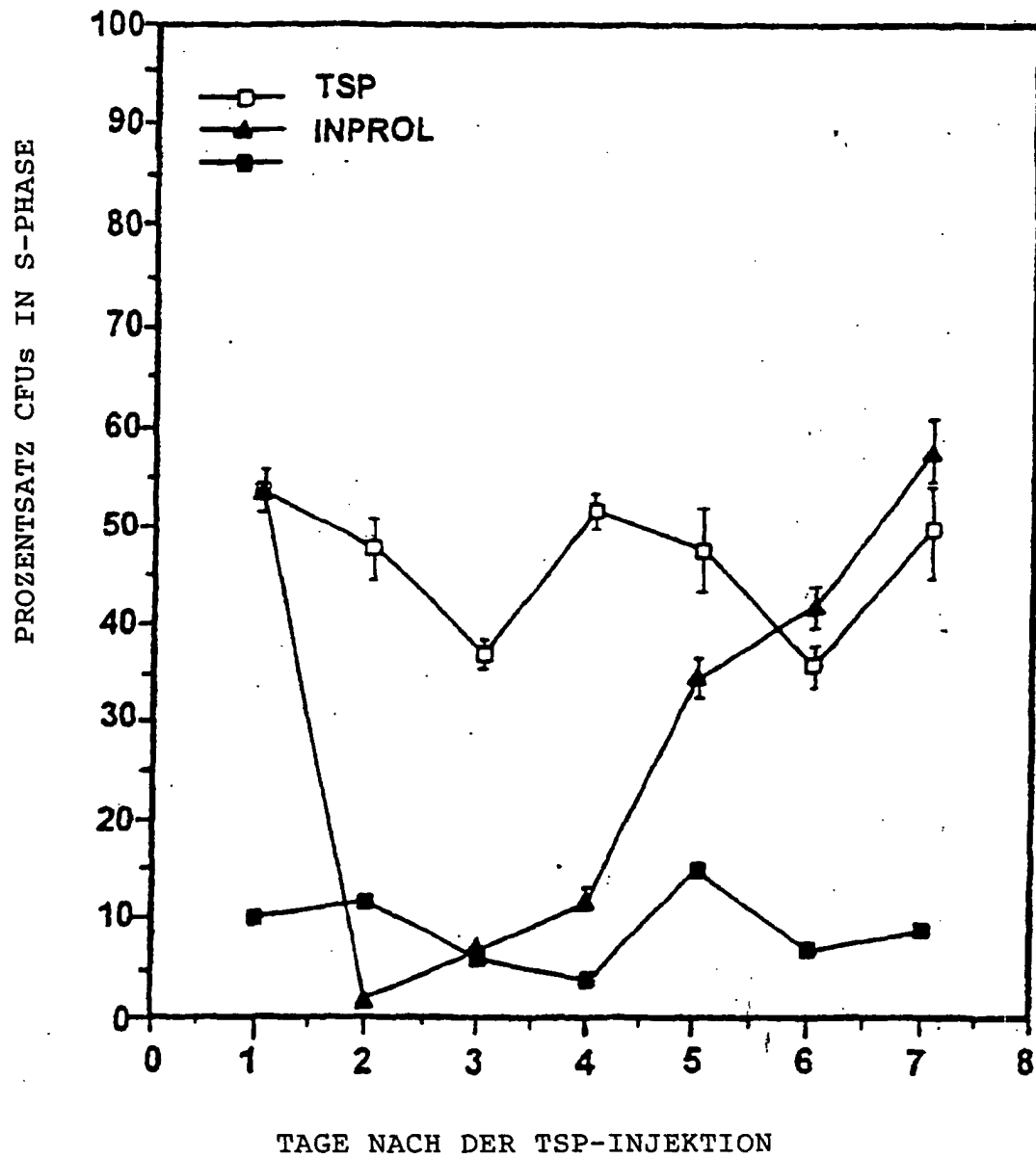
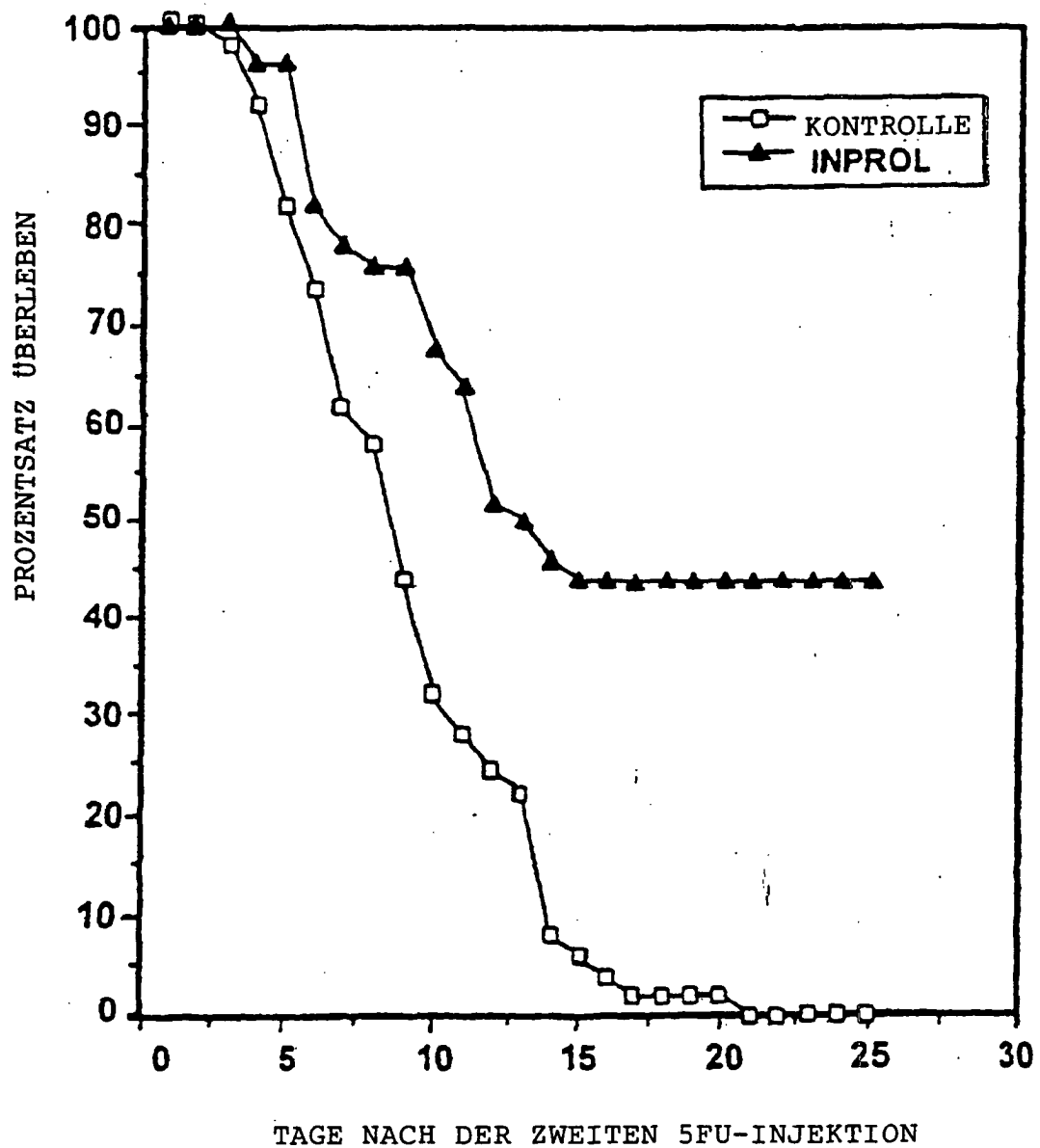


FIG. 7

FIG. 8



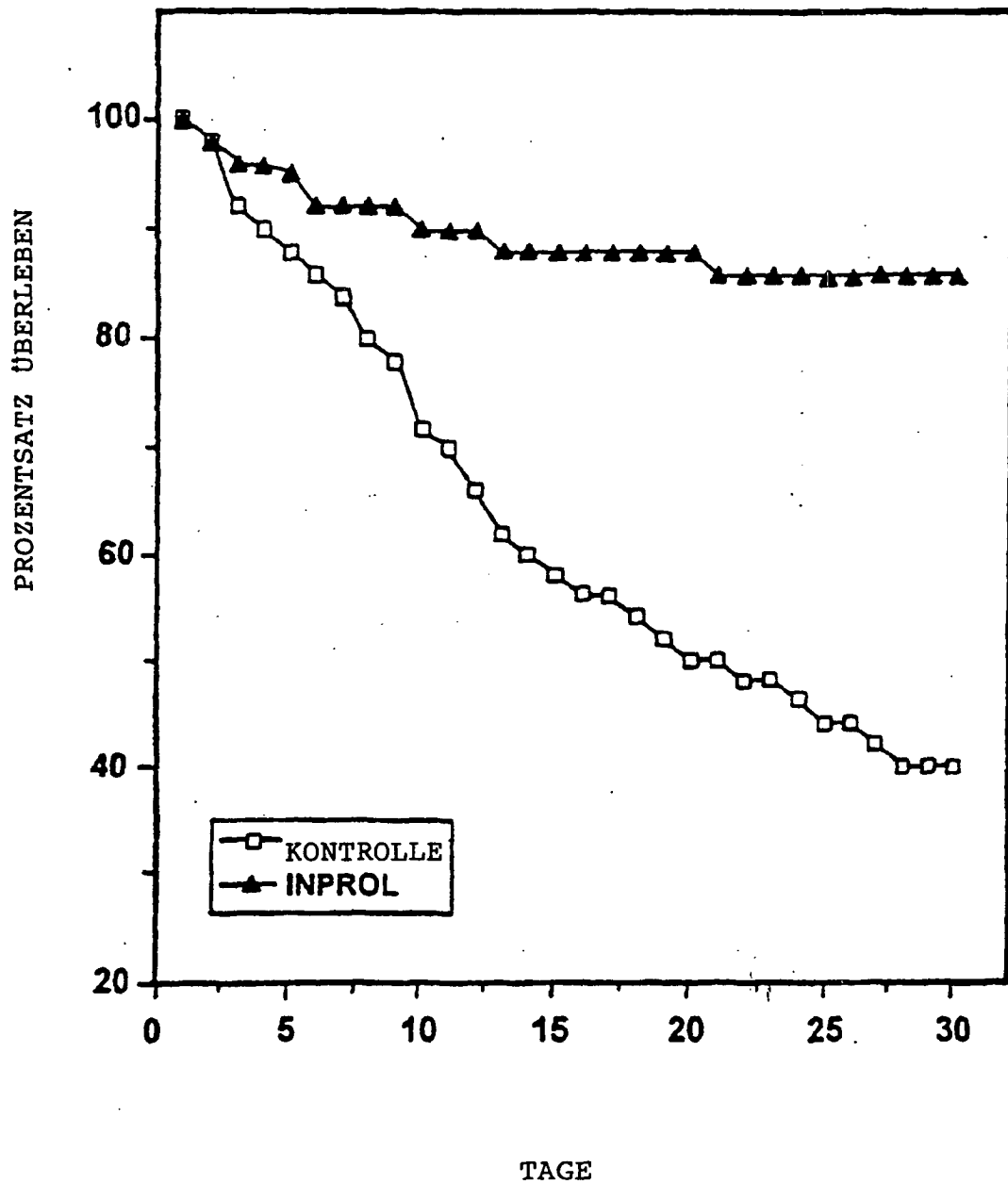
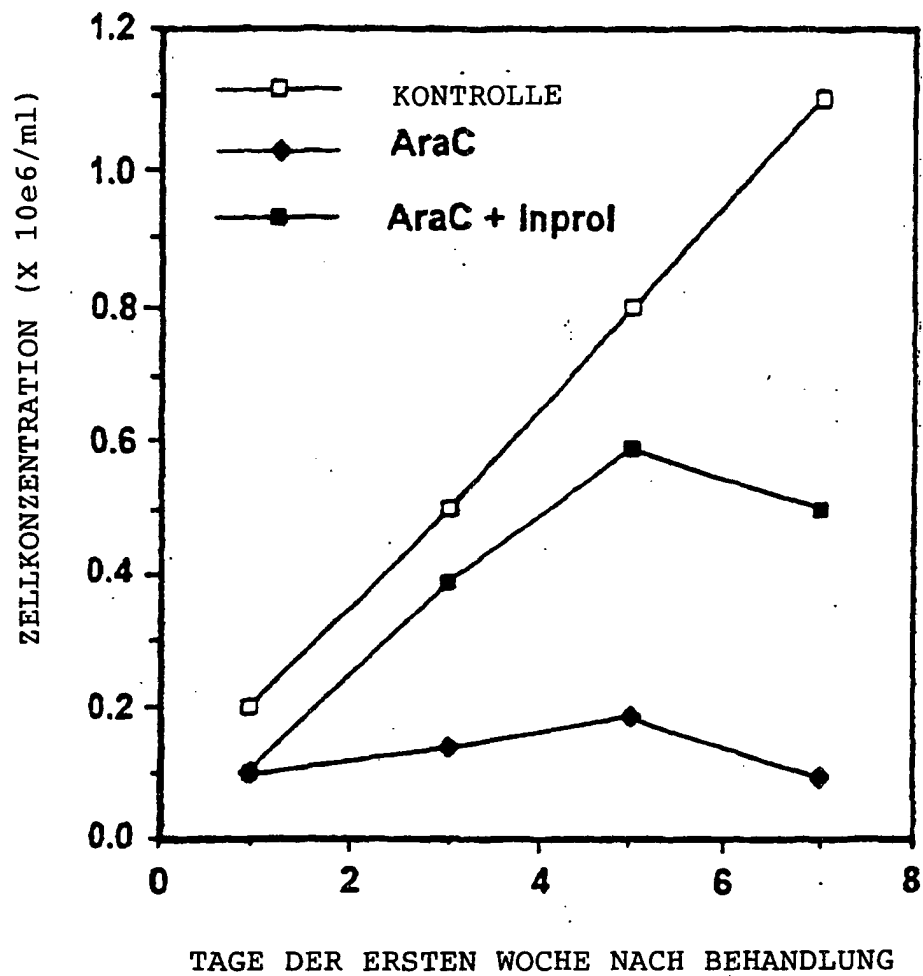


FIG. 9

**FIG. 10A**

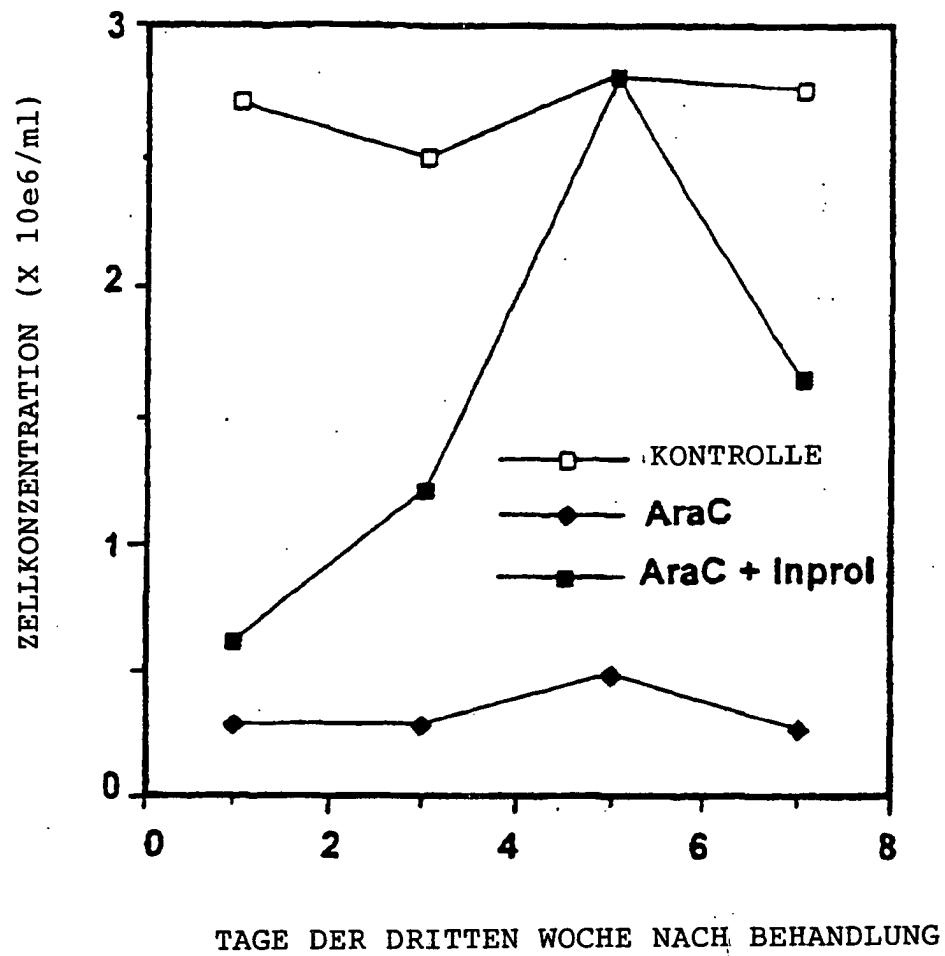


FIG. 10B

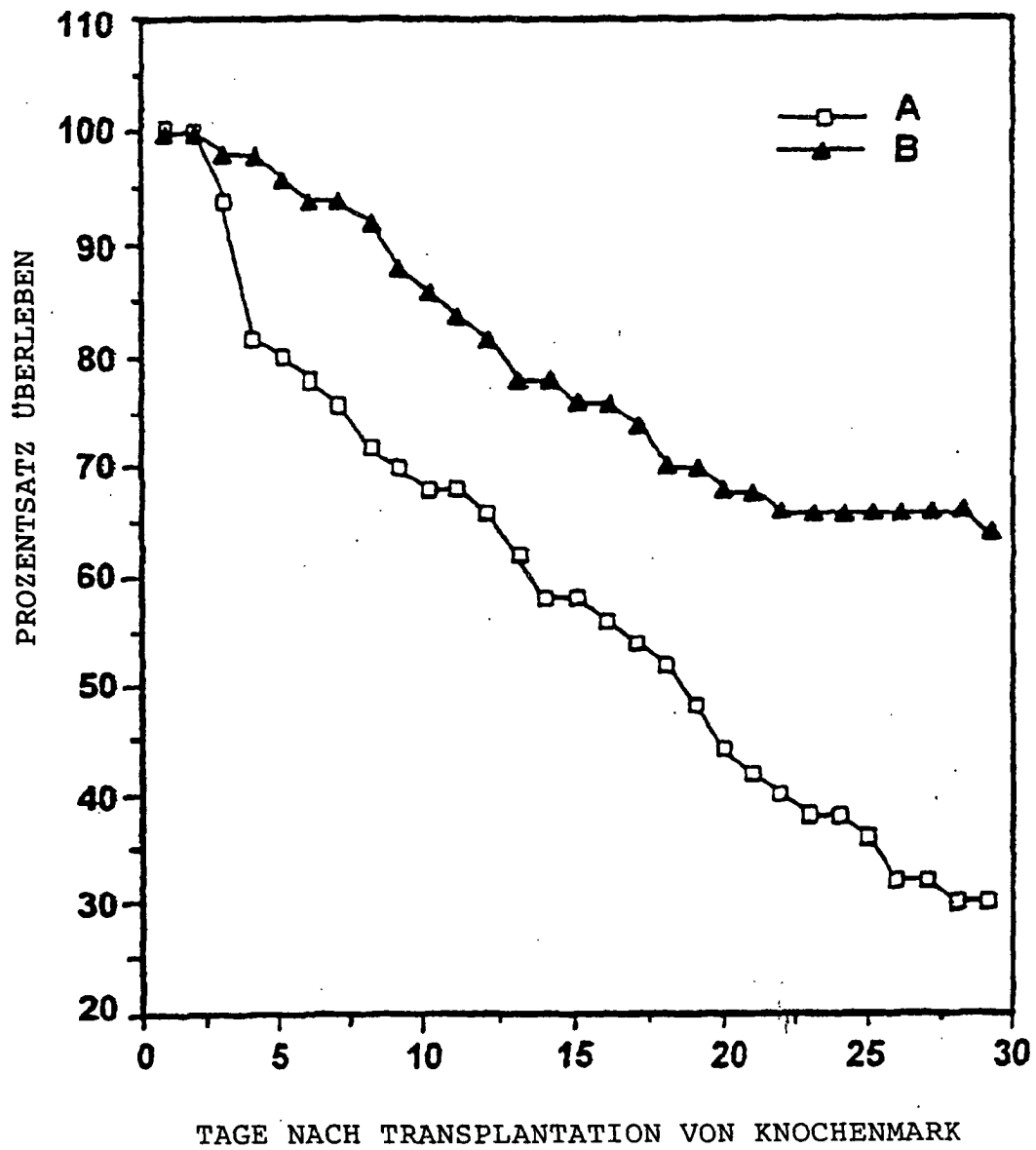


FIG. 11

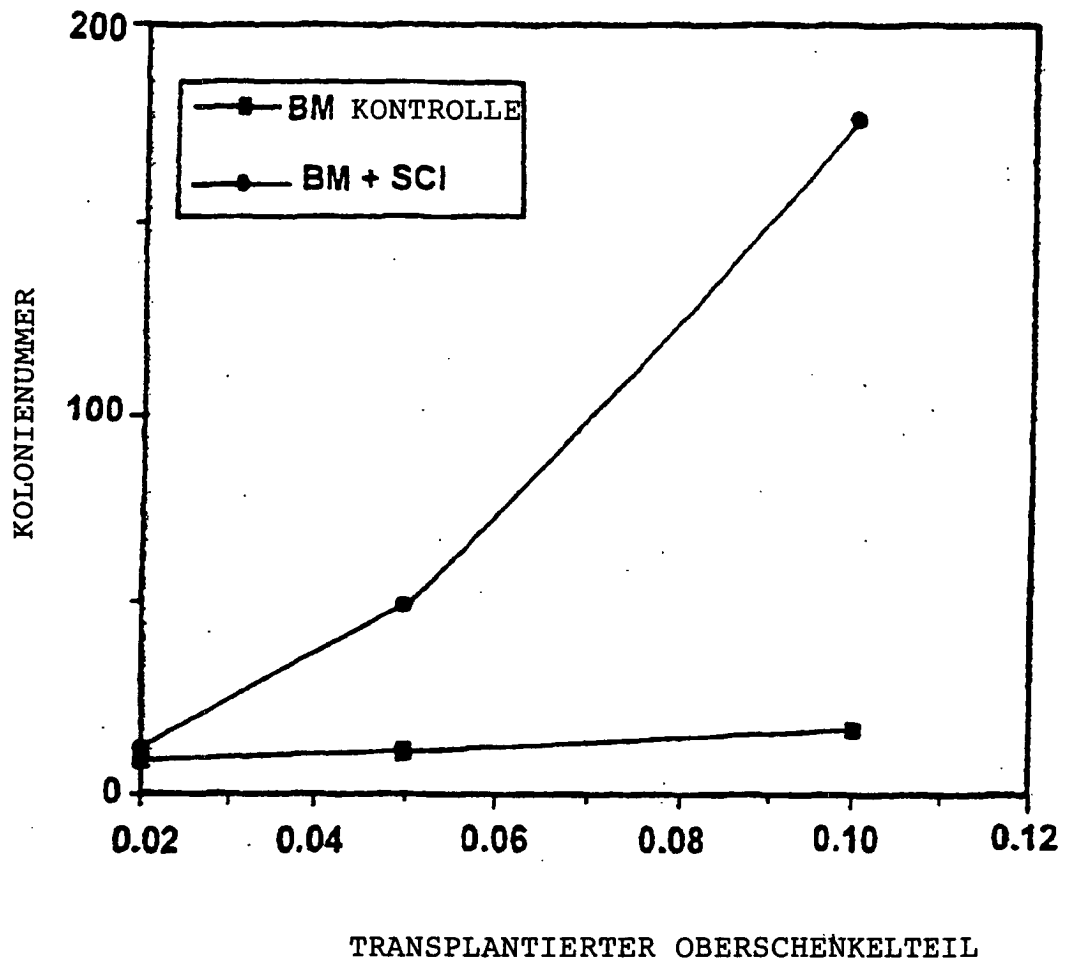


FIG. 12

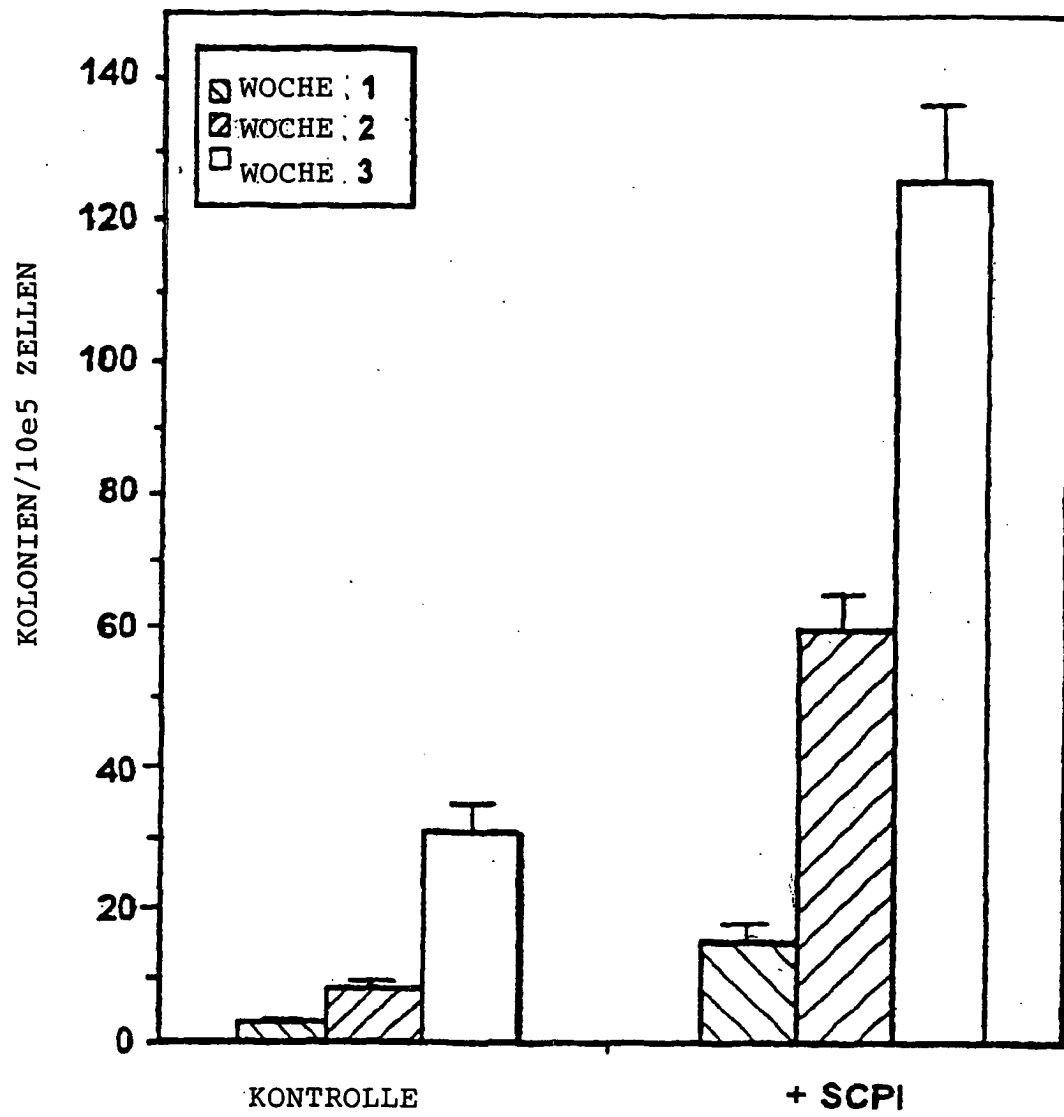


FIG. 13

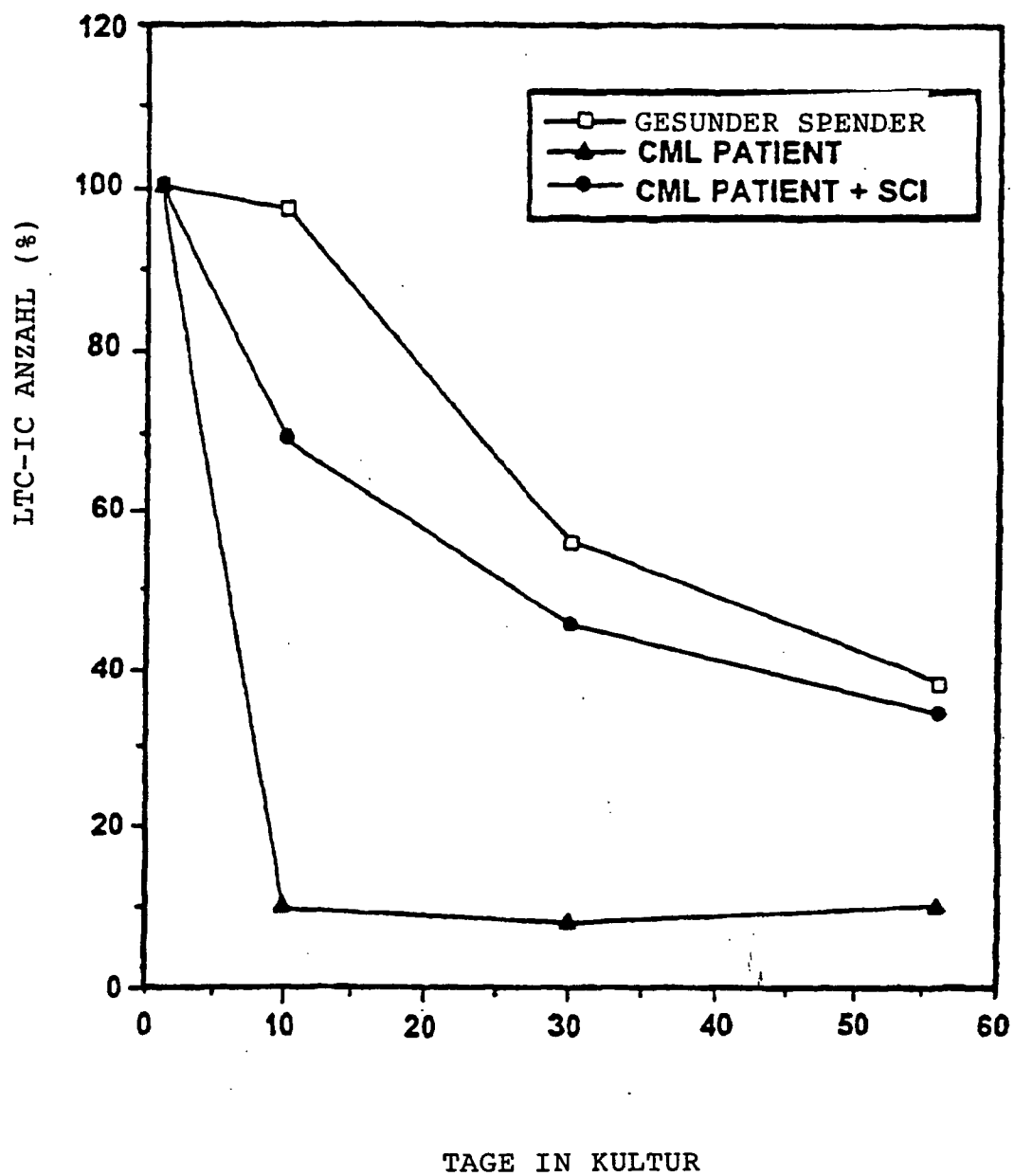
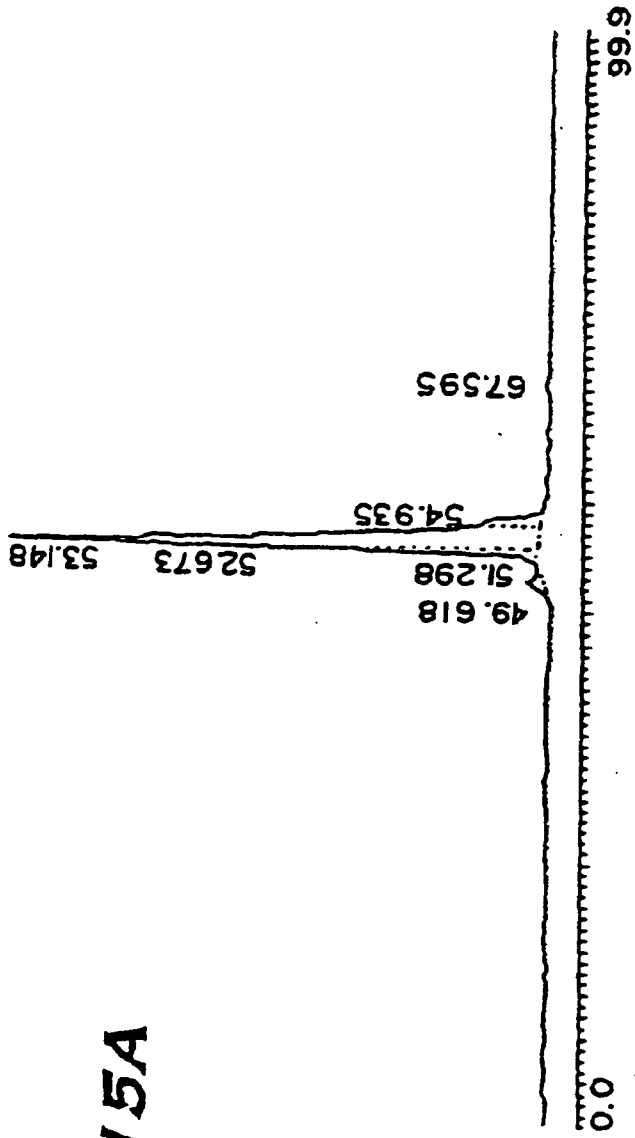


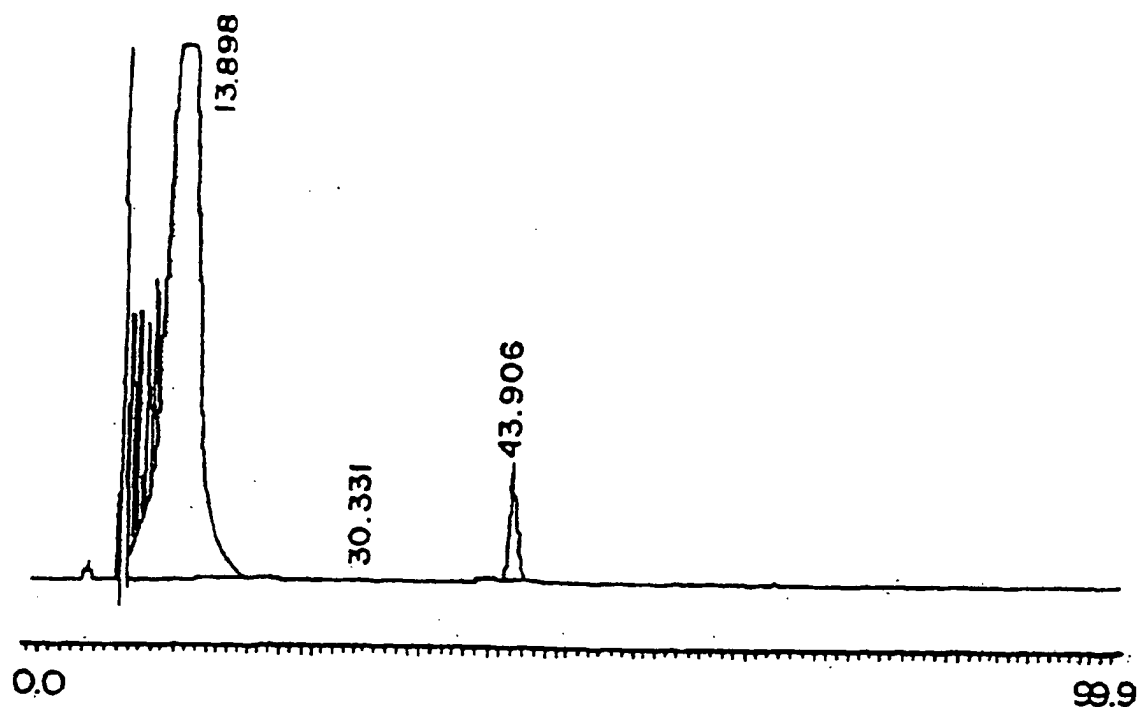
FIG. 14

FIG. 15A



ANALYSE: KANAL A

Peak Nr.	Zeit	Typ	Höhe (µV)	Fläche (µV-sec)	Fläche %
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
GESAMTFLÄCHE				18443409	99.996



ANALYSE: KANAL A

Peak Nr.	Zeit	Typ	Höhe (μY)	Fläche (μY-sec)	Fläche-%
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

FIG. 15B

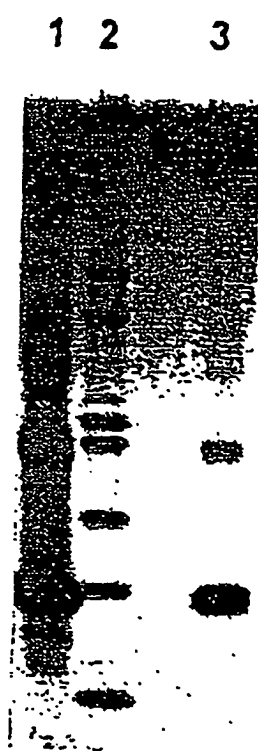


FIG. 15C

FIG. 16A

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

FIG. 16B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val
 CIG CAC CIG ACT CCT CAG CAG AAC TCT CCC GCT ACT CCC CIG TGG GGT AAC CIG AAC CIG

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

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

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

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

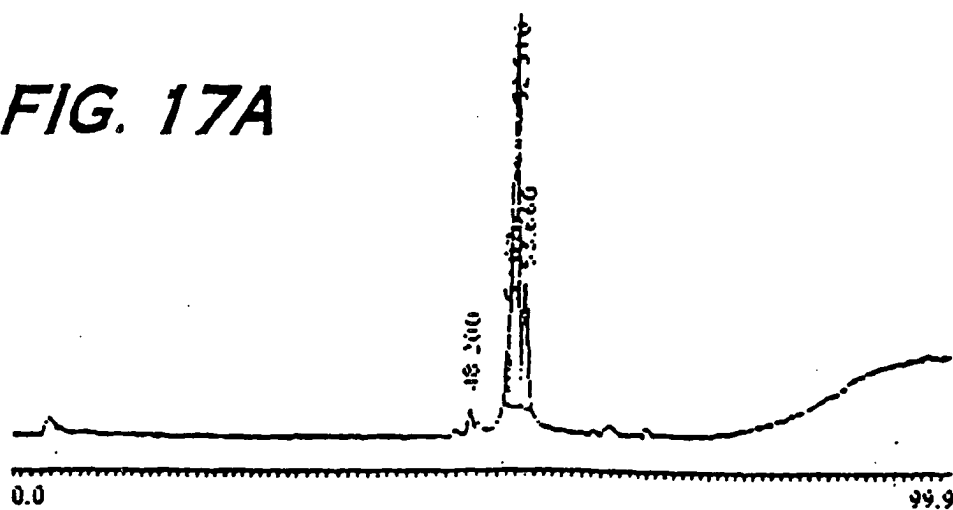
101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
 Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys
 CAG AAC TTC ACC CIG CIG GGC AAC CIG CIG CIG TGT CIG CIG GGT CAT CAC TTT GGC AAA

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

141 142 143 144 145 146
 Leu Ala His Lys Tyr His
 CIG GGC CAC AAG TAT CAC

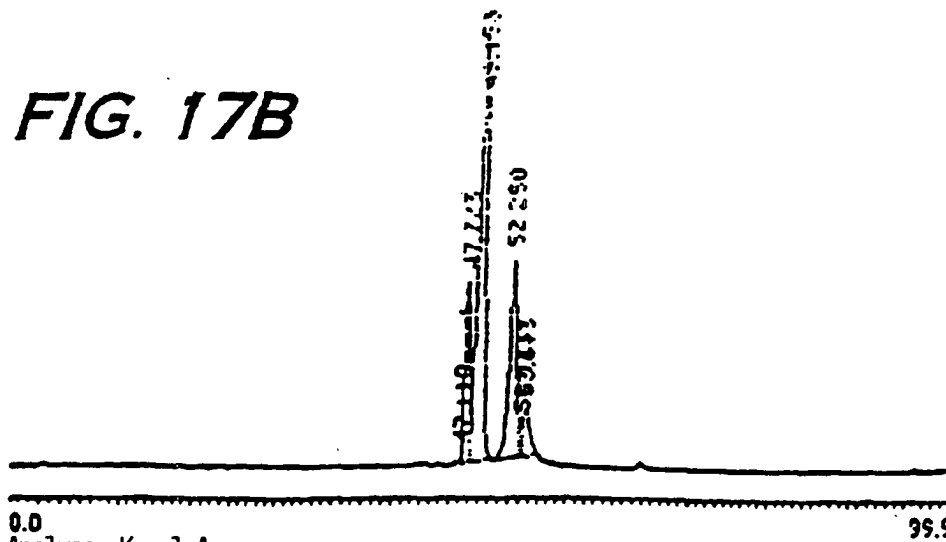
FIG. 16C

hHemA . pep	1	V	L	S	P	A	D	K	I	N	20	V	K	A	G	K	V	G	A	30	H	A	G	E	G	E	A	40	L	E	R	M	E	L	S	E	50	T	T	K	T	F	P	E	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
hHemB . pep	1	V	H	L	P	E	E	K	S	A		V	I	A	L	K	K	V	--	N	V	D	E	V	G	E	E	A		L	E	R	M	E	L	S	E	50	T	T	K	T	F	P	E	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
mHemA . pep	1	V	L	S	G	E	D	K	S	N		I	K	A	V	G	N	I	G	30	H	C	A	S	I	G	E	E	A		L	E	R	M	E	L	S	E	50	T	T	K	T	F	P	E	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
mHemB . pep	1	V	H	L	D	A	E	K	A	A		V	S	C	L	K	K	V	S	40	L	E	--	E	V	G	E	E	A		L	E	R	M	E	L	S	E	50	T	T	K	T	F	P	E	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
pHemA . pep	1	V	L	S	P	A	D	K	A	N		V	K	A	G	K	V	G	G	30	H	A	G	H	G	E	E	A		L	E	R	M	E	L	S	E	50	T	T	K	T	F	P	E	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
pHemB . pep	1	V	H	L	S	A	E	E	K	E	A		V	L	G	L	K	K	V	40	L	E	--	E	V	G	E	E	A		L	E	R	M	E	L	S	E	50	T	T	K	T	F	P	E	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
hHemA . pep	51	D	L	S	H	--	--	G			60	S	A	Q	V	K	G	H	G	K	70	V	A	D	A	L	T	N	--																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		

FIG. 17A

Analyse: Kanal A

PeakNr.	Zeit	Typ	Höhe (µV)	Fläche (µV-sec)	Fläche %
1	48.200	N	1677	20458	1.575
2	52.076	N1	7626	116395	8.631
3	52.510	N2	32010	861490	65.369
4	53.560	N3	10066	330153	24.485
Totale Fläche				1340474	99.958

FIG. 17B

Analyse: Kanal A

PeakNr.	Zeit	Typ	Höhe(µV)	Fläche(µV-sec)	Fläche%
1	47.110	N1	1727	24840	0.204
2	47.723	N2	75067	1738939	14.321
3	49.152	N3	189795	6206410	51.114
4	52.250	N1	81476	3046748	25.092
5	53.113	N2	13195	202166	1.664
6	53.613	N3	19211	914754	7.535
	65.753	N	213	8066	0.066
Totale Fläche				12142123	99.996

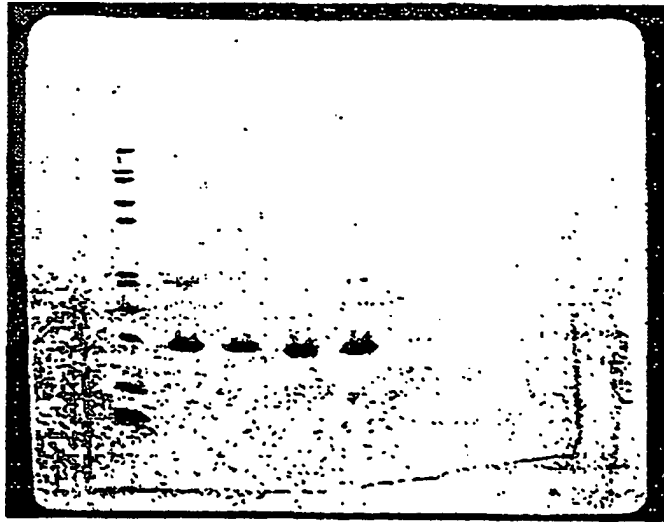


FIG. 18

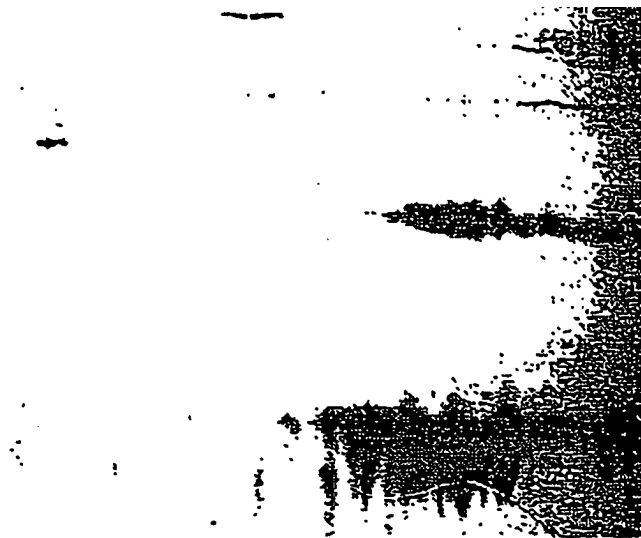


FIG. 19A

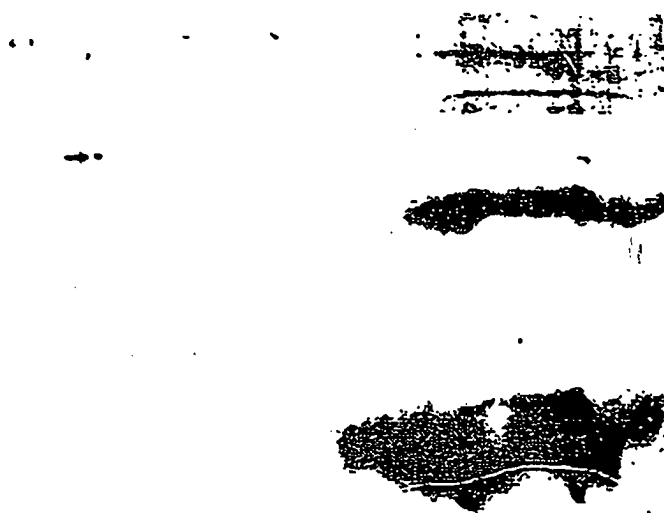


FIG. 19B

FIG. 20

