[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07K 14/475
C07K 1/36
C07H 21/04 A61K 38/18
A61K 39/00

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94192220.0

[45]授权公告日 2002 年 8 月 21 日

[11]授权公告号 CN 1089344C

[22]申请日 1994.3.29
[21]申请号 94192220.0
[30]优先权
[32]1993.3.31 [33]US [31]08/040942
[86]国际申请 PCT/US94/03349 1994.3.29
[87]国际公布 WO94/22915 英 1994.10.13
[85]进入国家阶段日期 1995.11.23
[73]专利权人 普罗神经细胞有限公司
地址 美国马利兰州
[72]发明人 V·科茨洛夫 I·特西洛瓦
[56]参考文献
WO9104274 1994. 4. 4 C07K13/00
BLOOD VOL 78,NO 1 1991. 7. 1 EAVES 等" MECHANISMS THAT REGULATE THE CALL CYCLE STATUS OF VERG PRIMITIVE HAEMAFOPOIETIC CELLIN LON
BRITISH JOURNAL OF CANCER VOL 50 1984. 1. 1
NATURE VOL. 344 1990. 3.29 GRAHAM 等," INDENTIFICATION AND CHARACFERIZAFION OF AN INHIBIFOR OF HAEMATO PUIEFIC STEM CEN PNOHFERAT
审查员 潘爱群
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 32 页 附图页数 18 页

[54]发明名称 干细胞增生的抑制剂及其应用

[57]摘要

本发明公开和要求了为调节异常的干细胞周期和加速化疗后外 周血细胞的恢复而进行干细胞抑制因子的分离和应用的方法。还公开 和要求了干细胞增生的抑制剂。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种干细胞增生抑制剂，其特征在于下列特性:

(a) 在 FDCP 混合增生抑制测定中的比活性（IC50）为 25ng/ml;

(b) SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳测得的分子量为 14,000 至 17,000 道尔顿;

(c) 用反相色谱法测得比 MIP1α或 TGFβ更具疏水性。

2. 根据权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其中所说的抑制剂是蛋白质。

3. 根据权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其中所说的抑制剂是非炎性的。

4. 根据权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其中所说的抑制剂是具热稳定性的。

5. 根据权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其中所说的抑制剂是具酸稳定性的。

6. 根据权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其中所说的抑制剂对胃肠道细胞、胃肠组织、上皮细胞、上皮组织、生殖细胞或生殖组织有活性。

7. 根据权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其中所说的抑制剂对造血细胞或组织有活性。

8. 一种药物组合物，该组合物含有权利要求 1 的抑制剂和药用载体或稀释剂。

9. 权利要求 1 的抑制剂在制备用于胃肠道外给药的药物组合物中的应用。

10. 权利要求 1 的抑制剂在制备用于抑制哺乳动物中的干细

胞分裂的药物组合物中的应用，所述哺乳动物受到能够伤害或破坏进行分裂的干细胞的药物的作用。

11. 根据权利要求 10 的应用，其中所说的干细胞增生抑制剂用于成功地维持或扩充骨髓或外周血或索血细胞的体外长时培养物中的哺乳动物造血干细胞，其目的是进行自体或异体骨髓移植或基因转移。

12. 根据权利要求 10 的应用，其中所说的干细胞抑制因子用于治疗骨髓过度增生性疾病或自身免疫性疾病中的造血干细胞过度增生或上皮干细胞过度增生。

13. 一种用下列步骤分离的权利要求 1 的干细胞增生抑制剂:

(a) 分离骨髓，从提取物中去除颗粒物;

(b) 加热所说的提取物，去除沉淀物;

(c) 酸沉淀提取物，收集沉淀物;

(d) 用反相色谱法分离所说抑制剂。

14. 一种药物组合物，该组合物含有权利要求 13 的抑制剂和药用载体或稀释剂。

15. 权利要求 13 的抑制剂在制备用于胃肠外给药的药物组合物中的应用。

16. 权利要求 13 的抑制剂在制备用于在化疗或放疗中区别性地保护正常干细胞而非白血病细胞的药物组合物中的应用。

17. 一种纯化基本上不含其它蛋白质的权利要求 1 的干细胞增生抑制剂的方法，该方法包括下列步骤:

(a) 分离骨髓，从提取物中去除颗粒物;

(b) 加热提取物，去除沉淀物;

(c) 酸沉淀提取物，收集沉淀物;

(c) 酸沉淀提取物，收集沉淀物；

(d) 用反相色谱法分离所说抑制剂。

18. 抗权利要求 1 的抑制剂的抗体。

19. 抗权利要求 13 的抑制剂的抗体。

20. 权利要求 1 的干细胞增生抑制剂，其进一步的特征是它与 MIP1α或 TGFβ有免疫学区别。

21. 一种药物组合物，该组合物含有权利要求 20 的抑制剂和药用载体或稀释剂。

22. 权利要求 20 的抑制剂在制备用于胃肠外给药的药物组合物中的应用。

说　明　书

干细胞增生的抑制剂及其应用

发明领域

本发明涉及干细胞增生抑制剂在治疗人或动物的自身免疫性疾病、衰老、癌症、脊髓发育不良、前白血病、白血病、牛皮癣或与过度增生状况有关的其它疾病时在调节干细胞周期中的应用。本发明还涉及治疗准备或正在遭遇化疗剂或其他损害循环干细胞的制剂或暴露于辐射的人或动物的方法。最后，本发明涉及为了进行自体或异体移植或基因转移而改善干细胞的维持或培养物的扩充。

发明背景

更新系统的大多数终末细胞是短寿期的，在整个寿命中必须被不断地更新替换。例如，血细胞起源于多能造血干细胞(HSC)的自我更新细胞群。因为造血干细胞是造血和免疫系统的所有成熟细胞发育所必须的，因此它们的存活对于重建受化疗剂或其它制剂治疗的个体的完整功能性宿主防御系统是不可缺少的。

造血细胞的产生受到一系列刺激造血细胞生长和分化的因子的调节，其中一些因子，例如促红细胞生成素和 G-CSF 目前已被应用于临床实践中。然而，还未被充分鉴定特征的调控网络的一部分是形成调节过程的负性支流的反馈机理(Eaves et al.Blood 78:110-117,1991).

Lord 及其同事的早期研究证明了在正常的鼠和猪骨髓提取物中存在可溶性蛋白质因子，它能可逆地抑制 HSC 的循环(Lord et

al.Br.J.Haem. 34:441-446,1976). 这一抑制性蛋白质(50-100kD)被称为干细胞抑制剂(SCI).

由原始来源中纯化该抑制因子的过程因需要大量经辐射处理的小鼠的体内检测法所固有的困难而未能完成。在克服这些问题的尝试中， Pragnell 及其同事开发研究了一种用于原始造血细胞(CFU-A)的体外检测方法，并筛选了作为抑制活性来源的细胞系。

因为较早期的研究认定了巨噬细胞作为 SCI 来源的可能性(Lord et al.,Blood Cells 6:581-593,1980)，因此选择了小鼠巨噬细胞系 J 774.2(Graham et al.,Nature 344:442-444,1990)。由该细胞系调理的培养基用于纯化，被分离的抑制性肽也被证实与以前描述的细胞因子巨噬细胞炎性蛋白质 1 - α(MIP-1 - α)相一致。因此， MIP-1 - α从细胞系而非原始材料中被分离。 Graham 等人观察到 MIP-1 - α的抗体能消除粗骨髓提取物的活性，而其他研究人员证明其它的抑制活性很重要。例如， Graham 等人(J. Exp.Med.178:925-32,1993)认为 TGF β而非 MIP-1 α是造血干细胞的初级抑制剂。此外， Eaves 等人(PNAS 90:12015-19,1993)认为 MIP-1 α和 TGF β都以次理想水平存在于正常骨髓中，产生抑制效应需要两者的协同作用。

其它的研究人员描述了另外一些干细胞抑制因子。 Frindel 及其同事从胎牛骨髓和肝脏提取物中分离出具有干细胞抑制活性的四肽(Lenfant et al.,PNAS 86:779-782,1989)。 Paukovits 等人(Cancer Res.50:328-332,1990)已鉴定了一种五肽的特征，它以单体形式存在时是干细胞循环的抑制剂，但其二聚体却是激活剂。据称还有 其它一些因子在体外对各种系统有抑制作用(参考 Wright and Pragnell in Bailliere's Clinical Haematology V.5,P723-29,1992(Bailliere Tinadall, Paris)).

到目前为止，这些因子无一被证实能应用于临床。然而，临床治

疗中需要有效的干细胞抑制剂. 与化疗或放疗有关的主要毒性在于正常的增生细胞的结构遭到破坏, 从而导致骨髓抑制或胃肠道毒性. 有效的干细胞抑制剂能够保护这些细胞, 因而使得这些治疗方案达到满意的效果. 正如根据临床情况证实了需要各种有刺激作用的细胞因子(如 G-CSF 、 GM-CSF 、促红细胞生成素、 IL-11), 也很有可能需要各种抑制因子满足不同临床需要.

I.癌症的化疗和放疗

对刺激性生长因子进行生产性研究导致了许多这些因子(促红细胞生成素、 G-CSF 、 GM-CSF 等)的临床应用. 这些因子降低了与化疗和放疗相关的死亡率和发病率. 通过另一种策略即阻断干细胞进入细胞循环从而防止其毒副作用, 可帮助人们认识到所说因子对正在进行化疗或放疗的病人更进一步的临床治疗益处.

II.骨髓移植

骨髓移植(BMT)是各种血液病、自身免疫性疾病和恶性疾病的一种有效治疗方法. 细胞的体外操作目前被用于将原始干细胞扩充至适宜移植的细胞群. 该过程的优化要求: (1) 足够数量能维持长效造血重建的干细胞; (2) 除去移植物抗宿主诱导的 T 淋巴细胞; (3) 不存在残余的恶性细胞. 该过程可以通过引入一种或数种用于体外扩充的干细胞抑制剂而优化.

为了除去残余恶性细胞而用细胞毒性药物净化骨髓细胞的效果因这些化合物对正常造血细胞尤其是干细胞的毒性而受限. 这就需要在净化过程中存在对正常细胞的有效保护作用; 该保护作用可以通过用一种有效的抑制剂将干细胞调离循环而得到.

III.收获外周血干细胞

外周血干细胞(PBSC)对于骨髓的自体移植提供了诸多潜在的益处. 因肿瘤浸染或先前的放疗而不具有合适的骨髓收集部位的病人仍

能收集PBSC。血干细胞的应用排除了不能很好地耐受一般的麻醉和外科手术过程的病人的上述需要。收集血细胞所必需的除血浆技术在大多数大的医疗中心是有效的，并得以广泛使用。该方法的主要局限在于在用药物或生长因子(如环磷酰胺、G-CSF、干细胞因子)进行动员之后出现外周血干细胞正常静止状态频率低而循环状态频率高。有效的干细胞抑制剂可用于使这类细胞回复静止状态，从而防止其在分化过程中丧失。

IV.过度增生紊乱的治疗

许多疾病以过度增生状态为特征，其中失调的干细胞导致终末细胞的过度产生。这类疾病状态包括但不限于内皮细胞过度产生形成的牛皮癣和以出现肠息肉为特征的胃肠道恶化前病变。干细胞抑制剂可用于治疗这类疾病。

V.基因转移

人们将遗传信息转移至造血细胞中的能力正被用于临床实践中。对于基因治疗而言，骨髓是一个很有用的目标，这是因为它易于到达、在体外操作和处理该组织方面有广泛经验，也因为血细胞有穿透组织的能力。而且，通过在人造血系统的原始骨髓干细胞中插入功能性基因有可能矫正某些人类遗传缺陷。

无论是利用逆转录病毒载体或是基因转移的物理技术将基因导入人造血细胞，都将存在数种限制：(1) 造血组织中的低频干细胞要求开发高效的基因转移技术；(2) 更快循环的干细胞被证实对载体感染更易感，但已证实通过用生长因子刺激干细胞增生来增加感染频率将对长效基因表达产生负性作用，因为含有转基因的细胞将被迫进行不可逆性分化并丧失其自我更新的能力。这些问题可通过应用干细胞抑制剂防止分化和自我更新的丧失得以改善。

本发明概述

本发明涉及干细胞增生的抑制剂，其特征在于如下特性:

(a) 鼠集落形成脾(CFU-S)测定(参见实施例 4)中比活性(IC_{50})小于或等于 20ng/ml

(b) 分子量大于 10,000 道尔顿，小于 100， 000 道尔顿(用超滤法)

(c) 具有对胰蛋白酶降解敏感的活性

(d) 比 MIP-1 α 或 TGF β 更具疏水性，借助反相层析可从两者中分离开来(参见实施例 12)

(e) 于水溶液中在 37 ℃、 55 ℃或 75 ℃加热 1 小时后仍保留生物活性

(f)在含 1 % 盐酸的丙酮中沉淀后保留生物活性

本发明更进一步的特征及与其它待选干细胞抑制剂(如 MIP-1 α、 TGF β 及各种寡肽)的区别在于本发明的干细胞抑制剂在经过短时的预保温期之后的体外测定中能够产生抑制作用(参见实施例 5).

本发明还包括含有 INPROL 的药物组合物，它用于治疗各种紊乱。

本发明提供了一种治疗遭受某种能够杀伤或损害干细胞的制剂的个体的方法，包括向治疗对象施用有效量的干细胞抑制剂组合物。受所说方法保护的干细胞可以是通常存在于骨髓并在其中分裂的造血干细胞。另外，干细胞可以是例如肠或头皮或身体其它部位的上皮细胞或生殖器官的生殖细胞。本发明的方法适用于人体，但该方法也包括动物治疗。

另一方面，本发明提供了保护和恢复化疗病人的造血、免疫或其它干细胞系统的方法，包括给病人施用有效量的 INPROL .

另一方面，本发明提供了附属治疗任何癌症(包括以实体瘤为特征

的癌症)的方法，包括给癌症患者施用有效量的 INPROL ，以防止骨髓、胃肠道或其他器官的干细胞受到化疗或放疗的毒性作用。

另一方面，本发明涉及治疗白血病，包括用有效量的 INPROL 处理其中有增生性白血病细胞的骨髓细胞以抑制正常干细胞的增生，和用细胞毒性剂处理骨髓以破坏白血病细胞。该方法的效果可以借助利用刺激骨髓增生的其它 因子(如集落刺激因子)处理骨髓的后续方法得以提高。在一个实施方案中，该方法是于体内完成的。另外，该方法也用于体外净化和扩充进行移植的骨髓细胞。

再一方面，本发明方法涉及治疗具有由增生的干细胞所致的任何紊乱的病人。这类紊乱如牛皮癣、骨髓发育不良、某些自身免疫性疾病和老年性免疫机能降低，治疗这些紊乱是通过给治疗对象施用有效量的 INPROL 以部分抑制所说干细胞的增生。

本发明提供了可逆性地保护干细胞不受能够杀伤或损害干细胞的细胞毒性剂损伤的方法。该方法包括给遭受所说毒剂的治疗对象施用有效量的 INPROL 。

本发明在其范围内包括纯化猪 INPROL，并希望利用这类纯化的蛋白质得到用于克隆 INPROL cDNA 或基因的序列资料.

本发明还提供:

一种干细胞增生的抑制剂，它通过下列过程从猪或其它骨髓中分离(参见实施例 12):

(a) 提取骨髓，经过滤除去颗粒物

(b) 于 56 ℃热处理 40 分钟，接着冰浴冷却

(c) 在 40 ℃下以 10,000g 离心 30 分钟除去沉淀

(d) 向上清液中加入 10 个体积经搅拌的冰冷丙酮(含 1%(v/v)浓盐酸)进行酸沉淀，然后于 4 ℃保温 16 小时.

(e)于 4 ℃以 20,000g 离心 30 分钟分离沉淀物，用冷丙酮冲洗，

然后干燥

(f)用反相层析分离，监测其活性是通过观察对用 5 - 氟尿嘧啶预处理和与鼠 IL-3 一起保温的骨髓细胞的集落形成抑制作用以及读取 280nm 的吸光率和进行 SDS-PAGE .

本发明还提供:

一种基本上不含其他蛋白质的干细胞增生抑制剂的纯化方法，它包括上述步骤，同时也将在下文作更详细的描述。

本发明还提供:

一种治疗人或动物的方法，其中的干细胞增生抑制剂起改善由干细胞过度增生所致免疫抑制的作用。

本发明还提供:

一种治疗人或动物的方法，其中所说的干细胞增生抑制剂在干细胞遭受细胞毒性药物或辐射过程而被诱导增生之后施用。干细胞通常处于静止状态，但在化疗后因受刺激而进入细胞循环，这就使之对于第二次化疗更为敏感，本方法防止受到所说治疗的不利影响。

本发明还提供:

一种治疗人或动物的方法，其中所说的干细胞增生抑制剂作为佐剂在为了增加免疫应答而进行接种前或同时施用。

本发明还提供:

一种治疗接受细胞毒性药物或放射治疗的人或动物的方法，包括施用有效量的干细胞增生抑制剂以防止干细胞受到损害。

本发明描述了一种称为 INPROL 的干细胞抑制剂，它不同于现有技术中已知的那些抑制剂，如 MIP-1 α、 TGF-β、 Frindel 等人的四肽或 Paukovits 等人的五肽(参见 Wright & Pragnell,1992(在所引的文献中). 用超滤法测得 INPROL 的分子量大于 10,000 道尔顿，这使之区别于四肽及五肽。它在反相层析系统中比 MIP-1 α 或 TGF β 更具疏

水性，使之不同于这两种细胞因子。而且，它的作用方式与任何以前描述的抑制剂的区别在于，在体外测定中，当它仅在一段预保温期中应用时仍具活性。例如，MIP-1 α仅在一段预保温期中应用时则已经失效(实施例 5)。更进一步，在检测“高增生性潜能细胞(HPP-PFC)”的试验中 INPROL 具有活性，而 MIP-α则不然（实施例 6）。

附图的简要说明

图 1 - 4 表示各纯化阶段所得产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

图 5 表示终纯化的 HPLC 色谱图。

图 6 表示氚化的胸苷掺入(cpm)未用(对照 = 100 %)和用各种浓度 INPROL 处理的 FDCP-混合系细胞，所示数据是针对对照值标化过的。

图 7 表示在用丙酸睾丸甾酮(TSP)、TSP+INPROL 或载体(对照)处理小鼠之后处于细胞周期 S 期的细胞的百分数。每组包括 25 只动物(每个时间点 3 - 4 只)。

图 8 表示用二剂 5-FU 处理小鼠、用或不用 INPROL 处理小鼠的存活情况。每组包括 30 只动物。

图 9 表示用或不用 INPROL 处理被辐射过的小鼠的存活情况。每组包括 50 只动物。

图 10A 和图 10B 表示正常骨髓的长程培养细胞在用 Ara-C 或 Ara-C+INPROL 处理后 1 周(10A)和 3 周(10B)的再生情况。

图 11 表示在经致死性辐射和将 3×10^4 骨髓细胞与培养基(对照)或 INPROL(25ng/ml)一起预保温 4 小时再移植后的小鼠存活情况(每组 75 只)。存活情况监测 30 天。

图 12 表示培养来自经致死性辐射处理并用与 INPROL 或培养基一起预保温 4 小时的供体骨髓细胞进行恢复的小鼠的骨髓细胞 14 天后形成的 CFU-GM 数。

图 13 表示来自淋巴长程培养物的悬浮细胞，它们在与培养基或 INPROL 一起预保温 4 小时后每周被取出，冲洗并与 IL-7(10ng/ml)一起涂布平板。

图 14 表示用 INPROL 处理的白血病外周血细胞提高了群体重建能力。长程培养物起始细胞(LTC-IC)通过平皿接种用和未用 INPROL 处理的粘附和非粘附 LTC 细胞并在第七天对 CFU-GM 进行计数来检测。所示数据已对对照值标化。

图 15A 表示以 53 % 乙腈洗脱的、纯化的 INPROL 的 C4 反相色谱图。图 15B 表示以 43.9%乙腈洗脱的 MIP-1 α 的 C4 反相色谱图。图 15C 表示粗 INPROL 制备和经反相色谱纯化的制备物的 SDS-PAGE 色谱。

为了使本文的描述得到更充分的理解而提出了下文更详尽的描述。作为本发明举证的描述并非用于具体地限定本发明，在本领域技术人员预见之内的改变被认为落入本发明范围之中。

优选实施方案的详细描述

INPROL 可逆地抑制干细胞的分裂。具体地说， INPROL 可以有效地暂时抑制造血干细胞的分裂。因此，本发明的方法通过防止干细胞遭受因用于消除癌症或病毒感染细胞的化疗剂或辐射所致的损害而用于减轻化疗对病人的造血、骨髓和免疫系统所产生的不良的副作用。在本发明的一个实施方案中， INPROL 以足以抑制干细胞分裂的剂量施用于病人，而化疗剂对病变细胞起作用。在化疗剂执行了其功能之后，被 INPROL 抑制的干细胞在不进行进一步处理的情况下回复为分裂细胞。如果有必要增强造血的再生作用，可另外加用刺激性生长因子或细胞因子。

在典型的临床情况中，给病人施用 INPROL 是在标准的化疗或放疗前例如 4 － 60 小时用例如 0.01-1 mg/kg 的纯化或重组的 INPROL

经静脉注射或输注进行的。在本发明的另一实施方案中，用 INPROL 进行预处理可以将化疗剂或辐射的剂量提高到病人通常能够耐受的剂量之上。可以选择的是，在化疗或放疗之后应用刺激性生长因子(如 G-CSF、干细胞因子)来进一步改善造血功能的重建。

在本发明另一实施方案中，INPROL被用于制备进行移植的自体骨髓的方法中，该骨髓在体外用有效量的 INPROL 处理以抑制干细胞的分裂，然后通过给骨髓培养物施用有效量的化疗剂或辐射来净化癌细胞。对循环细胞具特异性的化疗剂是优选的。如此处理的骨髓被重新注入自体供体。可以选择的是，病人可以用已知能刺激造血的因子进行治疗以改善其造血重建功能。

在本发明另一实施方案中，INPROL被用作白血病治疗中的辅助性治疗。例如，在白血病细胞对 INPROL 不产生反应的疾病状态下，用 INPROL 体外处理白血病性骨髓细胞。正常干细胞的增生受到施用 INPROL 的抑制。因此，在用细胞周期特异性细胞毒剂处理增生的白血病细胞期间，正常的干细胞群免受损害。另外，在药物治疗或辐射治疗期间选择性地施用刺激性细胞因子(如 IL-3 或 GM-CSF)以诱导白血病细胞的循环，而正常的干细胞因用 INPROL 而受到保护。用化疗剂或辐射治疗病人以破坏白血病细胞，然后再将净化的骨髓移植入病人体内以建立造血重建功能。

类似地，在本发明另一个治疗涉及血细胞或淋巴细胞的严重病毒感染(如 HIV 感染)的病人的实施方案中，用 INPROL 在体外处理骨髓，继而再用抗病毒剂、破坏感染细胞的药物或者除去感染细胞的抗体系统处理。在经骨髓破坏性抗病毒或化疗以从病人体内根除病毒宿主细胞后，INPROL 处理的细胞被送回病人体内。

在本发明的另一个实施方案中，INPROL被用于治疗与过度增生的干细胞相关的紊乱。例如，牛皮癣是因皮肤的上皮细胞过度增生所

致的紊乱，有时用细胞毒性药物治疗．其它一些涉及干细胞增生的瘤形成前损害也适于用有效量的INPROL来完全或部分抑制干细胞的增生。为此用途，使用了含INPROL的局部或透皮释放组合物，适当的话，这可作为胃肠外给药的一种选择．在大多数白血病病例中，白血病祖代细胞是不受 INPROL 影响并因此而借助利用 INPROL 的方法(如上述方法)处理的分化细胞群。如果白血病祖代细胞非常原始，并直接对INPROL的抑制作用敏感，则可通过施用有效量的INPROL来减弱白血病细胞的增生．

利用标准技术生产针对INPROL多肽的单克隆或多克隆抗体．用可检测的标记物标记这些抗体或INPROL多肽，所说标记物中的许多类型是本领域已知的．为达到诊断的目的，再将这些被标记的INPROL或抗 INPROL 抗体用作干细胞标志直接用于病人以鉴定和分离干细胞。另外，这些被标记的多肽或抗体在体外用于鉴别骨髓制备物中的干细胞，使其在净化骨髓中的肿瘤细胞之前被除去。以类似的方法将这类标记的多肽或抗体用于分离和鉴定上皮或其它干细胞。此外，这类标记的或未标记的抗体通过INPROL活性的中和作用达到治疗性应用，或通过循环INPROL水平的检测进行诊断性应用．

如果猪因子不诱发人体免疫系统产生明显有害的抗体，那么它可以用于本发明的方法中．具有类似于INPROL活性的类似或同源人蛋白质属于本发明范围。利用标准技术，从表达重组人INPROL的人基因或cDNA文库中克隆这类蛋白质．例如，利用得自纯化蛋白质的序列信息构建寡核苷酸探针，它可以用例如 ^{32}P 标记，并用于筛选适当cDNA文库(例如从骨髓中)。另外，用抗体或用适当的功能性测定(如实施例 2 所述)从适当来源(如骨髓)的表达文库中筛选编码 INPROL的cDNA．

其它种的INPROL同源或类似物形式具有各种兽医学应用，这类

似于上述的本发明治疗性实施方案.

更进一步，干细胞抑制因子通过将循环的干细胞可逆地置于不分裂的“静止”状态而对其产生作用. 当需要刺激静止的干细胞进入分裂状态，如在癌症病人经化疗剂或辐射治疗后，可将集落刺激因子和其它造血刺激因子施用于治疗对象. 这类因子的例子包括但不限于M-CSF、CSF-1、GM-CSF、G-CSF、巨核细胞-CSF或其它细胞因子，如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14或促红细胞生成素.

具有干细胞抑制活性的INPROL多肽或活性片段，如下文所述的方案所举例说明的，利用常规的化学方法结合检测干细胞抑制活性的适当生物检测法来纯化或合成.

在本发明的一个实施方案中，治疗有效量的INPROL蛋白质或其治疗有效片段是与药用载体混合使用的. 该INPROL组合物一般是经胃肠外注射或输注来施用的. 根据需要达到的治疗效果，可以选择皮下、静脉内或肌肉内注射途径.

当全身施用时，用于本发明的治疗性组合物是不含热原质、胃肠道外给药可接受的水溶液形式. 具有适当pH、等渗性、稳定性、载体蛋白质等的药用蛋白质溶液属于本领域技术范围内. 为了在治疗过度增生性干细胞的方法中施用，含INPROL的组合物是经局部或通过透皮斑给药，以将其作用局限并优化至过度增生的区域.

在治疗将遭受细胞毒剂的个体或治疗过度增生的干细胞的方法中所牵涉到的剂量方案由主治医生根据改变药物作用的各种因素来确定，所说的影响因素如病人状况、体重、性别、病人的饮食、感染的严重程度、给药时间及其它临床因素. 一般情况下，每天的给药剂量范围是1 - 100 μ g/kg 体重INPROL蛋白质或其片段.

在治疗对象接触了细胞毒性剂或辐射之后，本发明的治疗方法可

以选择性地给病人施用一种或多种淋巴因子、集落刺激因子或其它细胞因子、促红细胞生成素、白细胞介素或生长因子，以一般性地刺激因 INPROL 的在前治疗而受抑制的干细胞(及其子代)的生长和分裂。这类可以增强造血功能的治疗因子包括 IL－1、IL－2、IL－3、IL－4、IL－5、IL－6、IL－7、Meg-CSF、M-CSF、CSF-1、GM-CSF、G-CSF 或促红细胞生成素。这些因子的剂量可以根据从其在临床试验中用于化疗或骨髓移植后促进造血功能重建的效力所得的知识来选择。这些剂量还可以调整，以补偿病人身体状况及病人所接受的化疗剂或辐射的量和类型的改变。用常规方法监测被治疗病人因施用 INPROL 所致的干细胞抑制作用的逆转进程。

在治疗白血病时，与细胞毒性药物治疗同时或在辐射治疗过程中，施用抑制正常干细胞循环的 INPROL 和白血病细胞生长的刺激剂(如 IL-3 或 GM-CSF)是有益的，利用这一方案，有可能达到正常细胞及白血病细胞的循环状态和药物敏感性之间的最大差别。

实施例 1　　体内干细胞增生抑制测定

为了检测干细胞增生，用 ^{3}H－胸苷“自杀”法(Becker et al.,Blood 26:296-308,1965)测量处于细胞周期的 S 期的 CFU 数目。

未成熟的造血祖代细胞，即脾中的集落形成单位(CFU-S)，可以通过给经致死性辐射过的小鼠静脉内注射造血细胞 8 － 12 天后观察脾中形成的肉眼可见集落来进行体内检测(Till & Mc Culloch, 1961)。

^{3}H-胸苷“自杀”法是通常所用的标准 CFU 增生测定法(Becker et al .,1965)。该方法以被放射标记的胸苷(^{3}H－胸苷)作为 DNA 前体在 DNA 合成过程中掺入细胞为基础。测试时处于细胞周期 S 期的 CFU-S 被高剂量的放射性杀伤，因而不能在脾中形成集落。因此，注射未与 ^{3}H－胸苷一起保温的细胞样品和与 ^{3}H－胸苷一起保温过的相同细胞

所形成的 CFU-S 数目之差表示原始样品中增生的 CFU-S 的百分比。

抑制剂试验可以用未被刺激动物的骨髓干细胞群进行，只要抑制剂的确作用于循环的 CFU，后者在正常小鼠的骨髓中低至 7 - 10 %。

为刺激 CFU 增生使用了苯肼(PHZ)或亚致死性辐射(Lord ,1976)。

我们根据丙酸睾丸甾酮(TSP)对 CFU 循环的刺激作用(Byron et al .,Nature 228:1024,1970)发明了 TSP 注射液，它简化了试验，不引起任何副作用。TSP 在注射后 20 - 24 小时内诱导对 CFU 增生刺激作用，至少 7 天可以观察到效果。

用于筛选抑制剂纯化过程中的级分的方法如下:

小鼠: BDF_1 或 CBF_1 小鼠品系被用于所有的测试中。

用 TSP(10mg/100g)经腹膜内注射(0.2ml/小鼠)处理供体小鼠，使在 S 期产生 30 - 35%CFU。

24 小时后，从股骨取骨髓制备细胞悬液。然后将 5 ~ 10 × 10^6 细胞/ml 的悬液与不同的对照和测试级分在水浴中于 37 ℃保温 3.5 小时，每组用 2 只试管(热和冷)。

3.5 小时后，^3H - 胸苷(1 mCi/ml，比放射 18 - 25Ci/mmole)以 200 μ l/ml 细胞悬液加入热试管中，冷试管中什么也不加，于 37 ℃继续保温 30 分钟。

30 分钟后，通过加入 10ml 含 400 μ g /ml 非放射性胸苷的冷(4 ℃)培养基来中止杀伤反应。充分洗掉细胞(洗 3 次)。

重悬细胞，并稀释至注射所需的浓度，通常是 2 - 4 × 10^4 细胞/小鼠，0.3-0.5ml。

受体小鼠分成每组 8 - 10 只，在不晚于注射前 6 小时进行辐照。

在第 9 - 12 天收获受体脾，并固定于 Tellesnitsky 溶液中，用肉眼给所形成的集落计数，再用公式计算 S 期的细胞百分数。

其中 a-无 ^3H - 胸苷的 CFU 数

b-有 ^3H - 胸苷的 CFU 数

表 4 中所示 INPROL 的测试数据表明，循环的干细胞在用 INPROL 处理后变得对 ^3H - 胸苷的作用产生抗性。对于 S 期具有特异性的细胞毒性药阿糖胞苷和羟基脲也是如此(数据未给出)。如果再用含非放射性胸苷的冷培养基洗涤被处理的干细胞，那么存活的干细胞在小鼠脾中增生，正常地形成集落。

表 4

INPROL 与骨髓细胞一起保温 4 小时过程中

对 CFU 增生 的抑制活性

组	CFU/2X-^3H-TdR	10^4 细胞+^3H-TdR	被 ^3H-TdR 杀伤的 CFU(%)
未保温	22.2 ± 2.0	13.7 ± 2.4	38.3 ± 1.7
与培养基保温 4 小时	18.7 ± 3.0	11.4 ± 1.3	43.1 ± 1.4
与 INPROL 保温 4 小时	21.2 ± 2.3	20.7 ± 2.6	2.1 ± 0.08

实施例 2　　体外干细胞增生抑制测定

利用下面的测试系统(Lord et al., in The Inhibitors of Hematopoiesis P227-239,1987)证明 INPROL 的直接作用。多谱系因子(IL-3)依赖性干细胞系 FDCP mix A4 (A4)在补充了 20 % 马血清和 10 % WEHI-3 条件培养基的 IMDM 培养基中维持，作为集落刺激性 IL-3 的来源。

用于检测增生作用的氚化胸苷掺入测定法: 维持于 10 μ l 含有 20

% 马血清和 50 % WEHI-3 CM 的培养基中的 A4 细胞(5×10^4)于 37 ℃、 5 % CO_2 条件下保温 16 小时.

一开始就加入 INPROL 或粗制 BME(级分 IV). 然后每组加入 3HtdR(50 μ l 中有 3.7 KBq,740GBq/mmole)继续保温 3 小时. 用收获的细胞检测增生水平.

$$\text{抑制作用（%）} = \frac{\text{未加 INPROL 的 cpm} - \text{加 INPROL 的 cpm}}{\text{未加 INPROL 的 cpm}}$$

图 6 说明 3H-Tdr 掺入在分级剂量的正常骨髓提取物或 INPROL 存在下培养的 FDCPmix-A4 细胞. 由此可见纯化的 INPROL 组合物比起始材料的活性至少高 1,000 倍. 接触的时间(16 小时)对于有效的抑制作用而言是一个重要的因素,它表明了对 A4 细胞系的干细胞产生直接作用的证据.

实施例 3　　体内注射的 INPROL 对 CFU 增生的抑制

作用: 剂量及作用的持续时间

对体内注射的 INPROL 的作用进行研究表明, INPROL 能有效地阻断 CFU 回复至循环中,因此,保护那些细胞免受显示出其潜在临床用途的进一步治疗的细胞毒性作用.

本实验方案有两个目的:核查 INPROL 在注入体内后对 CFU 的作用和确定 INPROL 对循环干细胞具有活性的有效持续时间.

为刺激 CFU 增生,在上面实施例 1 所述作用的基础上使用了丙酸睾丸甾酮注射液.

在第 0 天用 TSP(10mg/100g)注射 BDF1 小鼠;24 小时后每个实验组的小鼠(每组 4 只)接受剂量范围为 0 μ g、 5 μ g、 10 μ g、 15 μ g/小鼠的单剂 SCPI 腹膜内注射.

注射 SCPI24 小时后，处死小鼠，用实施例 1 所述方法检测循环 CFU 的百分数。注射 TSP 诱导了约 50 % CFU-S 进入循环，与此相比，未处理的小鼠中只有 7 %。用低至 2 μ g/小鼠剂量的 INPROL 能够抑制 TSP 诱导的增生至正常水平。

为了评估作用持续的时间，一组小鼠(每组 21 只)只用 TSP 注射，另一组则用 TSP 和 INPROL 注射(在注射 TSP24 小时后)。在一周中每 24 小时，通过从每组取 3 个供体并用所述方法(参见实施例 1)检测其骨髓中的 CFU-S 循环状况来检测 CFU-S 循环。图 7 中所示数据表明，当 TSP 的作用持续时间至少是 7 天时，单剂注射 INPROL 能使 CFU-S 处于静止状态，并维持其脱离循环不超过 48 - 72 小时。因为用于癌症和白血病化疗的大部分化疗剂在体内的半寿期较短，通常短于 24 小时，所以，根据所得数据显示的 INPROL 的作用比化疗剂(如阿糖胞苷或羟基脲)在体内具有活性的有效时间要维持得长。更重要的是，第一次(对干细胞不损害)和第二次化疗和放疗之间需要较长的间隔时间(长于 24 小时，短于 96 小时),所以于损害的 CFU 细胞毒性方法，在两次应用化疗剂或放疗的间隔过程中注射单剂 INPROL 必须足够。对于细胞毒性治疗或放疗的数次可重复性循环，可以 INPROL 作用的持续时间为根据应用同样的对策。

实施例 4　　用 5 - FU 处理后被刺激进入快速循环的大多数原始造血干细胞由INPROL保护不受第二次接触5-FU的损害

药物 5 - FU 明显地减少骨髓和淋巴部分的细胞数。因为细胞周期 S 期或之前核苷酸类似物掺入 DNA 中导致细胞死亡，所以通常认为 5-FU 是细胞周期特异性的，它快速定靶于增生细胞。小鼠骨髓的长期存活和免疫造血重建不受单剂 5 - FU 的影响；但是，据证明(Harrison et al.Blood 78:1237-1240,1991)，多能造血干细胞(PHSC)在首

剂 5 - FU 之后大约 3 - 5 天的短期时间变得易受损于第二剂 5 - FU。这可以解释为 PHSC 对于单剂 5-FU 通常循环得太慢而无效，受到首剂 5 - FU 的处理而刺激进入快速循环。我们认为利用 INPROL 能够使 PHSC 回复到慢循环状态，因而保护 PHSC 不受第二次 5-FU 处理的影响。

用于本实验的小鼠是 BDF1 雄性小鼠。用生理盐水以 10 μ g/ml 的浓度制备 5 - FU 的贮备液(Sigma)。在实验的第 0 天，每一被处理的小鼠经尾静脉接受剂量为 2mg/10g 体重的 5-FU； 24 小时后经腹膜内注射 INPROL(10 μ g/100g 体重)，第 3 天注射第二剂 5 - FU。通过监测各 30 只小鼠的实验组(用 INPROL 处理)和对照组中小鼠的死亡数进行存活研究。存活曲线示于图 8。

实施例 5　　与 INPROL 预保温相对于与 MIP-1 α 预保温对骨髓细胞的影响

本实验的目的是比较与 INPROL 和 MIP-1 α 在体外预保温对小鼠骨髓细胞的抑制性影响。

所用方法如下:

体内: BDF1 小鼠， 6 - 15 周龄，在自其股骨收集骨髓前 48 小时经腹膜内注射 200mg/kg 5FU。

体外: 对所收集的单细胞悬液计数， 5 × 10^6 细胞在有或无 Inprol 或 MIP-1 α、 5 % 马血清及加入 L-Gln 的 IMDM 培养基共 2 ml 体积于 37 ℃、 5 % CO_2 条件下保温 4 小时。然后洗细胞 2 次，重新计数。以下列终条件将其平皿接种于甲基纤维素中:

0.8%甲基纤维素

25%马血清

20ng/ml 重组的鼠 IL-3

L-谷氨酰胺(加入的)

5×10^5 细胞/ml

IMDM 培养基

平皿在 37 ℃、 5 % CO_2、 100 % 湿度保温 11 天. 计数超过 50 个细胞的集落.

组	集落数	对照的百分数
对照	31.0	100%
Inprol	21.25	68.5%
MIP-1 α	35.25	114%

实施例 6　　INPROL 抑制 HPP-CFC 增生

一种评估鼠重建的干细胞及早期祖代细胞的体外测定法是高增生潜在性集落(HPP-PFC)测定法; 其它相关的测定, 如 CFU-A 、CFU-GM 、 CFU-E 和 CFU-GEMM , 渐进地检测被限制的祖代细胞群(M.Moore,Blood 177:2122-2128,1991). 本实施例表明用 INPROL 对细胞进行预处理会抑制其增生, 而在相同的这些实验条件下 MIP-1 α 则不然。

在对 BDF1 小鼠的骨髓进行 HPP-CFC 数目测定前先用 5 - FU 处理小鼠(200mg/kg 腹膜内). 通过离心洗细胞, 再以 10^6 - 5×10^6 细胞/ml 的密度在或者不加入因子(对照)、 INPROL(25ng/ml)或 MIP-1 α (200ng/ml)的培养基中保温 4 小时, 之后, 洗细胞, 平皿接种于含 30 % FCS 的琼脂(0.3%)中, 并与 5637 和 WEHI-3B 细胞系的条件培养基合并(每一条件培养基的 7.5%, 如 Sharp 等人, 1991 推荐). 平皿接种浓度是在 60mm 平皿中达 5×10^4 细胞/ml . 在第 14 天给集落评判, 结果如下所示.

组	HPP-CFU	对照%
对照	15.5 ± 1.2	100%
INPROL	8.3 ± 0.7	53.5%
MIP-1	15.8 ± 0.9	101%

根据上述结果，当 MIP-1 α仅存在于预保温期过程中时，它不抑制大多数未成熟祖代细胞的增生。在上述条件下， INPROL 不能有效地抑制增生，这表明 INPROL 和 MIP-1 α之间的生物活性根本不同.

实施例 7　　INPROL 对恢复辐射诱导的骨髓发育不良的治疗作用

骨髓发育不良是对癌症放疗的主要限制性毒性。已证明一些生长因子(如 G-CSF 、 GM-CSF 、促红细胞生成素)能加速辐射诱导的骨髓发育不良的恢复。利用干细胞增生抑制剂保护的构思是对付造血损害的另一种补充手段.按照前文所提出的治疗方法(实施例 3 、 4)建立了小鼠的致死性辐射的模型。现有技术已知小鼠接受 9Gy 的 Co 60 10-14 后开始死亡; 到第 30 天，死亡率达到大约 50 %。该致死剂量用于我们的模型中是将其分成各 4.5Gy 的两个相继应用剂量，两次之间间隔 3 天。初步资料表明该模型的存活曲线非常接近于已知用 9Gy 的单剂辐射的结果; 而且 CFU 增生的试验表明在第一次辐照后的 24 小时 CFU 有 35 - 50 %被诱导增生。这类细胞可以受到在第二剂辐照之前施用的干细胞抑制剂的保护。

为了检查这种可能性，第 0 天小鼠接受 4.5Gy(50 只小鼠/组)， 24 小时后腹膜内注射 INPROL(2 μ g/小鼠),对照组注射生理盐水，在第 3 天给予第二剂辐射(4.5Gy).

图 9 表示在应用单剂 INPROL 后存活数的增加.模型的条件相应于治疗任何癌症的临床条件，所说的癌症包括那些以实体瘤为特征的癌症。这类治疗是通过在先后两次辐射之间给癌症病人施用有效量的

INPROL 进行的，因而使得对于癌症的治疗可以使用更大剂量的辐射。也有可能将这种疗法延伸到化疗剂。

实施例 8　　INPROL 用于自身骨髓移植

对于多种白血病(CML、AML 等)而言，骨髓移植是唯一已知的有疗效的治疗方法。在体外调理用于输注的自体 BMT 将提供不含白血病细胞的正常干细胞的潜在自体来源，它们能够重新建立受体的造血系统，以达到积极有效的治疗。

1.研究 INPROL 在 AraC 的净化过程中保持正常造血功能作用的长时骨髓培养物 L1210 白血病模型

根据 Toksoz 等人的方法(Blood 55：931－936，1980)建立长时骨髓培养物(LTBMC)，在两周中经过共同培养，白血病细胞系 L1210 被接受到上述 LTBMC 中。在所说的联合 LTBMC/L1210 培养物中存在着同时生长的正常祖细胞和白血病祖细胞，这种情形类似于白血病人的骨髓。在有或无来自 WEHI-3(一种产 IL-3 的鼠细胞系)的条件培养基情况下，使正常的集落形成单位 CFU 和白血病性 CFU 作为琼脂集落生长有可能对两者进行辨别。正常细胞在缺乏 IL-3 时会出现编程性细胞死亡，而白血病细胞在 IL-3 缺乏时能形成集落。来自 LTBMC-L1210 组合物的悬浮细胞在 IL-3 存在时每 50,000 个平皿接种细胞产生大约 150 个集落(正常的造血性克隆)，而在缺乏 IL-3 条件下生长时产生大约 70 个集落(白血病性克隆)。

净化过程如下：第 0 天从装有 LTBMC-L1210 的烧瓶中取出所有的悬浮细胞和培养基(10ml/烧瓶),代之以 2ml 含 200 μg 阿糖胞苷(AraC)的培养基(Tsyrlova et al. in Leukemia :Advances in Biology and Therapy V.35,1988)；保温 20 小时后，洗烧瓶，换成 2 ml 新鲜培养基(对照组)或含 INPROL(25ng/ml)的培养基保温 4 小时。预保温后，细胞再与 AraC（100 μg/烧瓶)于 37 ℃保温 3 小时,每组包括 4 只烧瓶。洗

LTBMC-L1210 培养物 3 次,并用新鲜的 LTBC 培养基替换; 如前对再生作用的研究一样维持培养物 3 - 4 周。

所得数据如图 10 所示. 在仅用 AraC 处理的对照培养物中未观察到细胞生长, 而在用 INPROL 进行保护的烧瓶中, 造血再生因粘附层祖细胞的增生而出现得大为迅速. 而且, 实验组的细胞当被经平皿接种于琼脂中时仅在有 IL-3 的条件下生长, 每 50,000 细胞产生大约 100CFU;在至少 4 周中未观察到白血病细胞生长, 因此, 在体外用有效量的 AraC 结合 INPROL 处理的骨髓能净化癌细胞, 而干细胞受到保护. 该疗法有可能延伸到其它形式的放疗或化疗中.

2.骨髓群体重建能力(MRA)和 30 天的放射保护作用因在体外受到 INPROL 处理而增强。

MRA 是细胞重建经致死性辐射的小鼠骨髓的能力, 连同赋予 30 天的放射保护作用的能力一起, 是对挽救骨髓抑制动物潜力的直接体内检测指标(Visser et al.Blood Cells 14:369-384,1988).

为了进行放射保护作用研究, 用 9.5Gy 辐射并用来自睾丸甾酮刺激的供体的骨髓移植来恢复。一组受体用与培养基一起预保温 4 小时的骨髓细胞恢复(对照组 A), 另一组所用骨髓细胞是与 25ng/ml INPROL 一起预保温的(B 组). 洗涤每组的细胞, 并以 30,000 细胞/小鼠移植入被辐射的动物. 存活数据如图 11 所示. 总结性说明了三个实验, 其中对照被标化为 100 %. 与 INPROL 的保温将 30 天的小鼠存活率从对照组的 36.5%提高到 61.8%.

与 INPROL 预保温所诱导的 MRA 提高可能是增强放射保护作用的机理之一. 为了检验这一假说, 根据 Visser 等人的方法(出处同前)检测 MRA . 简单地说, 用睾丸甾酮预处理供体 BDF1 小鼠, 将其骨髓与培养基或 INPROL 预保温 4 小时, 再注射到被辐射的动物体内. 第 13 天, 取自受体骨股的骨髓细胞以 3 种不同浓度(0.01 、 0.05 、

0.1 股骨当量)平皿接种于含20%马血清和 10 % WEHI-CM 的琼脂中。第 7 天的集落数表示 MRA，只要此时受体骨髓中的集落形成细胞为供体未成熟干细胞的祖代。

由图 12 可见，与 INPROL 预保温的细胞群的 MRA 大于对照组(B)。

实施例 9　　INPROL 对干细胞的抗过度增生作用能改变其分化异常

在从细胞毒性药物或放射的恢复过程中，不仅观察到 CFU 的过度增生，而且是作为正常老化的结果，这被认为是骨髓发育不良综合症(MDS)的主要特征。它伴有分化失衡，如红细胞普遍分化，同时粒细胞分化。

骨髓细胞与 25ng/ml INPROL 或培养基(对照)于 37 ℃保温 4 小时，洗涤细胞，再平皿接种于含 20 % 马血清、 2U/ml 促红细胞生成素和 10 % WEHI - CM 的琼脂中。第 7 天计数 BFU-e 和 GM-CFU 集落数。表 5 所示数据总结于 3 个实验，每组每个点取 4 只动物； 4 只平皿被接种。

由表 5 显而易见，取自未受损动物(BDF1,8-12 周龄)的正常骨髓(NBM)与 INPROL 一起保温不会改变不同类型集落的数目或比例；用 TSP 预处理的 BDF1 供体如前文所见一样(实施例 1 、 3 、 4)，表现出 CFU 增生增强，红细胞祖细胞数(BFUe 集落)的增加和 GM-CFU 的减少完全被与 INPROL 一起保温而消除。异常高的 CFU 增生水平也回到细胞周期 S 期的 10% CFU．已知 CFU 过度增生是一些对病毒性白血病诱导高度易感的小鼠品系的特性，例如 Balb/c 小鼠(表 5)，这也能在更老一些的动物中观察到(表 5)。在用 TSP 处理的 BDF1 小鼠中所见的定型祖细胞的相同重分配在 Balb/c 小鼠及 23 - 25 月龄 BDF1 中也已观察到，这些小鼠普遍具有异常高的 CFU 增生水平。通过与 INPROL 一起保温有可能矫正 CFU 增生和分化。与临床情况更相关的

是，该研究表明体内注射 INPROL(2 μ g/小鼠)将对 CFU 增生和红细胞集落(BFUe)与 GM 集落的比例改变带来影响。

表 5

INPROL 对 CFU 分化为定型祖细胞 BFUe 和 CFU-GM 的影响

骨髓供体	INPROL	被 ^{3}HTdR 杀死的 CFU(%)	BFUe	CFU-GM
BDF_1	−	12.0 ± 0.3	28.33 ± 1.91	46.22 ± 3.44
(年轻)	+	15.0 ± 1.3	22.00 ± 3.74	47.70 ± 3.72
BDF_1	−	47.1 ± 1.9	43.75 ± 1.54	24.0 ± 1.33
(老)	+	11.4 ± 0.7	15.25 ± 1.45	44.0± 7.63
用 TSP 刺激	−	53.2 ± 1.6	32.67 ± 2.44	15.71 ± 2.28
的 BDF	+	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

实施例 10　INPROL 的免疫刺激活性

已经观察到，含有高比例增生 CFU 的骨髓细胞与 INPROL 保温不仅改变 CFU 的循环，而且改变其分化，即转换有利于粒细胞和淋巴祖细胞的占优势的红细胞分化。INPROL 的这一特性因细胞毒性的化疗、放疗及伴有过度增生的干细胞紊乱及衰老的免疫抑制所产生的免疫抑制副作用而显得非常重要。

本实施例表明了 INPROL 对未成熟祖细胞分化成前 B 祖细胞的直接作用，所说的未成熟祖细胞得自根据 Wittlock & Witte 方法(Ann.Rev.Immun. 3:213-35,1985)建立的淋巴细胞长时培养物(LLTC)，该作用是通过在含 IL-7 的甲基纤维素中形成的集落检测的。

如上所述建立LLTC，并用新鲜的LLTC培养基(Terry Fox Labs., Vancouver,Canada)培养，每周二次．每周收集未粘附的细胞一次，洗涤之，使之不含任何因子，再与25ng/ml INPROL或用作对照的培养基本身一起保温4小时．之后，洗细胞，以10^5细胞/ml的浓度平皿接种于含30％胎牛血清和10ng/ml IL-7的甲基纤维素中．3周的数据如图13所示．对照中大的前B集落数随时间的增加而增加，但与INPROL预保温总是刺激集落的生长高于对照水平的4－8倍．这说明了INPROL的免疫刺激特性，它在纠正免疫缺陷状态和增强对例如接种的所需免疫应答有用．

实施例11　INPROL改善CML病人的干细胞－
长时培养物起始细胞的群体重建能力

慢性骨髓性白血病(CML)是造血干细胞致死性的恶性紊乱．用单一药物的化疗、结合化疗、脾切除术或脾放疗治疗慢性期的CML可以控制临床体征和症状，但不能显著地延长存活时间．当CML由慢性期进展到加速期，标准疗法就失效了．目前，骨髓移植是CML唯一已知的有疗效的治疗方法．用不相关的供体BMT进行治疗由于组织相容性问题而有困难．少于40％的其它合格CML病人将有适合配对的相关供体，所以自体移植是优选的．对用于输注的自体BMT进行体外调理及从生长于长时培养物(LTC)中的Ph^+病人骨髓细胞中筛选出非白血病性(Ph^-)骨髓祖细胞的能力表明了正常干细胞的潜在性自体来源，能够对CML产生积极有效的治疗效果．

在有关BMT的上下文中，造血干细细胞可定义为一种能够长期产生成熟血细胞的细胞．我们利用C.Eaves和A.Eaves开发的人LTC系统进行干细胞数的定量检测并作为临床应用的工具．这包括在预先建立的、被辐射的人骨髓粘附层上接种细胞，然后将这些培养物维持5周．终点是在这一时间的最后收集的培养物的总产克隆细胞

(Clonogenic cell)成分(粘附的 + 未粘附的). 在这些条件下，产克隆细胞的产量与初始加入的祖细胞(长时培养物初始细胞， LTC-IC) 数成线性相关；单个人 LTC-IC 的平均产量是每个 LTC-IC 产 4 个产克隆祖细胞。先前已证明当 CML 病人的骨髓在类似条件下放置，白血病性(Ph^+)产克隆细胞迅速减少，通过对 CML 病人的残留正常 LTC-IC 的定量检测有可能从由培养的自体移植物移植支持的集中疗法中选择那些可能有益的. (Phillips et al., Bone Marrow Transplantation 8:477-487,1991).

下面的方法用于检查 INPROL 对由 CML 病人外周血建立的骨髓移植细胞中的产克隆细胞(LTC-IC)数的影响。

培养物作为长时培养物被引入预辐射的基质上. 用健康供体的外周血作对照。 CML 病人的外周血细胞与或不与 INPROL(25ng/ml)预保温 4 小时，洗细胞，再置于 LTC-IC 系统中 10 天和在 LTC-IC 中平行进行 5 周。通过平皿接种粘附的和未粘附的细胞于含有适当生长因子的甲基纤维素中所得的产克隆祖细胞数来估计 LTC-IC 数(Terry Fox Laboratories, Vancouver, Canada). 生长 10 天的粘附细胞和非粘附细胞的混合物与或不与 INPROL 预保温，并置于预先建立的培养基中 8 周，在第 4 和第 8 周进行收获，以检测产克隆细胞数. 图 14 所示数据表明，在由健康的供体骨髓启动的培养的前十天没有丧失 LTC-IC，培养 5 周后大约放入的 LTC-IC 数的 30 % 依然存在。 10 天期间 CML 病人的 LTC-IC 数大幅下降至大约 8 %，进一步的保温也不能使之回复，而细胞与 INPROL 预保温将 LTC-IC 水平增至起始数的 30 %，并在 8 周中维持.

由这些初步数据所预示的 INPROL 的临床相关应用包括在选择性地提高新鲜的或培养的骨髓移植物的正常干细胞含量的对策中的应用；在增强体内残留正常干细胞恢复的对策中的应用；以及在将新遗

传物质转移到人骨髓干细胞中以进一步移植到病人体内的方案中的应用。

实施例 12　　从骨髓制备物中分离具有免疫活性的血液干细胞增生抑制剂的方法

由猪肋骨分离骨髓. 分离猪酮体的肋骨，清除肌纤维及脂肪，切成小块，用 Biophyzpribor 制造的水压平板机提取骨髓. 用 K-70 离心机以 2,000rpm 离心 20 分钟分离骨髓细胞. 然后将提取物上清分别通过 Amicon

膜(USA)XM-100、PM-30 和 PM-50 进行超滤. 根据电泳分析，产物的主要成分是白蛋白(参见图 1).

生物化学纯化过程

在纯化的每一步骤用含 0.1%SDS 的 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分析各级分的骨髓提取物和蛋白质成分.

电泳于凝胶 20Y cm 进行 5 小时. 然后用溶于乙醇: 水: 乙酸(5:5:1)的混合物中的 0.25 考马斯 CBBC250 于 20 ℃将凝胶染色 1 小时，再用几次更换的 7 % 乙酸冲洗. 向样品中加入达 7 % 的 SDS 和达 0.5-1%的巯基乙醇，上样已凝胶中之前将样品于 70 ℃保温 5 分钟.

利用抑制造血干细胞增生的方法评估产物的活性(CFU).

第一步　　用硫酸铵沉淀法纯化

用饱和度为 40 - 80 % 的 25 % 硫酸铵沉淀法纯化活性物，其选择是基于表 1 的结果.

表 1

饱和度(%)	0-40	40-60	60-80	80-100
活性(%)	~37.2-35.4)=1.8%	~37.2-1.8)=35.4%	~37.2-12.8)=24.4%	~37.2-26.1)=11.1%

确定每一步纯化之后用于试验的制备物的量与纯化的水平相一致，相当于起始产物的 2 × 10^{-2}mg．利用下面的公式计算活性。

% 改变 = % Sa - %Sb

其中 a 是对照的%S

b 是与测试级分保温后的%S

将级分脱盐，以在每次测试活性前和每一后继纯化步骤前将硫酸铵浓度降低 20 倍。

第二步．脱盐后应用第一步的不纯抑制剂，用离子交换色谱(DEAE 23 纤维素)分级分离，然后用乙酸钠缓冲液(pH6.0)梯度洗脱。

抑制剂的活性级分在 3 - 5mM 之间洗脱。

柱体积为 1 ml，洗脱速度是 4 ml/hr，用色谱仪 Millicrome 于 230nm 和 280nm 进行检测．分离表现出最高活性的级分 1(参见图 2)，在 5mM 乙酸钠缓冲液中洗脱(参见表 2)。

表 2

级分	1	2	3	4	5
活性	46.3-0 =46.3%	46.3-14.1 =32.2%	46.3-42.1 =4.2%	46.3-19.6 =26.7%	46.3-45.1 =1.2%

电泳数据表明从该级分中除去主要的蛋白质杂质 - 白蛋白(参见图 3)，这将导致额外的纯化 4 倍。

第三步．第二步中部分纯化的抑制剂直接被用于 G-75 Sephadex 柱。

柱体积为 20ml(20 × 1)，洗脱速度是 2ml/hr．洗脱缓冲液为 50mM NaCl， 10mM Tris-HCl,pH7.5．在色谱仪 Millichome 上于 230nm 和

280nm 进行检测. 分离具有最高活性的级分 5 .

表 3

级分	1	2	3	4	5
活性	42.2-19.1 =23.1%	42.2-35.2 =7.0%	42.2-21.5 =20.7%	42.2-38.8 = 3.4%	42.2-0 =42.2%

第四步 利用 Pro-REC 柱的反相色谱(Pharmacia FPLC System)在溶于含 0.1%三氟乙酸的乙腈梯度中的 10 μ g Ultrasfera 基质上进行。

分子量为 16 - 17KD 的产物的均质性等于 90%, 正如 SDS - 丙烯酰胺凝胶的分析中所见(参见图 6). 结果如图 4 所示. 用级分 5 确定活性. 产物的终产率是 5 %. 结果, 纯化后 16KD 蛋白质的总量是起始产物的 650 ng/ml . 在纯化过程中, 将产物在 70 ℃热保温数分钟, 检测发现未见生物活性丧失.

2.体内干细胞增生测定(CFU)

在给经致死性辐射小鼠静脉内注射造血细胞 8 - 12 天后, 通过其脾中形成的肉眼可见集落可以体内检测未成熟的造血祖细胞 - 脾中的集落形成单位(CFU-S)(Till & McCulloch,1961).

标准的 CFU 增生测定通常应用 ^{3}H - 胸苷 "自杀" 法(Becker et al.,1970). 该方法是基于被放射标记的 DNA 前体胸苷(^{3}H-胸苷)在 DNA 合成期间(细胞周期的 S 期)掺入细胞内. 测试时处于细胞周期 S 期的 CFU 被高放射活性杀死, 不能在脾中轻易地形成集落. 因此, 注射未与 ^{3}H - 胸苷保温的细胞样品所形成的 CFU 数与注射与 ^{3}H - 胸苷保温的相同细胞所形成的 CFU 数之差表示增生 CFU 的百分数.

抑制试验不能用来自未刺激动物的骨髓干细胞群进行, 只要抑制

剂的确作用于循环的CFU,后者在正常小鼠的骨髓中低至7 - 10%.

为刺激 CFU 增生，应用了苯肼(PHZ)刺激或亚致死性辐射(Lord,Br.J.Haem.34:441-445,1976).

根据 TSP 对 CFU 循环的刺激作用(Byron et al.,Nature 228:1204,1970),我们发明了 TSP 注射液，这简化了试验，并且不引起副作用。 TSP 在注射后 20 - 24 小时诱导 CFU 增生的刺激作用，该效果至少 7 天都能观察到.

在纯化抑制剂的过程中，用于筛选级分的方法如下:

小鼠: 所有试验过程中都用 BDF1 或 CBF1 小鼠品系.

经腹膜内注射(0.2ml/小鼠)用 TSP(10mg/100g)处理供体小鼠，以诱导 S 期 30 - 50 % 的 CFU .

24 小时后,从股骨取骨髓制备细胞悬浮液。 5 - 10 × 10^6 细胞/ml 的细胞与不同的对照和测试级分于 37 ℃水浴中保温 3 - 5 小时，每组用 2 只试管(热和冷).

3 - 5 小时后， ^{3}H-胸苷(1 mCi/ml,比活性 18 - 25Ci/m mole)以 200 μ l/ml 细胞悬浮液加入每只热试管中，冷试管中什么都不加，于 37 ℃继续保温 30 分钟.

保温 30 分钟后，加入 10ml 含 40 μ g/ml 非放射性胸苷的冷(4 ℃)培养基中止杀伤反应. 充分洗脱细胞(3 次).

重悬细胞，并稀释至注射用所需的浓度(通常 2 - 4 × 10^6 细胞/小鼠， 0.3-0.5ml).

在注射前不迟于 6 小时辐射受体小鼠(每组 8 - 10 只).

第 9 - 12 天收获受体脾，并固定于 Tellesnitsky 液中，用肉眼对集落计数. 用下列公式计算 S 期细胞的百分数:

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

其中 a - 无 ^{3}H-胸苷的 CFU 数

b - 有 ^{3}H-胸苷的 CFU 数

实施例 12B　　分离更大量 INPROL 的其它方法

初始分离

去掉新鲜猪酮体肋骨上的肌纤维和脂肪，切成片，以 1:1(w/v)浸泡于磷酸盐缓冲液中．用液压机压碎所得的混合物，将骨髓与固体骨物质分开．

收集骨髓细胞悬液，经四层粗平布滤过固体颗粒．滤液于 56 ℃保温 40 分钟，然后在冰浴中冷却至 4 ℃．以 10,000g 于 4 ℃离心 30 分钟除去被分离的沉淀，弃之．

澄清的上清液在 30 分钟内滴加至 10 倍体积搅拌的冰冷丙酮中，后者含 1 %(v/v)浓盐酸．所得混合物在 4 ℃维持 16 小时以完全形成沉淀．然后经以 20,000g 于 4 ℃离心 30 分钟使沉淀物沉降，沉降物用冷丙酮洗并干燥．

HPLC 纯化

将沉降物溶于含 5 % 乙腈(MeCN)和 0.1%三氟乙酸(TFA)的 HPLC 洗脱缓冲液 A 中，最终蛋白质浓度达 8-10 mg/ml．该溶液(0.5-0.6ml)上样于用 Polisil ODS - 300(10 μ m)装填和用相同的缓冲液 A 平衡过的 250 × 4.6 mm HPLC 柱上．

用溶于缓冲液 A 中的缓冲液 B(90 % MeCN,0.1%TFA)梯度按照下列条件以 1ml/分的流速完成洗脱过程:

时间(分)	B 的百分数
0	0
4	0
5	25
25	90

在重平衡之前用 100 % B 洗柱 5 分钟. 然后再次平衡柱子, 使其回复至初始状态, 可以上样另一部分蛋白质溶液.

在分离过程中, 于 280nm 监测柱洗脱液以检测蛋白峰. 收集含蛋白质的级分, 合并分立的各峰, 于 30 ℃旋转蒸发至干燥. 所得残余物溶于蒸馏水中, 用生物活性试验和 SDS - PAGE(14%胶, 还原条件)测定。含活性物的峰是在 70 - 80 % 缓冲液 B 中洗脱, 它含 16KD 的主蛋白带和少量由 SDS-PAGE 测定移动较快的蛋白.

对活性物的分析如图 15 所示. 500 μ g 纯化的 INPROL 上样到 C4 反相柱(Vydac)上, 用含 0.1%三氟乙酸的 5 - 95 % 乙腈线性梯度洗脱 . 于 53 % 乙腈处作为单峰洗脱出物质(图 15A). 然而, 当 250 μ g MIP-1 α(R & D Systems)在同等条件下过柱时, 它是在 43.9%乙腈处洗脱(注意: 14 % 乙腈之前较早的峰是由于检测仪中气泡造成的假象). 因此, INPROL 在相同条件下本质上比 MIP-1 α 更具疏水性. 已知 TGF-β 比在同样条件下观察到的 INPROL 以更低的浓度洗脱 (Miyazono et al .J.Biol .Chem.263:6407-15,1988).

洗脱 INPROL 物质的凝胶如图 15C 所示. 1 道是粗物质, 2 道是分子量标志物, 3 道是纯化的蛋白质. 有两条主带, 一条大约 14KD, 另一条大约 35KD . 据信 35KD 带是 14KD 带的多聚体形式.

说　明　书　附　图



图　1

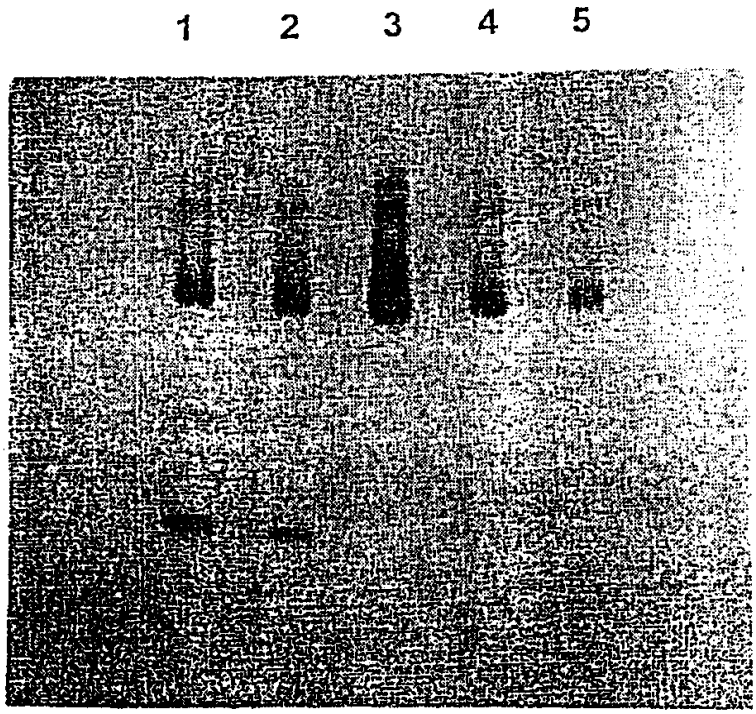


图 2

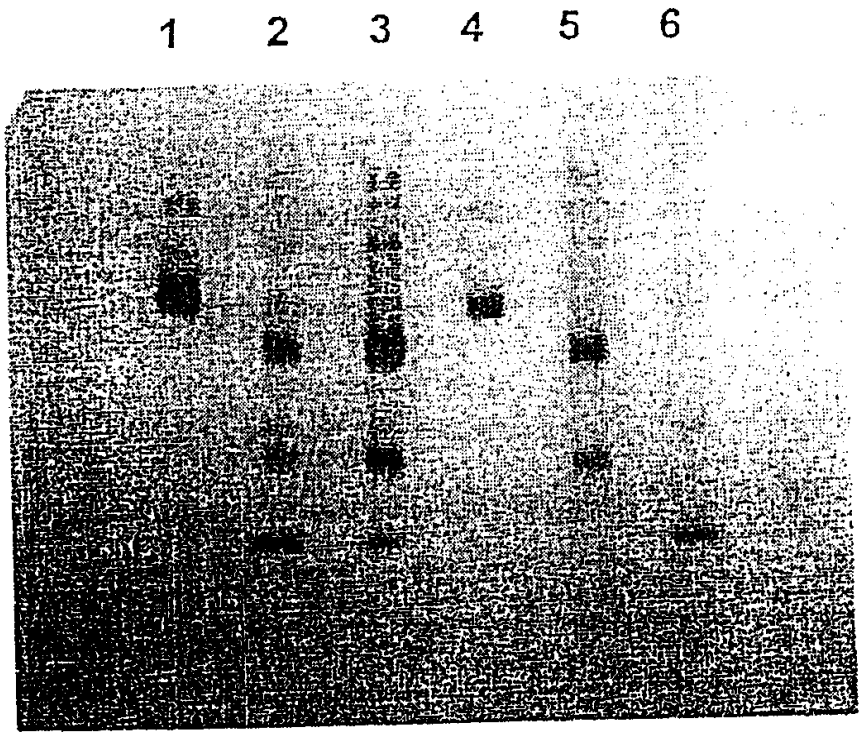


图 3

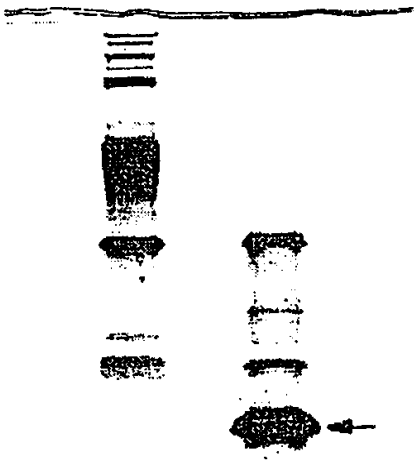


图　4

图　5

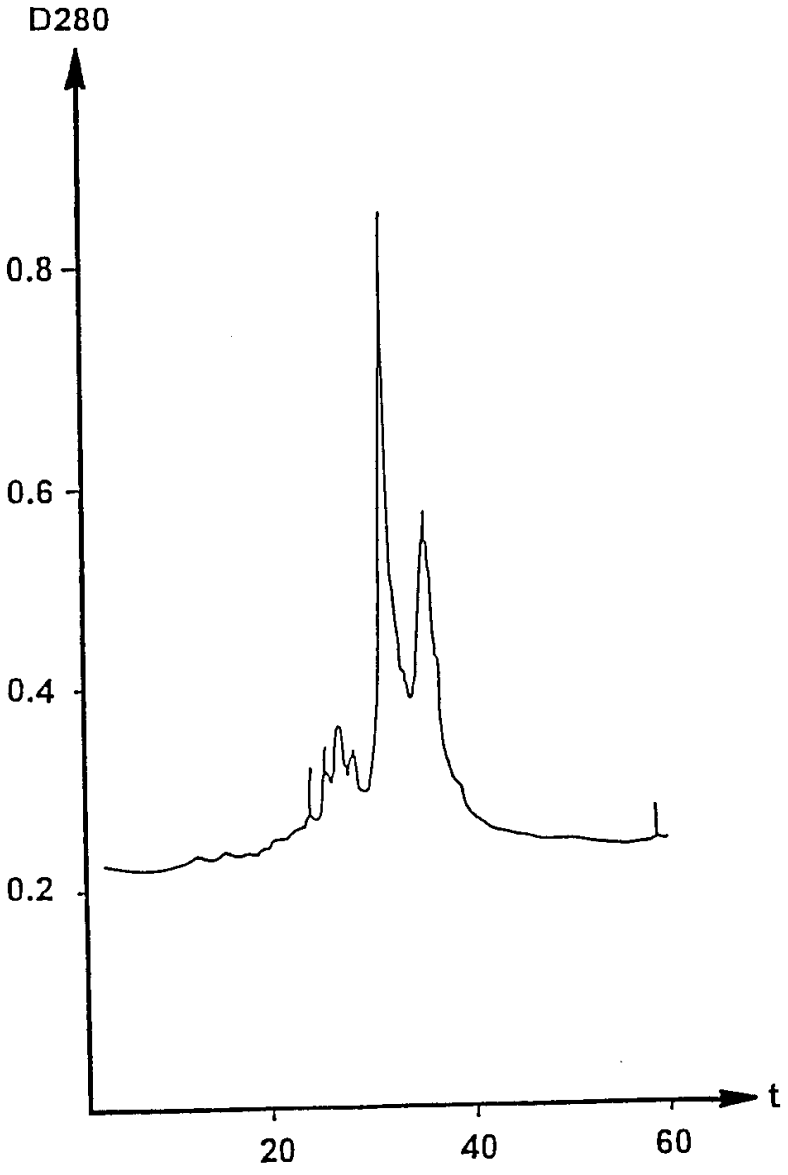


图 6

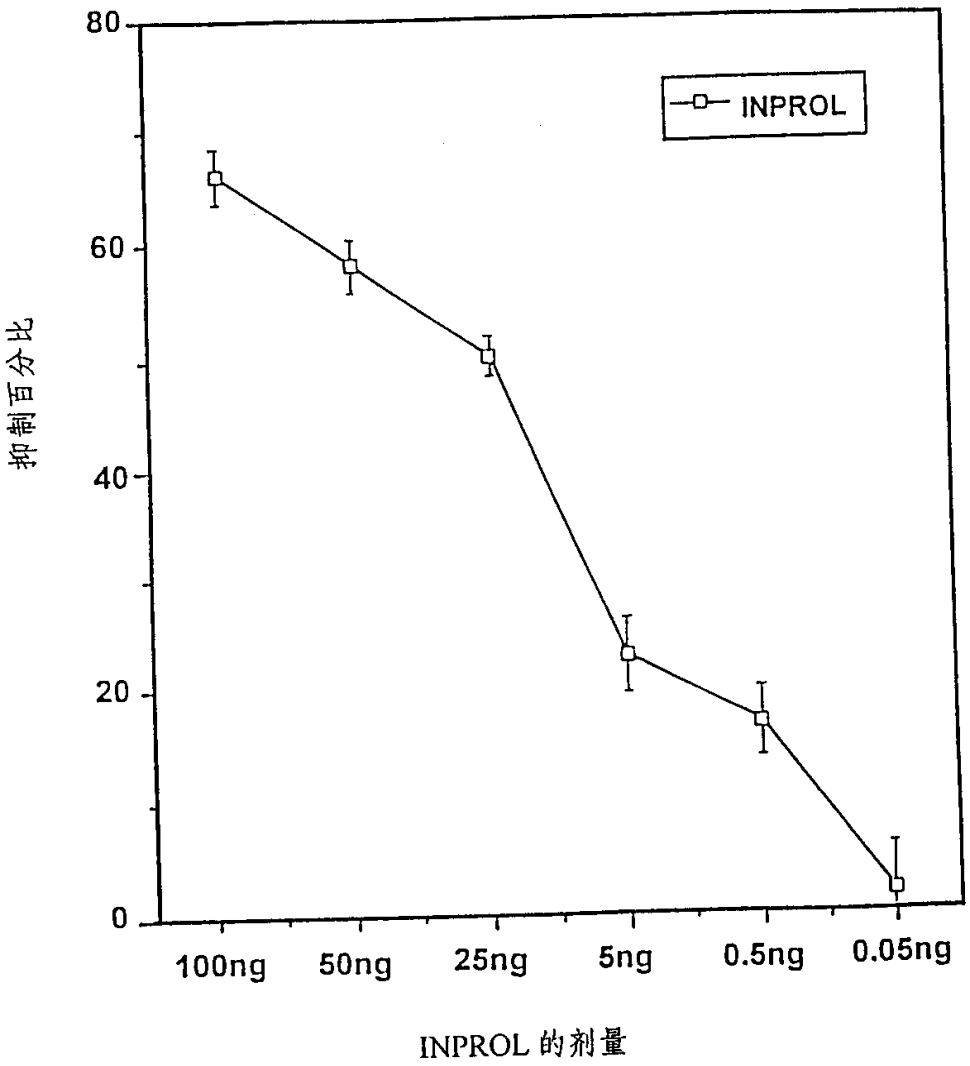

80
60
40
20
0
抑制百分比
INPROL
100ng
50ng
25ng
5ng
0.5ng
0.05ng
INPROL 的剂量

图 7

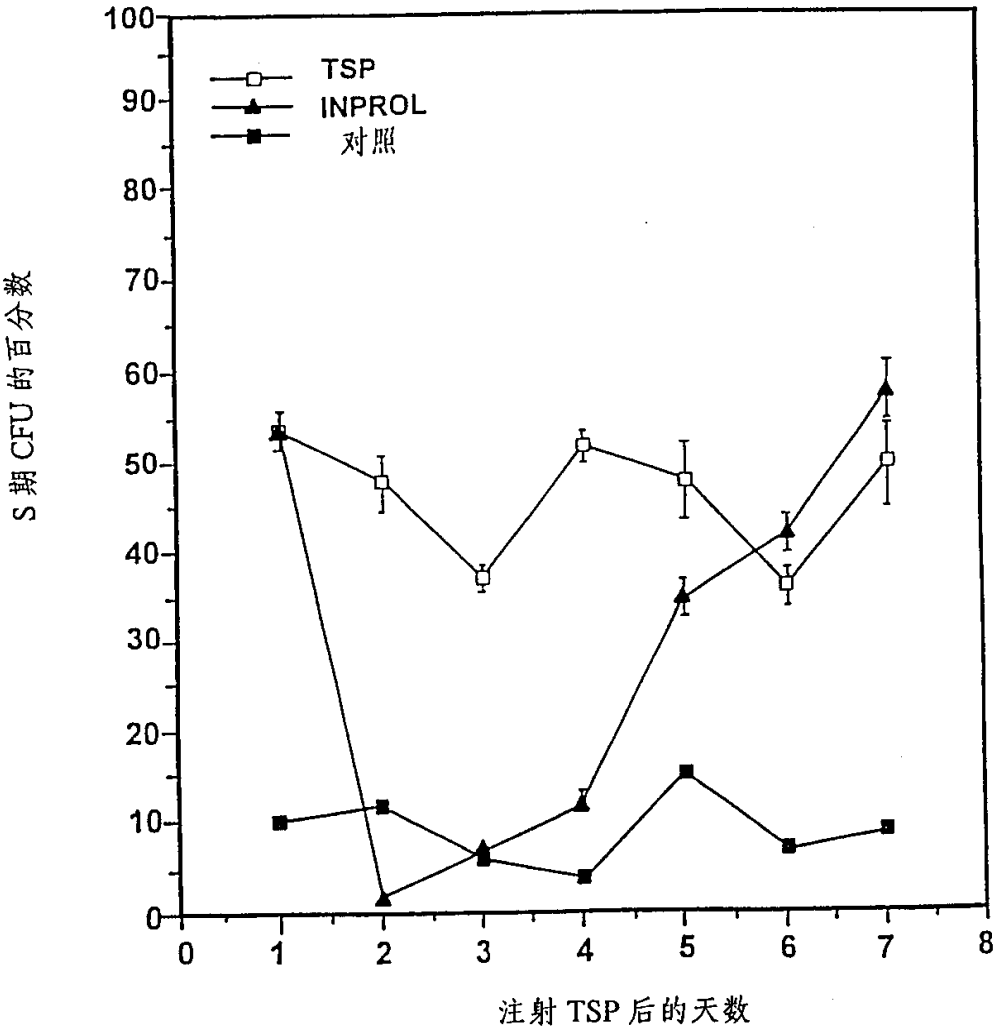

TSP
INPROL
对照
S 期 CFU 的百分数
注射 TSP 后的天数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8

图 8

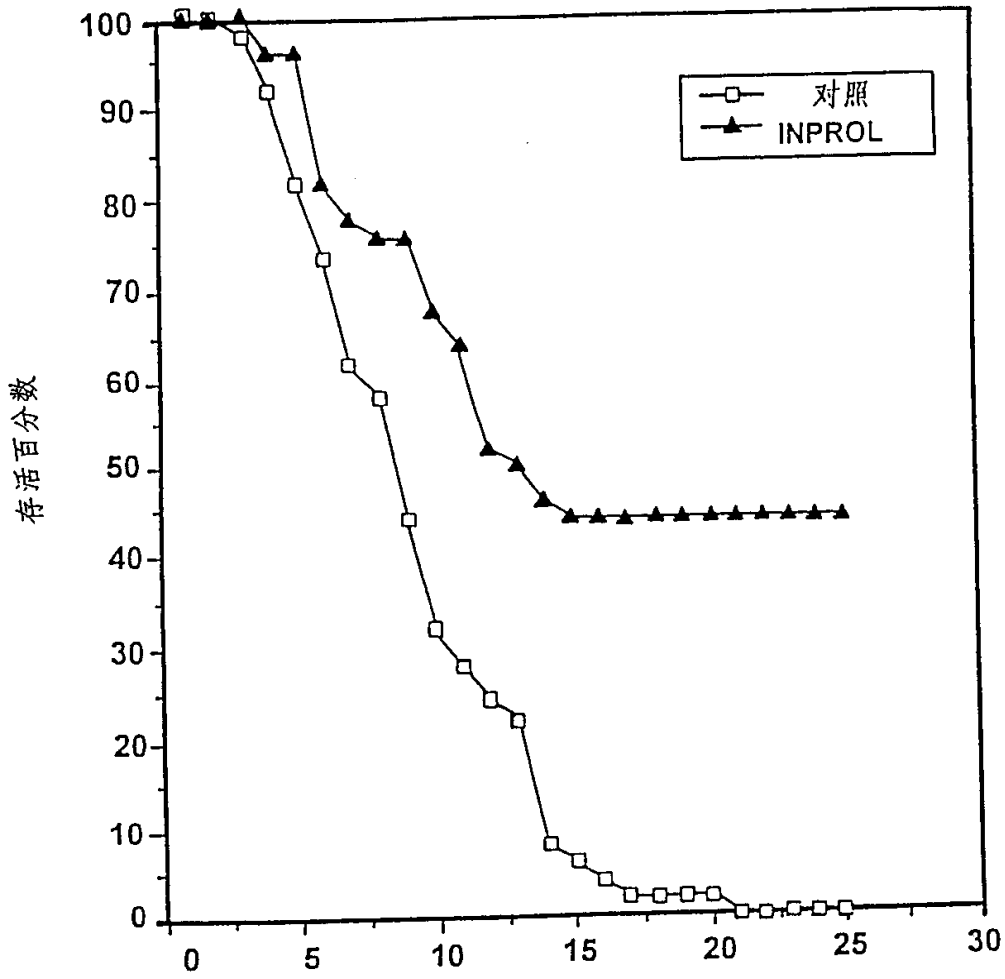

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
存活百分数
对照
INPROL
第二次注射 5FU 后的天数

图 9

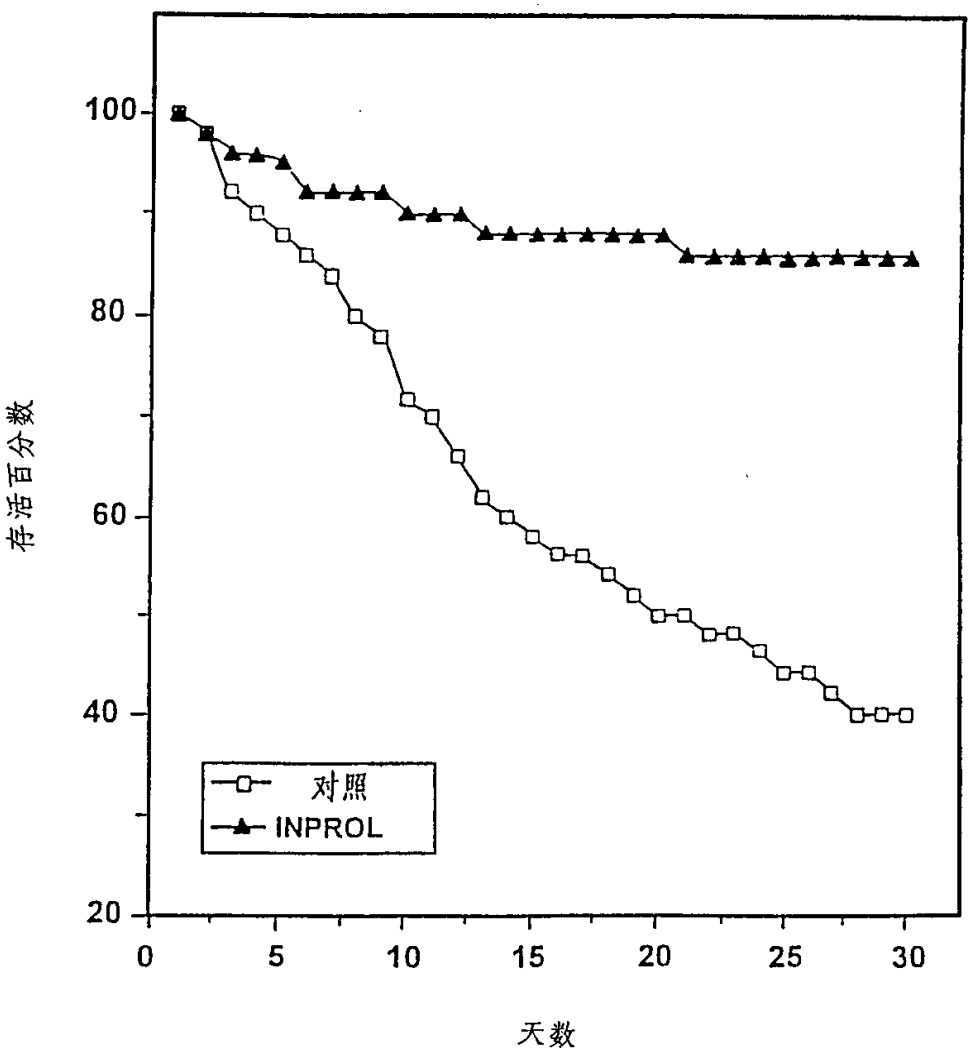


图 10A

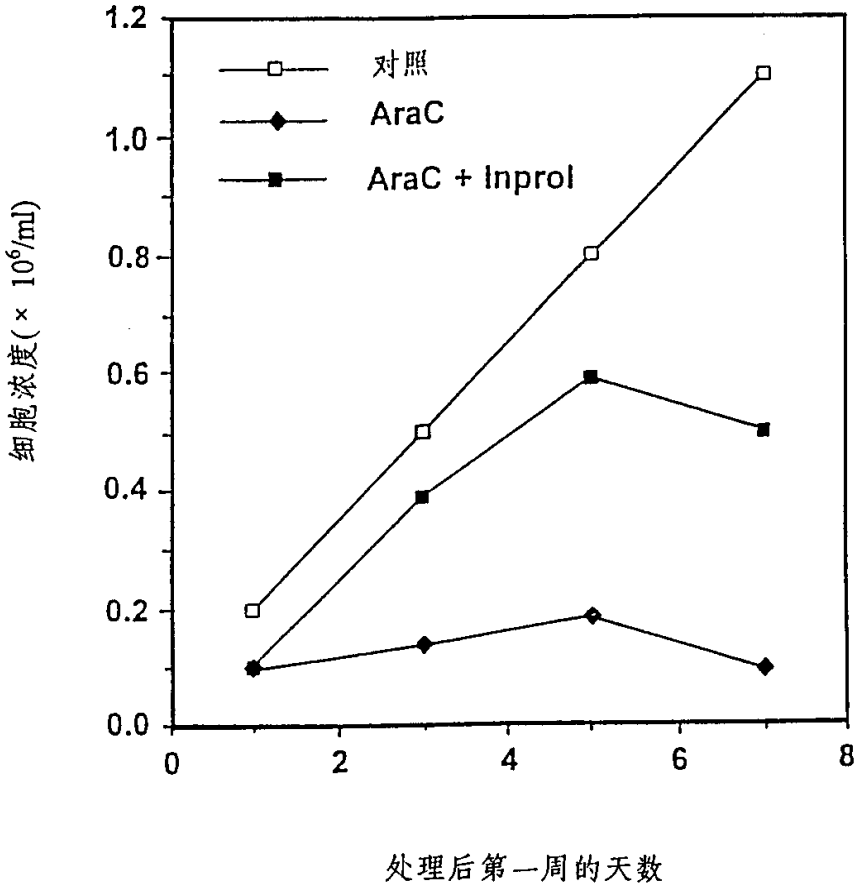

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
对照
AraC
AraC + Inprol
细胞浓度(× 10⁶/ml)
处理后第一周的天数

图 10B

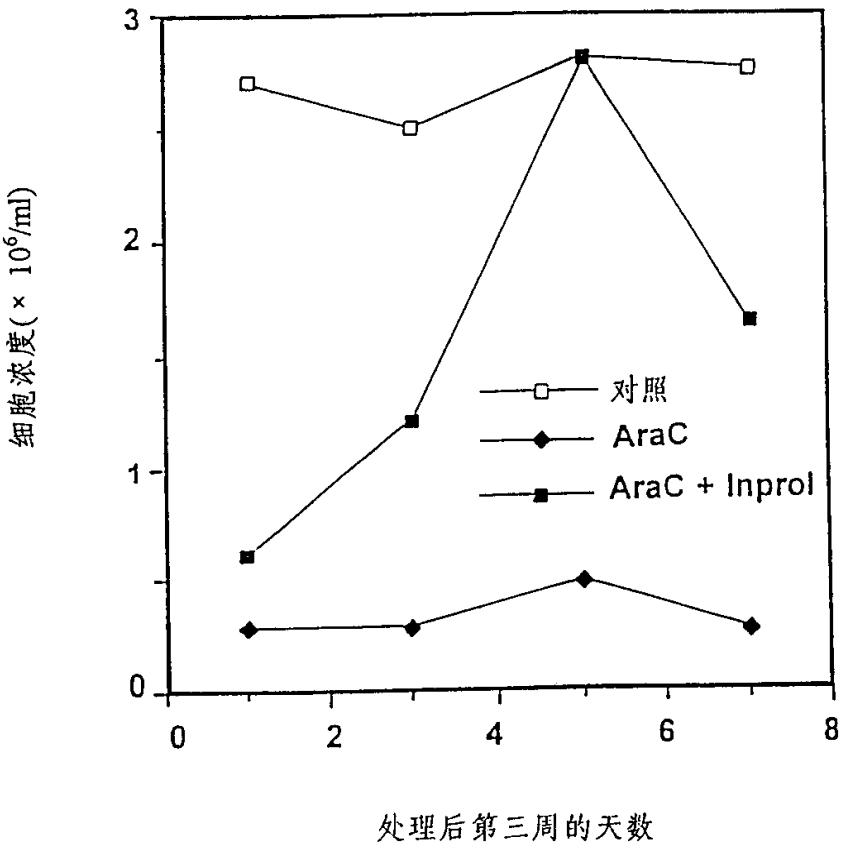


图 11

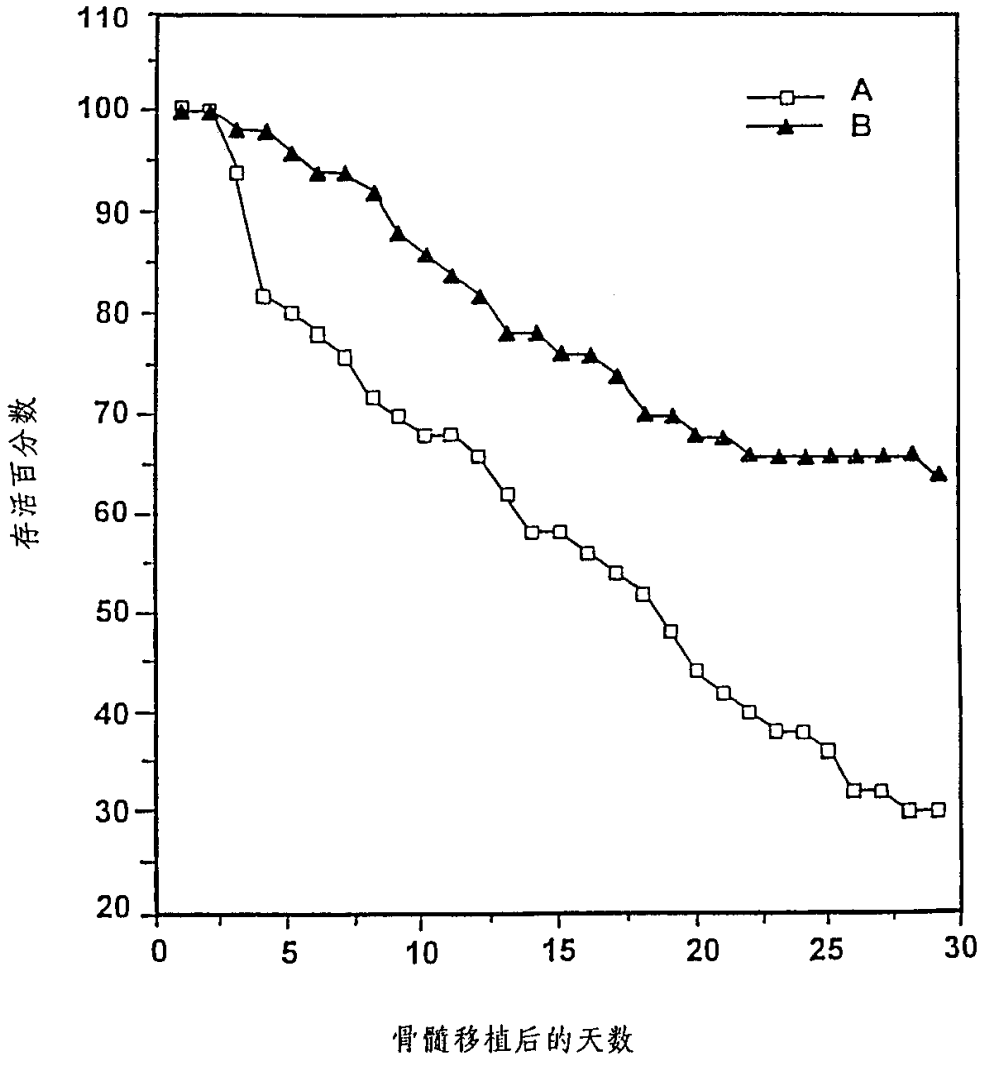


图 12

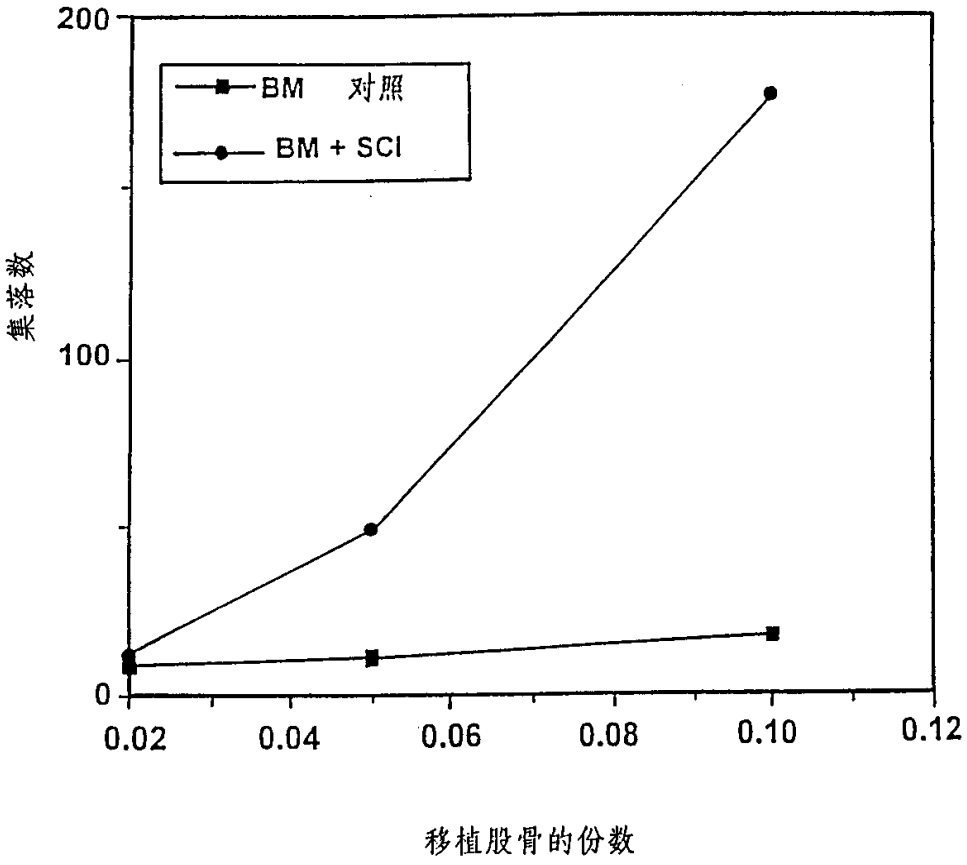


图 13

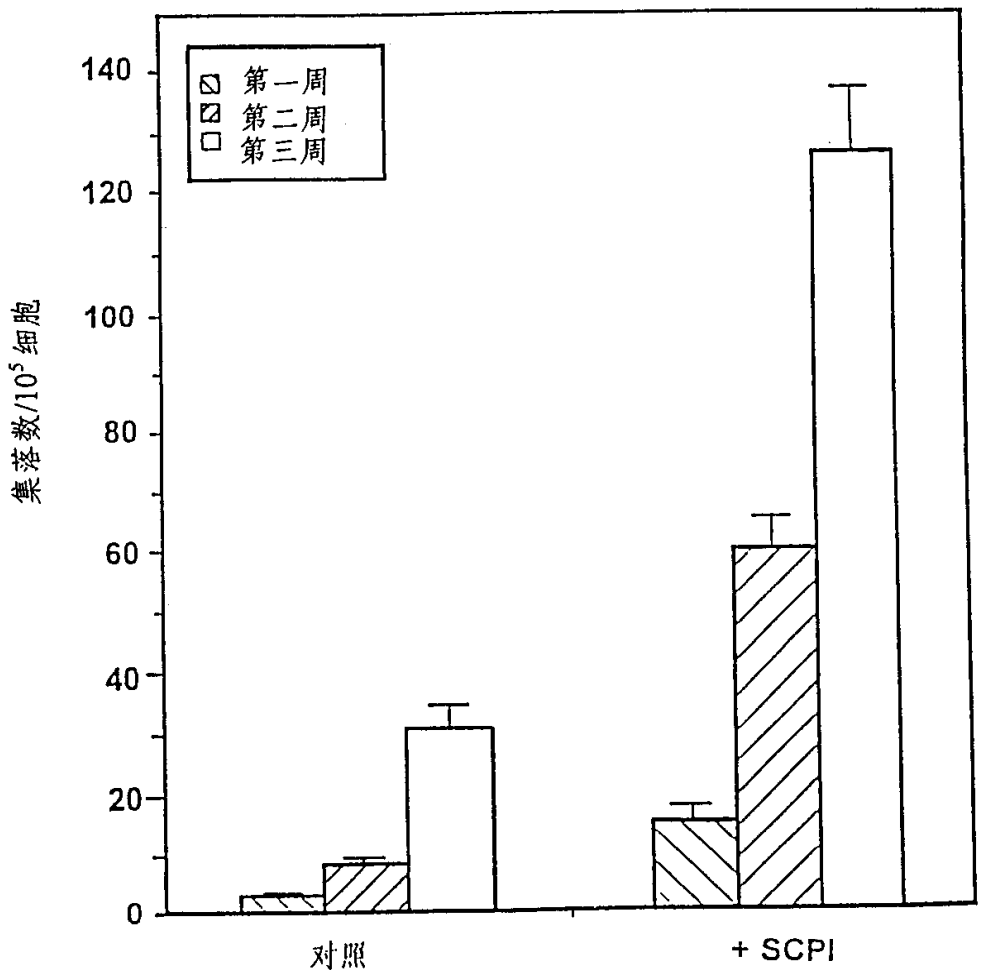


图　14

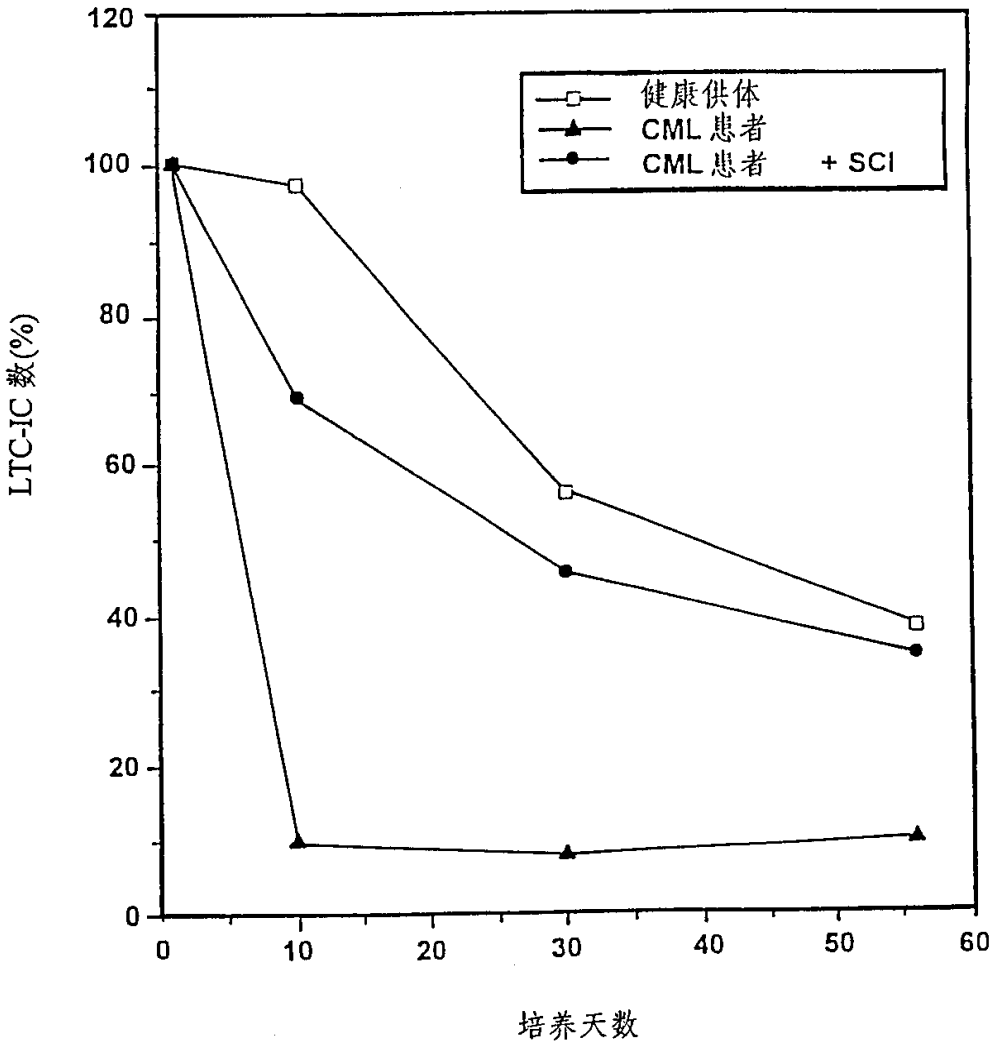
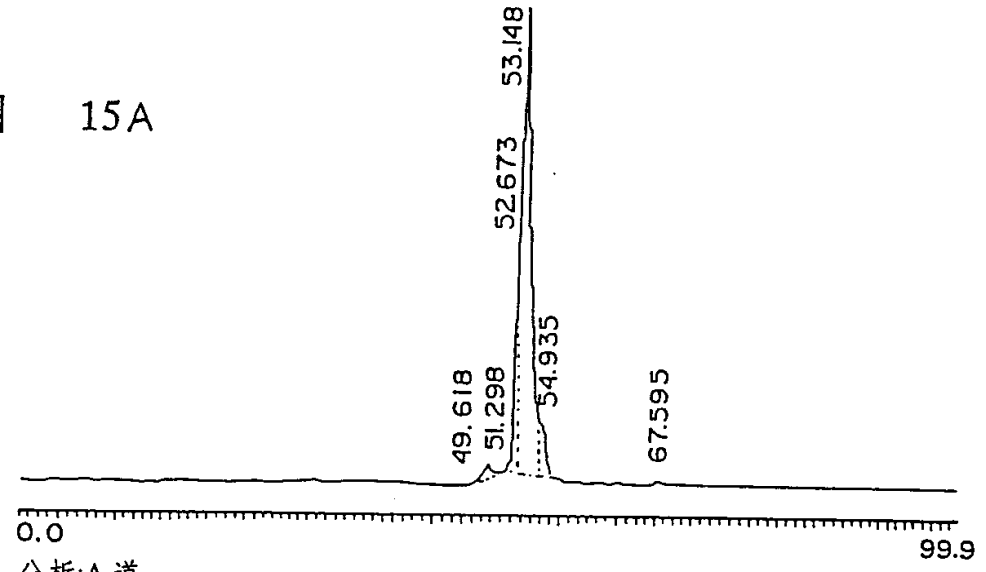
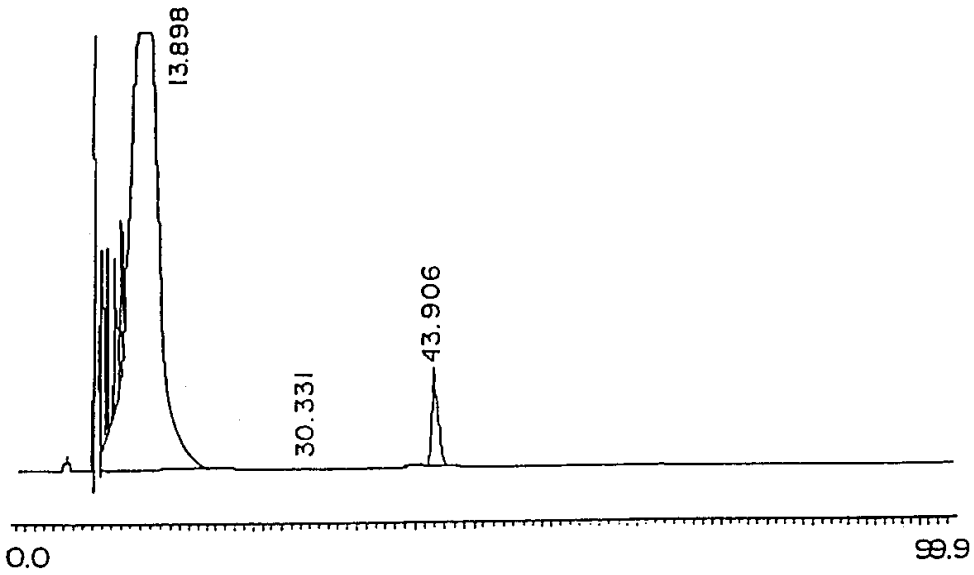

健康供体
CML 患者
CML 患者　+ SCI
LTC-IC 数(%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
培养天数

图 15A



分析:A道

峰号	时间	类型	高度(μ Y)	面积(μV秒)	面积%
	3.126	N1	691	7578	0.041
	3.315	N2	1011	5150	0.027
1	49.618	N	8584	349227	1.893
2	51.298	N	1456	20274	0.109
3	52.673	N1	138069	2633395	14.278
4	53.148	N2	271587	14050458	76.181
5	54.935	N3	33016	1332820	7.226
6	67.595	N	3270	44507	0.241
总面积				18443409	99.996



分析:A 道

峰号	时间	类型	高度(μ Y)	面积(μV秒)	面积%
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

图 15B

图 15C

