



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.19

(21) Номер заявки
201300817

(22) Дата подачи заявки
2012.01.13

(51) Int. Cl. **A61K 31/5585** (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)

**(54) СПОСОБ EX VIVO ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ
УЛУЧШЕНИЯ ПРИЖИВЛЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК**

(31) **11150835.4**

(32) **2011.01.13**

(33) **EP**

(43) **2013.11.29**

(86) **PCT/EP2012/050484**

(87) **WO 2012/095511 2012.07.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИФАРМ САРЛ (LU)

(72) Изобретатель:
**Фраймут Михаэль, Цебедин-Брандль
Ева-Мария, Бергмайр Кристиан,
Хуссайн Фильца (AT)**

(74) Представитель:
**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)**

(56) OTSUKA H. ET AL.: "The Prostacyclin Analog Beraprost Sodium Augments the Efficacy of Therapeutic Angiogenesis Induced by Autologous Bone Marrow Cells", ANNALS OF VASCULAR SURGERY, QUALITY MEDICAL PUBLISHING, ST. LOUIS, MO, US, vol. 20, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 646-652, XP024920915, ISSN: 0890-5096, DOI:10.1007/S10016-006-9100-5 [retrieved on 2006-09-01] abstract

R. MADONNA: "Prostacyclin improves transcatheter myocardial delivery of adipose tissue-derived stromal cells", EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 27, no. 17, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 2054-2061, XP055002018, ISSN: 0195-668X, DOI: 10.1093/eurheartj/ehl154 the whole document

ISHII M. ET AL.: "Mesenchymal stem cell-based gene therapy with prostacyclin synthase enhanced neovascularization in hindlimb ischemia",

ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 206, no. 1, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 109-118, XP026519542, ISSN: 0021-9150, DOI:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2009.02.023 [retrieved on 2009-03-11] the whole document

TRISTA E. NORTH ET AL.: "Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis", NATURE, vol. 447, no. 7147, 21 June 2007 (2007-06-21), pages 1007-1011, XP055002054, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature05883 the whole document

ADAMS GB ALLEY IR CHUNG UI CHABNER KT JEANSON NT LO CELSO C MARSTERS ES CHEN M WEINSTEIN LS LIN CP: "Haematopoietic stem cells depend on Gas-mediated signalling to engraft bone marrow", NATURE, vol. 459, 20 September 2001 (2001-09-20), pages 103-107, XP055002062, the whole document

J. HOGGATT ET AL.: "Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation", BLOOD, vol. 113, no. 22, 26 March 2009 (2009-03-26), pages 5444-5455, XP055002065, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-01-201335 the whole document

WO-A2-2006017169

CRUTCHLEY D.J. ET AL.: "EFFECTS OF PROSTACYCLIN ANALOGS ON THE SYNTHESIS OF TISSUE FACTOR, TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA AND INTERLEUKIN-1BETA IN HUMAN MONOCYtic THP-1 CELLS", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, WILLIAMS AND WILKINS CO, vol. 271, no. 1, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 446-451, XP002071737, ISSN: 0022-3565

WOLFRAM GOESSLING ET AL.: "Prostaglandin E2 Enhances Human Cord Blood Stem Cell Xenotransplants and Shows Long-Term Safety in Preclinical Nonhuman Primate Transplant Models", CELL STEM CELL, vol. 8, no. 4, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 445-458, XP055002056, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2011.02.003 the whole document

WO-A1-2011015630

(57) Настоящее изобретение направлено на способ ex vivo предварительной обработки гемопоэтических стволовых клеток (HSC) для улучшения приживления гемопоэтических стволовых клеток, который включает получение образца, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, смешивание указанного образца по меньшей мере с одним аналогом простациклина, выбранным из группы, состоящей из трепростинила, илопроста, цикапроста или берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, вместе с форсколином, где соотношение аналога простациклина и форсколина составляет 1:3, и инкубирование указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимулирования Гальфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках.

Изобретение также направлено на фармацевтическую композицию для улучшения приживления HSC после трансплантации у пациентов с заболеваниями костного мозга, которая включает по меньшей мере один аналог простациклина, выбранный из группы, состоящей из трепростинила, илопроста, цикапроста, берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, вместе с форсколином и стимулированные гемопоэтические стволовые клетки, полученные предложенным способом. Изобретение также направлено на применение предложенной композиции для лечения индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга.

033717 B1

033717 B1

Настоящее изобретение предоставляет способ улучшенного приживания гемопоэтических стволовых клеток путем предварительной обработки *ex vivo*, включающий стадии получения образца, содержащего гемопоэтические стволовые клетки, добавления аналога простациклина для получения смеси, стадию инкубации указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимуляции G альфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках, и необязательно выделения указанных стимулированных клеток.

Дополнительно предоставляется композиция, содержащая трепростинил, для использования при лечении индивидуумов, подвергающихся трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) являются первичными клетками, способными к регенерации всех компонентов крови на протяжении жизни индивидуума, уравнивающими свое самообновление с дифференцировкой клеток-потомков. Местоположение HSC перемещается в ходе развития, и они циркулируют на всем протяжении жизни млекопитающих, входя и выходя из кровотока, чтобы занять нишу костного мозга в ходе последовательных стадий хоуминга, приживания и удержания. Хоуминг представляет собой процесс, путем которого донорные стволовые клетки попадают в костный мозг, а приживание стволовых клеток подразумевает их рост в костном мозге.

Гемопоэтические стволовые клетки обладают лечебными возможностями благодаря своей способности восстанавливать клетки крови и иммунной системы у реципиентов трансплантата. Кроме того, HSC обладают способностью образовывать клетки других тканей, таких как мозг, мышцы и печень. Методы аутологичной и аллогенной трансплантации костного мозга человека в настоящее время используются в качестве терапии таких заболеваний, как лейкемия, лимфома и других опасных для жизни заболеваний. Для таких операций должно быть выделено большое количество донорного костного мозга, чтобы обеспечить достаточное количество HSC для приживания.

Для заселения ниши костного мозга *in vivo* гемопоэтическими стволовыми клетками необходим Gα_s-преобразованный сигнал (1). Эти недавние данные подтверждают более ранние *in vitro* эксперименты, показавшие, что активация Gα_s способствует выживанию и дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток (2,3). Gα_s представляет собой связывающую гуаниновый нуклеотид α-субъединицу гетеротримерного G-белка, который стимулирует все 9 изоформ мембраносвязанной аденилатциклазы млекопитающих. Gα_s может быть конститутивно активирована *ex vivo/in vitro* при помощи обработки клеток холерным токсином, поскольку холерный токсин АДФ-рибозилирует каталитический остаток аргинина (R^{186/187/201/202}, точный номер аргинина зависит от сплайс-варианта Gα_s); интактный остаток аргинина необходим для гидролиза GTP и приводит к дезактивации Gα_s (4). Улучшенное приживание действительно может наблюдаться после предварительной обработки гемопоэтических стволовых клеток холерным токсином: в костном мозге насчитывалось приблизительно в два раза больше (Lin⁺) клеток-предшественников, если препарат стволовых клеток был предварительно обработан холерным токсином (1).

Однако для препаратов стволовых клеток для пациентов, подвергающихся трансплантации костного мозга, холерный токсин был бы крайне неблагоприятным. Холерный токсин (СТ), особенно его нетоксичный фрагмент пентамерной В субъединицы (СТВ), является мукозным адьювантом, имеющим сильные иммуномодулирующие свойства как *in vivo*, так и *in vitro*, и представляет собой один из наиболее сильных мукозных иммуногенов. Холерный токсин и СТВ вызывают сильное образование IgA антител в кишечнике и длительную иммунологическую память. На этом основании СТВ стал важным компонентом недавно разработанных пероральных вакцин против холеры и диареи, вызванной энтеротоксигенными *E. coli*. Сильную иммуногенность СТ и СТВ в значительной степени можно объяснить их способностью связываться с рецепторами на поверхности слизистой оболочки кишечника.

Дополнительно в течение естественного хода инфекции пентамерная часть В молекулы токсина связывается с поверхностью эпителиальных клеток кишечника и быстро эндоцитируется вместе с А субъединицей. Будучи эндоцитированной, каталитически активная А-субъединица отделяется от пентамерной части В и проникает в клетку сквозь пору, образованную В-субъединицей. Внутри клетки она постоянно рибозилирует Gs альфа-субъединицу гетеротримерного G-белка, приводя к конститутивной продукции цАМФ. Это, в свою очередь, приводит к секреции H₂O, Na⁺, K⁺, Cl⁻ и HCO₃⁻ в просвет тонкого кишечника, что обуславливает быструю дегидратацию и другие особенности, обусловленные холерой. При внутривенном введении холерный токсин поглощается большинством клеток (только некоторые клетки защищены специфическими барьерами, таким как гематоэнцефалический барьер). Соответственно, при этом будет наблюдаться увеличение цАМФ в большинстве клеток тела и множество побочных эффектов (от тахикардии до вазодилатации, мышечного тремора, гипергликемии и т.д.).

Таким образом, эти эффекты делают холерный токсин нецелесообразным для медицинского применения в отношении стимуляции гемопоэтических стволовых клеток.

Однако терапевтическая значимость стимулирования стволовых клеток является существенной при выполнении гетерологичной трансплантации костного мозга (т.е. гемопоэтических стволовых клеток, взятых у иммуносовместимых доноров) и является стандартной процедурой, используемой для лечения людей, страдающих от лейкемии, для лечения людей с генетическими дефектами в компартменте клеток крови (например, гемоглобинопатией, такой как талассемия; нарушениями функции нейтрофильных гра-

нулоцитов и т.д.).

Это также важно в связи с тем, что аутологичная трансплантация костного мозга является стандартной процедурой, которая используется для того, чтобы увеличить терапевтическое окно цитотоксических лекарственных средств, и тем самым сделать возможной высокодозовую интенсивную химиотерапию (5,6).

Гемопозитические стволовые клетки экспрессируют все четыре рецептора простагландина E (EP1-4). Предварительная обработка гемопозитических стволовых клеток (диметилированным) простагландином E2 увеличивает их приживление (7,8). Это воздействие опосредуется каноническим G α s-зависимым путем передачи сигнала, поскольку цАМФ-индуцированная активация протеинкиназы A (PKA) синергична с Wnt-зависимыми сигналами стабилизации β -катенина (9).

Имплантация мононуклеарных клеток (MNCs) аутологичного костного мозга (BM) может быть улучшена с помощью берапроста натрия на модели кролика согласно Otsuka et al. Целью этого исследования являлось поддержание развития артерий при периферической ишемии и ишемии миокарда. Гемопозитические стволовые клетки, однако, представляют собой специфический тип клеток костного мозга (16).

Сочетание терапии стволовыми клетками и фармакологического лечения описано Madonna et al., когда простациклин испытывали в ADSC миокардиальном приживлении после внутрикоронарного введения (17).

Ishii M. et al. раскрывают, что замедленное высвобождение простациклина увеличивает проангиогенную функцию мезенхимальных стволовых клеток и рост мышечных клеток в ишемической ткани (18).

WO 2006/017169 описывает имплантируемый сенсор с биологически совместимым покрытием для контролирования роста ткани, которое может содержать среди прочего аналоги простациклина.

Ингибирующее действие цикапроста или илопроста на синтез тканевого фактора, фактора некроза опухоли и интерлейкина-1 β в клетках THP1 человека описано в Crutchley D. et al. (19).

Локализация стволовых клеток после трансплантации является критическим показателем успешности трансплантации. В настоящее время для трансплантации необходимо большое количество стволовых клеток, поскольку стволовые клетки не всегда успешно приживаются в костном мозге и имеется длительный период аплазии костного мозга, приводящий к снижению зрелых клеток крови.

Таким образом, до сих пор востребованным является предоставление способов и композиций для стимуляции HSC с целью увеличения хоуминга, приживления и удержания выделенных HSC в костномозговых нишах субъектов, подвергающихся трансплантации костного мозга.

Данная проблема решается с помощью вариантов осуществления настоящего изобретения.

Краткое описание изобретения

Первый аспект настоящего изобретения предусматривает способ *ex vivo* предварительной обработки гемопозитических стволовых клеток (HSC) для улучшения приживления гемопозитических стволовых клеток, включающий следующие стадии:

- a) получение образца, содержащего гемопозитические стволовые клетки;
- b) смешивание указанного образца по меньшей мере с одним аналогом простациклина, выбранным из группы, состоящей из трепростинила, илопроста, цикапроста или берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, вместе с форсколином, где соотношение аналога простациклина и форсколина составляет 1:3, для получения смеси;
- c) инкубирование указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимулирования G альфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках.

Согласно изобретению способ дополнительно включает выделение стимулированных клеток.

Согласно изобретению указанный образец является костным мозгом.

Согласно изобретению указанные стволовые клетки получают из пуповинной крови, донорного костного мозга или плаценты.

Второй аспект настоящего изобретения предусматривает фармацевтическую композицию для улучшения приживления HSC после трансплантации у пациентов с заболеваниями костного мозга, включающую по меньшей мере один аналог простациклина, выбранный из группы, состоящей из трепростинила, илопроста, цикапроста или берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, вместе с форсколином, и стимулированные гемопозитические стволовые клетки, полученные способом по изобретению.

Согласно изобретению композиция изготовлена в форме для внутривенного введения.

Третий аспект настоящего изобретения предусматривает применение композиции по изобретению для лечения индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга.

Согласно изобретению заболевание костного мозга представляет собой лейкоз, гемоглобинопатию, нарушение функции нейтрофильных гранулоцитов или заболевания костного мозга, вызванные химиотерапией или облучением.

Согласно изобретению композиция используется после трансплантации костного мозга.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Исследование Lin⁺ клеточной популяции, удержанной магнитными частицами. Ось x (обозначенная APC-C7-A) показывает флуоресценцию, зарегистрированную с помощью смеси антител к

маркерам направления дифференцировки: CD3 ϵ для Т-клеток, CD45R(=B220) для В-клеток, CD11b и Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) для миелоидного (моноцитарного/гранулоцитарного) направления дифференцировки, Ter-119 для эритроидного направления дифференцировки. Ось у представляет собой флуоресценцию, зарегистрированную в отношении антител к рецептору мышинового фактора стволовых клеток c-Kit. Очевидно, что левый верхний квадрант (показывающий клетки, отрицательные по c-Kit⁺ и маркеру направления дифференцировки) обеднен клетками.

Фиг. 2. Исследование Lin⁻ клеточной популяции, которая не связалась с магнитными частицами. Как на фиг. 1, ось x (обозначенная APC-C7-A) указывает флуоресценцию, зарегистрированную с помощью смеси антител к маркерам направления дифференцировки: CD3 ϵ для Т-клеток, CD45R(=B220) для веток, CD11b и Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) для миелоидного (моноцитарного/гранулоцитарного) направления дифференцировки, Ter-119 для эритроидного направления дифференцировки. Ось у представляет собой флуоресценцию, зарегистрированную в отношении антител к рецептору мышинового фактора стволовых клеток c-Kit. Очевидно, что нижний квадрант (показывающий клетки, отрицательные по c-Kit и положительные по маркерам направления дифференцировки) обеднен клетками и что клетки преимущественно обнаруживаются в верхнем левом квадранте, где следовало ожидать положительные по c-Kit и отрицательные по маркерам направления дифференцировки клетки.

Фиг. 3 показывает исследование Lin⁺ (фиг. 3A) и Lin⁻ клеточных популяций (фиг. 3B) на наличие Sca-1 и c-Kit. Панели 3A и 3B демонстрируют клетки, удержанные на магнитных частицах (охарактеризованные на фиг. 1) и находящиеся в элюате (охарактеризованные на фиг. 2). Они были окрашены, как указано в разделе "Методы", и проанализированы на наличие одновременно c-Kit (PerCP-Cy5-5-A, ось у) и Sca-1 (PE-Cy7-A, ось x). Очевидно, что положительные по маркерам направления дифференцировки клетки, проанализированные на панели А, обнаруживаются в левом нижнем квадранте, т.е. они лишены как c-Kit, так и Sca-1. Напротив, клетки на панели В преимущественно находятся в верхних квадрантах, т.е. они имеют высокие уровни или c-Kit (верхний левый квадрант) или и c-Kit и Sca-1 (верхний правый квадрант), как и предполагалось для популяции гемопоэтических стволовых клеток и некоммитированных предшественников.

Фиг. 4. Накопление циклического АМФ в (Lin⁻, c-Kit⁺, Sca1⁺) гемопоэтических стволовых клетках после стимуляции форсколином, трепростинилом, илопростом, берапростом или сочетанием форсколина и простагландинов. Lin⁻ клетки (7×10^5 /анализ) инкубировали в присутствии [³H]аденина для того, чтобы предварительно метаболитически пометить пул адениновых нуклеотидов в соответствии с "Методами". Клетки инкубировали в отсутствие (левый столбик, помеченный "0") и в присутствии указанных соединений. Накопленный [³H]цАМФ очищали путем последовательной хроматографии на колонках с Dowex AG50-X8 и оксидом алюминия и определяли количество методом жидкостно-сцинтилляционных измерений. Данные представляют собой среднее \pm S.D. (среднеквадратическое отклонение) (n=4).

Фиг. 5. Кривая концентрация-ответ для индуцированного трепростинилом накопления цАМФ в (Lin⁻, c-Kit⁺, Sca1⁺) гемопоэтических стволовых клетках. Условия анализа соответствовали обозначениям на фиг. 4. Данные представляют собой среднее \pm S.D. (n=2).

Фиг. 6. Ex vivo обработка гемопоэтических стволовых клеток трепростинилом приводит к улучшенному приживлению костного мозга у летально облученных мышей. Гемопоэтические стволовые клетки, приготовленные как на фиг. 3, предварительно обрабатывали указанными соединениями (FSK, форсколин) в соответствии с "Методами". Количество лейкоцитов было определено при помощи FACS. Указано число исследованных животных.

Фиг. 7. Отношение Ly5.2 и Ly5.1 положительных клеток крови через 16 недель после трансплантации костного мозга. Ly5.1 клетки были предварительно обработаны CTX или трепростинилом и форсколином.

Фиг. 8. Отношение Ly5.2 и Ly5.1 положительных клеток крови через 16 недель после трансплантации костного мозга. Ly5.2 клетки были предварительно обработаны CTX или трепростинилом и форсколином.

Подробное описание изобретения

Предоставляемые методы и способы увеличения хоуминга и приживления HSC в микроокружении костного мозга имеют вполне определенное биологическое и медицинское значение. Локализация стволовых клеток после трансплантации крайне важна для клинических процедур, так как на сегодняшний день для клинической трансплантации требуются огромные количества стволовых клеток, что приводит, таким образом, к необходимости больших количеств донорских клеток. Такие способы также весьма полезны, поскольку значительное число аутологичных донорских трансплантатов содержит недостаточное количество стволовых клеток, или HSC. Также пациенты часто не могут найти гистосовместимых доноров, что подчеркивает необходимость способов и композиций для снижения числа HSC, необходимых для успешной трансплантации. Возможность улучшить хоуминг и приживление HSC in vitro или ex vivo дает возможность отбора меньшего количества клеток у доноров, тем самым уменьшая время и дискомфорт, связанные со сбором костномозговых/периферических стволовых клеток, и увеличивая число донорских клеток HSC.

Настоящее изобретение, таким образом, предоставляет способ улучшенного приживания HSC путем предварительной обработки HSC ex vivo, включающий стадии: а) получения образца, содержащего гемопоэтические стволовые клетки; б) добавления по меньшей мере одного аналога простаглицина для получения смеси; в) инкубации указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимуляции G альфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках; д) необязательно выделения указанных стимулированных клеток или использования указанной смеси, содержащей указанные стимулированные клетки, для дальнейшего использования, например для лечения или трансплантации.

В частности, аналог простаглицина выбирают из группы трепростинила, илопроста, берапроста и цикапроста или их фармацевтически приемлемых солей.

Трепростинил является синтетическим аналогом простаглицина. Трепростинил коммерчески доступен как Ремодулин™. Трепростинил представляет собой моносодиевую соль (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[*f*]инден-5-ил]окси]уксусной кислоты.

Илопрост коммерчески доступен как "Иломедин" и представляет собой 5-{{(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-гидрокси-6[(E)-(3S,4RS)-3-гидрокси-4-метил-1-октен-6-инил]би-цикло[3.3.0]октан-3-илиден}валериано-вую кислоту.

Берапрост представляет собой 2,3,3a,8b-тетрагидро-2-гидрокси-1-(3-гидрокси-4-метил-1-октен-6-инил)-1H-циклопента(б)бензофуран-5-бутановую кислоту.

Цикапрост представляет собой 2-[(2E)-2-[(3aS,4S,5R,6aS)-5-гидрокси-4-[(3S,4S)-3-гидрокси-4-метилнона-1,6-диинил]-3,3a,4,5,6,6a-гексагидро-1H-пентален-2-илиден]этокси]уксусную кислоту.

В соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере два, в частности по меньшей мере три различных аналога простаглицина могут использоваться для указанного способа. Альтернативно два, три, четыре, пять, или шесть, или даже больше различных аналогов простаглицина могут использоваться для указанного способа. Данный способ преимущественно предоставляет стимулированные клетки, которые могут непосредственно вводиться индивидуумам и которые не проявляют каких-либо нежелательных побочных эффектов благодаря большим количествам неселективных цАМФ-стимулирующих агентов.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления изобретения предоставляется способ улучшенного приживания гемопоэтических стволовых клеток с помощью предварительной обработки ex vivo, включающий следующие стадии:

- а) получения образца, содержащего гемопоэтические стволовые клетки;
- б) добавления аналога простаглицина и форсколина для получения смеси;
- в) инкубации указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимуляции G альфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках;
- д) и необязательно выделения указанных стимулированных клеток;
- е) и необязательно выделения и/или концентрирования указанных стимулированных клеток.

В соответствии с отдельным вариантом осуществления изобретения соотношение аналога простаглицина и форсколина может приблизительно составлять 1:3. HSC, обработанные форсколином и аналогами простаглицина, могут быть очищены перед реимплантацией, однако, эти HSC также могут быть реимплантированы без дополнительных стадий очистки, так как небольшие количества форсколина могут присутствовать, но не вызывать какие-либо негативные побочные эффекты.

Альтернативно к стволовым клеткам может добавляться комбинация трепростинила с одним из числа илопроста, берапроста или цикапроста. Альтернативно трепростинил может добавляться в сочетании с более чем одним или, например, с двумя, тремя, четырьмя или пятью другими аналогами простаглицина, например, без ограничения, илопростом, берапростом, или цикапростом, или их физиологически приемлемыми солями.

В соответствии с отдельным вариантом осуществления для использования при исследованиях на животных или лечении животных агент, усиливающий цАМФ (энхансер), такой как форсколин и/или холерный токсин, может быть дополнительно добавлен к HSC или смеси HSC/трепростинил, илопрост, цикапрост или берапрост до инкубации.

Период времени, необходимый для стимулирования G альфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках, может быть измерен с помощью известных методов, например путем измерений цАМФ, которых существует множество вариаций: RIA, метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) с EPAC (epac1) (Ponsiouen B. et al, EMBO reports, 5, 12, 1176-1180 (2004)), радиохимические методы и т.д. Стимулированные клетки, в которых имеет место G альфа_s-путь передачи сигнала, могут быть отобраны или отделены от нестимулированных клеток способами, известными в данной области техники, такими как цАМФ-репортер на основе FRET.

В соответствии с вариантом осуществления изобретения время инкубации составляет примерно от 1 до 60 мин, предпочтительно примерно от 2 до 30 мин.

цАМФ-зависимый путь является путем, необходимым для оказания содействия приживлению гемопоэтических стволовых клеток. Изобретателями было показано, что аналог простаглицина способен вызывать повышение цАМФ в гемопоэтических стволовых клетках. Это достигается за счет активации множества рецепторов, т.е. IP- и EP-рецепторов, что приводит к повышению G альфа_s-передачи сигнала.

Соответственно, аналоги простаглицина, подобные трепростинилу, илопросту, цикапросту или берапросту, более эффективно увеличивают уровень цАМФ.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления трепростинил является предпочтительным аналогом простаглицина, используемым согласно способу настоящего изобретения.

Альтернативно в определенных способах и композициях изобретения также может быть добавлен по меньшей мере один агент, выбранный из энхансера циклического АМФ (цАМФ) или лиганда рецептора простаглицина ЕР. Примеры энхансеров цАМФ включают, но не ограничиваются этим, дибутирил-цАМФ (ДВ-цАМФ), форболовый эфир, форсколин, скареллин, 8-бром-цАМФ, холерный токсин (СТ), аминофиллин, 2,4 динитрофенол (DNP), норэпинефрин, эпинефрин, изопротеренол, изобутилметилксантин (ИВМХ), кофеин, теофиллин (диметилксантин), дофамин, ролипрам, простаглицин Е₁, простаглицин Е₂, гипофизарный активирующий аденилатциклазу полипептид (РАСАР) и вазоактивный полипептид кишечника (VIP), наряду с прочими, известными в данной области техники, могут быть добавлены к стволовым клеткам, или смесям стволовых клетки/трепростинил или стволовые клетки/трепростинил, илопрост, цикапрост и/или берапрост перед инкубацией. Примеры энхансеров цАМФ также включают цАМФ и аналоги цАМФ, такие как sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS), в числе прочих.

В соответствии с отдельным вариантом осуществления изобретения форсколин, и/или холерный токсин, или А субъединица холерного токсина дополнительно добавляются к стволовым клеткам или к смеси стволовые клетки/трепростинил перед инкубацией.

В отдельном варианте осуществления указанные энхансеры цАМФ используются для проведения обработки стволовых клеток животных или для проведения исследований на животных с учетом прижизненного стволовых клеток.

Относительно аналогов простаглицина в соответствии с настоящим изобретением термин "аналоги простаглицина" включает также производные и аналоги указанных веществ.

Термины "аналог" или "производное" относятся к химической молекуле, которая сходна с другим химическим веществом по структуре и функции, часто структурно отличающимся отдельным элементом или группой, которая может отличаться вследствие модификации более чем одной группы (например, 2, 3 или 4 групп), если она сохраняет ту же самую функцию, как исходное химическое вещество. Такие модификации являются обычными для специалистов и включают, например, дополнительные или замещенные химические фрагменты, такие как сложные эфиры или амиды кислоты, защитные группы, такие как бензильная группа для спирта или тиола, и трет-бутоксилкарбонильные группы для амина. Также включаются модификации алкильных боковых цепей, такие как алкильные замещения (например, метил, диметил, этил и т.д.), модификации уровня насыщенности и ненасыщенности боковых цепей и введение модифицированных групп, таких как замещенный фенил и феноксигруппа. Производные также могут включать конъюгаты, такие как молекулы биотина или авидина, ферменты, такие как пероксидаза хрена и тому подобное, и радиоизотопно-меченые, биолюминесцентные, хемолюминесцентные или флуоресцентные фрагменты. Кроме того, фрагменты могут быть добавлены к описанным здесь веществам для изменения их фармакокинетических свойств, например для увеличения времени полужизни *in vivo* или *ex vivo* или увеличения их способности проникать в клетку, в числе прочих желаемых свойств. Также включаются пролекарства, известные как усиливающие многочисленные желательные свойства фармацевтических препаратов (например, растворимость, биологическую доступность, свойства, необходимые при производстве, и т.д.).

Термин "производное" также включает изменения исходной последовательности, включая добавления, удаления и/или замещения, которые предоставляют функционально эквивалентные или функционально улучшенные молекулы.

В соответствии с отдельным вариантом осуществления изобретения производное трепростинила выбирают из группы кислотных производных трепростинила, пролекарств трепростинила, полиморфов трепростинила или изомеров трепростинила.

Аналогично илопрост, цикапрост или берапрост могут представлять собой производные из группы кислотных производных, пролекарств, их полиморфов или изомеров.

Термин "гемопоэтические стволовые клетки" (HSC) или более общий термин "стволовые клетки" следует понимать как эквивалентные термины в описании настоящего изобретения, которые обычно относятся к плюрипотентным или мультипотентным "стволовым клеткам", которые дают начало типам клеток крови, включая миелоидное (например, моноциты и макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты/тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидное направления дифференцировки (например, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки), и другим известным в данной области техники. "Стволовые клетки", как правило, характеризуются способностью образовывать множество типов клеток (т.е. мультипотентностью) и способностью к самообновлению. Однако также могут включаться олигопотентные и унипотентные предшественники. "Гемопоэз" обычно относится к процессу клеточной дифференцировки или образованию специализированных клеток крови из HSC. В ходе развития гемопоэза перемещается из эмбриональной печени в костный мозг, который затем остается местом гемопоэза на всем протяжении зрелости. После упрочивания в костном мозге HSC не распределяются беспорядочно по всей полости кости. В значительной степени HSC обычно обнаруживаются в непосредственной близости

к эндостальной поверхности. Число более зрелых стволовых клеток увеличивается при удалении от поверхности кости.

Гемопоэтические ткани содержат клетки, способные к долговременной и кратковременной регенерации, а также коммитированные мультипотентные, олигопотентные и унипотентные клетки-предшественники.

В частности, образец, содержащий HSC, может представлять собой костный мозг.

HSC могут быть получены известными способами из любого источника, который известен как содержащий HSC, в частности из периферической крови, пуповины или пуповинной крови, плаценты и костного мозга. Альтернативно также возможны такие источники как эмбриональная печень, эмбриональная селезенка и аорта-гонадо-мезонефрос животных. HSC человеческого происхождения являются предпочтительными для способов и композиций изобретения. Например, HSC можно найти в костном мозге взрослых, включая бедренные кости, шейку бедра, ребра, грудину и другие кости. HSC можно получить непосредственно путем отбора из бедра при помощи иглы и шприца или из крови, часто после предварительной обработки цитокинами, такими как G-CSF (гранулоцитарные колоние-стимулирующие факторы), которые вызывают высвобождение клеток из костно-мозгового компартмента.

HSC могут быть идентифицированы в соответствии с определенными фенотипическими или генотипическими маркерами. Например, HSC могут быть идентифицированы по их малому размеру, отсутствию маркеров направления дифференцировки (lin), низкому окрашиванию (боковая популяция) витальными красителями, такими как родамин 123 (rho¹⁰) или Hoechst 33342, и присутствию различных антигенных маркеров на их поверхности, многие из которых относятся к группе кластера дифференцировки (например, CD5, CD11b, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4, Ter-119 и c-kit). HSC преимущественно являются отрицательными по маркерам, которые обычно используются для определения направления дифференцировки и, таким образом, часто относятся к lin(-) клеткам. Большая часть HSC человека может быть охарактеризована как CD5⁺, CD45R (B220)⁺, CD11⁺, GR-1⁺, CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺ и lin(-). Однако не все стволовые клетки учитываются с помощью этих комбинаций, поскольку определенные HSC являются CD347⁺ и CD38⁺. Также некоторые исследования предполагают, что на поверхности наиболее ранних стволовых клеток может отсутствовать c-kit.

Для очистки lin(-) HSC посредством проточной цитометрии, или FACS может использоваться набор антител к маркерам направления дифференцировки зрелых клеток в отношении истощения lin(+) клеток или поздних мультипотентных предшественников (MPP), включая, например, антитела к CD3эпсилон, CD5, CD45R, CD11b, CD16, GR-1, 7-4 и Ter-119, CD13, CD32 и CD33, CD71, CD19, CD61, Mac-1 (CD11b/CD18), Gr-1, 117Ra, CD3, CD4, CD5 и CD8 в числе прочих, известных в данной области техники. В данной области техники известны дополнительные способы очистки, например способы, использующие определенные характерные особенности "сигнальных молекул активации лимфоцитов" (SLAM) семейства молекул клеточной поверхности.

HSC, будь то клетки из пуповинной крови, костного мозга, периферической крови или другого источника, могут расти или размножаться в любой подходящей, коммерчески доступной или изготовленной по заказу определенной среде, с сывороткой или без сыворотки. HSC из человеческого источника представляют собой предпочтительные варианты осуществления изобретения. Например, в определенных вариантах осуществления в бессывороточной среде может применяться альбумин и/или трансферрин. Кроме того, могут быть включены цитокины, такие как Flt-3 лиганд, фактор стволовых клеток (SCF) и тромбопоэтин (TPO) в числе других. HSC также могут выращиваться в сосудах, таких как биореакторы. Среда, подходящая для ex vivo экспансии HSC, также может содержать поддерживающие HSC клетки, такие как стромальные клетки (например, лимфоретикулярные стромальные клетки), которые могут быть получены, например при дезагрегации лимфоидной ткани, и которые демонстрируют поддержание in vitro, ex vivo и in vivo сохранения, роста и дифференцировки HSC, а также их потомков.

"Пуповинная кровь" или "кровь из пупочной вены" обычно имеет отношение к относительно небольшому количеству крови (приблизительно до 180 мл), полученной от новорожденного, которая возвращается в неонатальную циркуляцию. Пуповинная кровь богата HSC и может быть собрана и сохранена для последующего использования в соответствии с методами, известными в данной области техники.

Термины "ex vivo" или "in vitro" относятся к активностям, имеющим место вне организма, таким как экспериментальные работы или измерения, сделанные в или на живой ткани в искусственной окружающей среде вне организма, предпочтительно с минимальными изменениями естественных условий. В некоторых вариантах осуществления такие ткани или клетки могут быть собраны, заморожены и позже разморожены для обработки ex vivo. Эксперименты с культурой ткани или процедуры, продолжающиеся дольше нескольких дней с использованием живых клеток или ткани, в большинстве случаев принято считать процедурами "in vitro", хотя этот термин может использоваться взаимозаменяемым образом с термином ex vivo. Перечисления "ex vivo введение", "ex vivo обработка" или "ex vivo терапевтическое использование" относятся в основном к медицинским процедурам, в которых один или более органов, клеток или тканей получены от живого или только что умершего субъекта, необязательно очищены/обогащены, подвергнуты обработке или операции с целью воздействовать на стволовые клетки (например, стадия ex vivo введения, которая предполагает инкубацию клеток с композицией настоящего

изобретения для увеличения способности HSC прививаться), и затем введены тому же самому или другому живому субъекту после необязательной обработки или процедуры.

Такие *ex vivo* терапевтические варианты применения также могут включать необязательную стадию *in vivo* обработки или методическую стадию, такую как введение композиции изобретения один или более раз живому субъекту после введения органа, клеток или ткани. Для этих вариантов осуществления предусматривается и местное, и системное применение в соответствии с хорошо известными в данной области техники методами. Количество трепростинила или количество смеси, содержащей трепростинил и стимулированные стволовые клетки, необязательно вместе с дополнительными средствами, вводимое субъекту, зависит от характерных особенностей этого субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, вес тела и переносимость лекарственных средств, а также степень, тяжесть и тип реакции на трепростинил и/или клеточный трансплантат.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления изобретения композиция, содержащая аналог простациклина, предоставляется для использования при лечении индивидуумов, подвергающихся трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция содержит аналог простациклина, выбранный из группы трепростинила, илопроста, цикапроста и берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, конкретнее она содержит трепростинил.

Композиция по изобретению также может содержать трепростинил вместе с одним или более из числа илопроста, цикапроста или берапроста. Альтернативно композиция может содержать илопрост в сочетании с одним или более из числа трепростинила, цикапроста или берапроста или их фармацевтически приемлемых солей. Альтернативно композиция может содержать берапрост в сочетании с одним или более из числа трепростинила, цикапроста, или илопроста, или их фармацевтически приемлемых солей. Альтернативно композиция может содержать цикапрост в сочетании с одним или более из числа трепростинила, берапроста, или илопроста, или их фармацевтически приемлемых солей.

Указанные субъекты могут страдать от какой-либо болезни костного мозга, т.е. заболевания, при котором нормальная архитектура костного мозга "смещена" злокачественными новообразованиями, апластической анемией или инфекциями, приводящими к снижению продукции клеток крови и тромбоцитов. Указанные заболевания костного мозга могут представлять собой, например, лейкоз, дефект компартмента клеток крови или необходимость трансплантации костного мозга после химиотерапии или лечения облучением.

Конкретнее дефект компартмента клеток крови может являться гемоглобинопатией, подобной талассемии, или нарушениями функции нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает использование для лечения индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга, например вследствие химиотерапии или облучения, и при этом подвергающихся трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, путем введения по меньшей мере одного аналога простациклина в течение ограниченного периода времени после трансплантации костного мозга.

Лечение субъектов, подвергающихся трансплантации костного мозга, с использованием по меньшей мере одного аналога простациклина, по меньшей мере одного аналога простациклина вместе с одним или более, в частности двумя, более конкретно тремя энхансерами цАМФ или смеси, содержащей по меньшей мере один, в частности два, более конкретно три аналога простациклина, и стимулированных стволовых клеток, необязательно вместе с дополнительными средствами, такими как один или более энхансеров цАМФ, также рассматривается настоящим изобретением.

Конкретнее энхансер цАМФ может являться форсколином.

По меньшей мере один аналог простациклина может использоваться для улучшения приживления человеческих HSC во время трансплантации костного мозга или после восстановления костного мозга с использованием HSC. Ускоренное приживление сокращает период, во время которого субъекты чувствительны к потенциально летальным инфекциям, кровотечению и другим серьезным осложнениям. Следовательно, аналог простациклина должен быть полезным методом лечения, предназначенным для предварительной обработки донорного костного мозга с целью увеличения приживления костного мозга (т.е. путем уменьшения числа необходимых клеток и сокращения продолжительности аплазии костного мозга).

В частности, аналог простациклина выбирают из группы трепростинила, илопроста, цикапроста, или берапроста, или их фармацевтически приемлемых солей. Конкретнее трепростинил является предпочтительным для применения аналогом простациклина.

Длительное лечение субъектов в течение нескольких дней после трансплантации костного мозга аналогом простациклина должно давать в результате улучшенные клинические результаты в виде улучшения приживления (т.е. путем уменьшения числа необходимых клеток и сокращения продолжительности аплазии костного мозга).

Таким образом, в соответствии с конкретным вариантом осуществления лечение проводят в течение по меньшей мере пяти дней после трансплантации, конкретнее в течение по меньшей мере 10 дней, еще конкретнее в течение по меньшей мере 14 дней после трансплантации.

В соответствии с альтернативным вариантом осуществления изобретения рассматривается композиция, содержащая один или более чем один аналог простациклина и стимулированные гемопоэтические

стволовые клетки.

Альтернативно в определенных вариантах осуществления к композиции может добавляться средство, выбранное из энхансера циклического АМФ (цАМФ) или лиганда рецептора простагландина EP. В соответствии с отдельным вариантом осуществления композиция по изобретению также может содержать форсколин.

В частности, композиции изобретения являются фармацевтическими композициями.

В указанных композициях могут содержаться дополнительные фармацевтически приемлемые эксципиенты (вспомогательные вещества), известные в данной области техники.

Количество аналога простациклина зависит от терапевтического средства или метода приготовления стимулированных HSC. В частности, эффективное количество трепростинила для терапевтических вариантов применения составляет по меньшей мере 1,0 нг/кг веса тела.

Композиция по изобретению может вводиться субъекту любым способом, применяемым и известным в данной области техники. Конкретнее обеспечивается внутривенное или подкожное введение.

Указанная композиция может находиться в форме для перорального приема, выбранной из группы форм с длительным высвобождением, таблеток или капсул.

Предшествующее описание станет полностью понятным на основании следующих примеров. Однако такие примеры являются лишь характерными примерами применения на практике одного или более вариантов осуществления настоящего изобретения, и их не следует понимать как ограничивающие рамки изобретения.

Примеры

Пример 1.

Материалы и методы

Выделение костномозговых стволовых клеток

Десять мышей (C57BL/6) умерщвляли смещением шейных позвонков. Трубчатые кости задних конечностей (т.е. бедренные и большеберцовые) освободили от мышц и соединительной ткани и промыли средой RPMI, используя шприц и иглу 27^{1/2} G. Клеточную суспензию освободили от видимой соединительной ткани, собрали и перенесли в центрифужные пробирки. Клетки собрали центрифугированием (1200 об/мин/~100 г в течение 5 мин) и ресуспендировали в 3 мл буфера, лизирующего эритроциты (0,15 M NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA, значение pH от 7,2 до 7,4). Суспензию клеток инкубировали в течение 2 мин при 20°C, а затем 4 мин на льду. После этого добавили RPMI (10 мл) и клетки собрали центрифугированием и подсчитали. Типично выход клеток составлял 3×10⁷/мышь.

Клетки ресуспендировали в ледяном PBS (фосфатно-солевом буфере), содержащем 2% FCS (эмбриональная телячья сыворотка) при плотности клеток 2,5×10⁸ клеток/мл, к которым добавили смесь биотинилированных антител (набор "Lineage Cell Depletion Kit" от Miltenyi Biotec), содержащую линейспецифические антитела к CD5, CD45R (B220), CD11b, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4 и Ter-119 при отношении 0,1 мл раствора антител на 10⁸ клеток. Клетки инкубировали с антителами в течение 20 мин на льду и осадил центрифугированием. После ресуспендирования к суспензии клеток добавили (3,3×10⁸ клеток/мл) вторичные антибиотин-покрытые микробусины (0,2 мл/10⁸ клеток, предоставленные с набором ("Lineage Cell Depletion Kit" от Miltenyi Biotec), а смесь инкубировали в течение 15 мин на льду. После этого образец развели в MACS-буфере (30 мл), клетки собрали центрифугированием и ресуспендировали в 6 мл MACS-буфера. Эту суспензию загрузили на предварительно запрограммированные LS колонки, которые содержали ферромагнитные частицы, покрытые совместимым с клетками пластмассовым материалом. Как правило, использовали три колонки (2 мл суспензии клеток/колонка). Элвоат содержал клетки, отрицательные по линейному маркеру (клетки Lin⁻), тогда как линейно-коммитированные клетки удерживались на колонке. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в мл PBS.

Типичный выход составлял 7×10⁵ Lin⁺ клеток/мышь.

Флуоресцентно-активируемая сортировка клеток (FACS-анализ)

Антитела, используемые для окрашивания маркеров клеточной поверхности, были получены из следующих источников: набор мышинных линейных антител был получен от Becton Dickinson Biosciences (BD 559971, содержащий в биотинированной форме анти-CD3ε, анти-CD11b, анти-CD45R, анти-Ly-6G/Ly-6c, анти-Ter-119), аффинно очищенные крысиные антимышинные CD16/CD32 (mouse Fcγ_{II/III} block, BD 553142) и флуоресцентный краситель стрептавидин-аллофикоцианин-Cy7 (стрептавидин APC-Cy7, BD554063) также были от компании Becton Dickinson Biosciences. Фикоэритрин(PE)-Cy7-меченые антимышинные Ly6A/E (=антиген стволовых клеток-1 = Scf1) PE-Cy7 (катал. № 25-5981-82) и PE-Cy5 антимышинные CD117 (c-Kit) (катал. № 15-1171-81) были от компании eBiosciences.

Сразу после MACS 1×10⁶ линейно-положительных (Lin⁺) и отрицательных (Lin⁻) клеток перенесли в FACS пробирки и держали на льду в 50 мк PBS. В это время следующие FACS антитела развели (1:50) и смешали в PBS: анти CD16/CD32 очищенные (для блокирования Fc-рецепторов), биотинилированные анти-CD3ε, биотинилированные анти-CD11b, биотинилированные анти-CD45R, биотинилированные анти-Ly-6G/Ly-6C и биотинилированные анти-Ter-119, меченые стрептавидином APC-Cy7, PE-Cy7-меченые анти-Scf-1, PE-Cy5-меченые анти-c-kit. Этот мастер-микс (смесь) (50 мкл) добавляли к каждому

образцу, который затем перемешивали с помощью слабого потряхивания и инкубировали при 4°C в темноте в течение 15 мин. После этого клетки собирали центрифугированием, промывали в 2 мл PBS и ресуспендировали в PBS. Образцы анализировали на приборе FACS Canto II (Becton Dickinson). Использовали установку дискриминационного окна как указано далее: "ворота" для живых клеток были установлены путем регистрации переднего и бокового рассеяния. Живые клетки дополнительно различали на основе экспрессии линейных маркеров (т.е., CD11b, CD45R, Ly-6G/Ly-6C, Ter-119). Это давало возможность установления "ворот" для Lin⁻ клеток, которые дополнительно анализировали в отношении экспрессии Sca-1 и c-Kit.

Анализ накопления [³H]цАМФ

Lin⁻/Sca1⁺-клетки инкубировали в 1 мл среды для стволовых клеток (Stem Span SFEM, Stem Cell Tech #09650), содержащей по 0,5 мг/л бензилпенициллина и стрептомицина, по 50 нг/мл мышинового фактора стволовых клеток (mSCF), человеческого Flt-3, hIL-11 50 нг/мл, m-IL3 (10 нг/мл) (все от компании PreProTech), 10 мкг/мл аденозиндезаминазы (Roche) и [³H]аденин (Perkin Elmer, 1 мкCi/мл). Преинкубация продолжалась в течение 4 ч при 37°C. Затем клетки стимулировали разными веществами (форсколином, трепростинилом и другими простааноидами; холерным токсином) в течение 1 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (5 мин при 100 g), среду удалили и осадок лизировали в ледяной 2,5% хлорной кислоте (0,9 мл), содержащей 0,1 mM цАМФ, держали на льду в течение 1 ч и нейтрализовали 4,2 M KOH (0,1 мл). Клетки, положительные по линейным маркерам, предварительно инкубировали аналогичным образом, но в среде, содержавшей RPMI вместо бессывороточной среды для стволовых клеток. АМФ и цАМФ разделили с помощью последовательной хроматографии на колонках, содержащих Dowex AG50-X8 и нейтральную окись алюминия (12).

Тот факт, что различия можно видеть только в присутствии форсколина, представляет собой техническую проблему - без повышения чувствительности форсколином (т.е. при его отсутствии) сигнал является недостаточным, чтобы видеть какие-либо различия между разными соединениями, т.е. илопростом, берапростом и трепростинилом. Повышение чувствительности означает, что клетки становятся более чувствительными (сенсбилизируются) к рецепторному ответу, так как эти клетки содержат чрезвычайно низкий уровень цАМФ.

По концентрационной кривой (фиг. 5) для трепростинила можно видеть, что увеличение цАМФ является существенным без добавления форсколина.

Трансплантация костного мозга

Изогенных мышей-реципиентов подвергали летальному облучению. Если этих мышей не спасти путем внутривенного введения гемопоэтических стволовых клеток, они погибают в течение первых двух недель. Lin⁻ (Sca1⁺ и c-Kit⁺) гемопоэтические стволовые клетки были приготовлены, как описано выше, и были предварительно обработаны *ex vivo* в отсутствие и присутствии 10 мкМ трепростинила, комбинации трепростинил +30 мкМ форсколин (FSK), 10 мкг/мл холерного токсина в течение 1 ч при 37°C. После этого клетки (3×10⁵/мышь) вводили через хвостовую вену. Подсчет лейкоцитов проводили с помощью FACS. Подсчет лейкоцитов проводили каждые 5 дней, начиная с 9 дня (когда количество лейкоцитов было ~1 г/л).

Результаты

Очистка гемопоэтических стволовых клеток

Использование метода на основе MACS позволяет удержать положительные по линейным маркерам (Lin⁺) клетки на магнитных частицах и дает возможность выделения клеток, отрицательных по линейным маркерам (Lin⁻): свойства клеточной популяции были охарактеризованы при помощи FACS. MACS-задержанная популяция клеток действительно была обогащена клетками, которые были окрашены линейно-специфическими маркерами и были лишены рецептора стволовых клеток c-Kit/CD 117 (фиг. 1).

В противоположность этому, клетки, выделенные из элюата колонки, преимущественно были обнаружены в верхнем левом квадранте, т.е. они показывали высокий уровень c-Kit и были лишены APC-Cy7-A флуоресценции, что свидетельствовало об истощении линейных маркеров (фиг. 2).

Популяции клеток дополнительно оценивали путем двойного окрашивания и c-Kit и Sca-1 (антиген стволовых клеток-1): линейно-положительные клетки были лишены этих двух маркеров (фиг. 3A), в то время как линейно-отрицательная фракция экспрессировала высокие уровни c-Kit или сочетания c-Kit и Sca-1 (фиг. 3B).

Накопление циклического АМФ в клетках c-Kit⁺ и Sca1⁺

Пул адениновых нуклеотидов гемопоэтических стволовых клеток (c-Kit⁺ и Sca-1⁺ популяция, смотри фиг. 3B) метаболически поместили [³H]аденином и проверили их ответ на трепростинил и другие агонисты простагландинового рецептора. Поскольку эти клетки показывают весьма умеренный цАМФ-ответ, фермент сенсбилизовали путем использования форсколина. Этот дитерпен связывается в псевдосубстратной щели между каталитическими C1 и C2 доменами аденилатциклазы и делает различные изоформы фермента более легко реагирующими на стимулирующий G белок Gαs (13-15). Как видно из фиг. 4, трепростинил, берапрост и илопрост как таковые (*per se*) вызывали умеренное накопление цАМФ, сравнимое по величине с накоплением, вызванным форсколином 30 мкМ. Однако в сочетании с форсколином

трепростинил вызывал увеличение уровня цАМФ, превосходящее увеличение, вызванное IP-(I протаноид) рецептор-специфическими соединениями илопрост и берапрост. Это можно объяснить, если принять во внимание действие трепростинила на EP(E протаноид)-рецепторы (10). Трепростинил вызывал зависимость от концентрации накопление цАМФ в пределах от 0,1 до 10 мкМ (фиг. 5). Значение EC_{50} находилось в пределах 0,3 мкМ. Трепростинил оказался неспособным повысить уровень цАМФ в Lin^+ фракции гемопоэтических клеток (данные не показаны).

Восстановление костного мозга гемопоэтическими стволовыми клетками (Lin^- , c-Kit⁺, Scf⁺)

Летально облученных мышей восстанавливали с помощью внутривенной инъекцией 3×10^5 Lin^- , c-Kit⁺, Scf⁺ клеток. Количество лейкоцитов начинало увеличиваться с самого низкого уровня на 9 день и медленно увеличивалось в течение последующих нескольких недель. Уровень лейкоцитов в день 60 после инъекции гемопоэтических стволовых клеток был выбран в качестве релевантной конечной точки, так как через 60 дней циркулирующие лейкоциты могли продуцироваться только прижившимися гемопоэтическими стволовыми клетками. Как видно на фиг. 6, мыши, инъецированные предварительно обработанными трепростинилом гемопоэтическими стволовыми клетками, имели существенно более высокие уровни циркулирующих лейкоцитов, чем получившие обработанные носителем гемопоэтические стволовые клетки ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента для непарных данных).

В качестве дополнительного контроля животным инъецировали

(i) клетки, обработанные холерным токсином, поскольку он является наиболее эффективным и стойким активатором G α s,

(ii) форсколином, поскольку, как указано выше, он непосредственно активирует изоформы аденилатциклазы,

(iii) комбинацией форсколина и трепростинила.

Очевидно, что трепростинил был также эффективен в качестве положительного контроля как и холерный токсин, который, как было установлено, является эффективным *ex vivo* воздействием (1,2).

Пример 2.

Выделение костномозговых стволовых клеток

Мышей C57BL/6 и B6SJL забивали и выделяли костномозговые стволовые клетки, как описано в примере 1.

Предварительная обработка выделенных стволовых клеток *in vitro*

Костномозговые стволовые клетки, полученные от мышей C57BL/6 или C6SJL, предварительно обрабатывали *in vitro* холерным токсином (CTX) или комбинацией трепростинил+форсколин (FSK), и стволовые клетки поместили Ly5.2 или Ly5.1.

В первом эксперименте костномозговые стволовые клетки от C57BL/6 мышей использовали без предварительной обработки, а стволовые клетки поместили Ly5.2. Костномозговые стволовые клетки от C6JL были предварительно обработаны *in vitro* холерным токсином или комбинацией трепростинил+форсколин, а стволовые клетки поместили Ly5.1.

Для сравнительных исследований смесь клеток 1:1 Ly5.1+ и Ly5.2+ вводили мышам путем трансплантации костного мозга, и с самого начала было измерено соотношение Ly5.2 и Ly5.1 положительных клеток крови. Далее через 16 недель после трансплантации костного мозга был измерен рост (разрастание) клеток крови. Результаты показаны на фиг. 7, на которой ясно видно, что предварительно обработанные трепростинилом/FSK клетки (Ly5.1+) показывают значительно увеличенное разрастание по сравнению с необработанными клетками и клетками, предварительно обработанными СТ.

Во втором эксперименте костномозговые стволовые клетки от C57BL/6 предварительно обработали *in vitro* холерным токсином или комбинацией трепростинил+форсколин, а стволовые клетки поместили Ly5.2. Костномозговые стволовые клетки от C6JL мышей, помеченные Ly5.1, использовали без какой-либо предварительной обработки.

И в этом случае для сравнительных исследований смесь клеток 1:1 Ly5.1+ и Ly5.2+ вводили мышам путем трансплантации костного мозга, и с самого начала было измерено соотношение Ly5.2 и Ly5.1 положительных клеток крови. Затем через 16 недель после трансплантации костного мозга было измерено разрастание клеток крови. Результаты показаны на фиг. 8, где вновь явно видно, что предварительно обработанные трепростинилом/FSK клетки (Ly5.2+) показывают значительно увеличенное разрастание по сравнению с необработанными клетками и клетками, предварительно обработанными СТ. Таким образом, можно видеть, что эффект трепростинила и форсколина не зависит от источника происхождения клеток костного мозга.

Таким образом, комбинация трепростинила и форсколина увеличивает приживание гемопоэтических стволовых клеток и является столь же или даже более эффективным, как и предварительная обработка холерным токсином.

Ссылки.

1. Adams GB, Alley IR, Chung UI, Chabner KT, Jeanson NT, Lo Celso C, Marsters ES, Chen M, Weinstein LS, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT (2009) Haematopoietic stem cells depend on G α s-mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* **459**:103-107.
2. Dexter TM, Whetton AD, Heyworth CM (1985) Inhibitors of cholera toxin-induced adenosine diphosphate ribosylation of membrane-associated proteins block stem cell differentiation. *Blood* **65**:1544-1548.
3. Long MW, Heffner CH, Gragowski LL (1988) Cholera toxin and phorbol diesters synergistically modulate murine hematopoietic progenitor cell proliferation *Exp Hematol.* **16**:195-200.
4. Freissmuth M, Gilman AG (1989) Mutations of G α s designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG¹⁸⁷ result in loss of GTPase activity. *J Biol Chem* **264**:21907-21914
5. Aksentijevich I, Flinn I (2002) Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. *Cancer Biother Radiopharm* **17**:399-403.
6. Awedan AA (2002) High intensity regimens with autologous hematopoietic stem cell transplantation as treatment of multiple myeloma. *Ann Transplant* **7**:38-43.
7. North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, Weber GJ, Bowman TV, Jang IH, Grosser T, Fitzgerald GA, Daley GQ, Orkin SH, Zon LI (2007) Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* **447**:1007-1011.
8. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* **113**:5444-5455.
9. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, Zon LI (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells и regeneration. *Cell* **136**:1136-1147.
10. Aronoff DM, Peres CM, Serezani CH, Ballinger MN, Carstens JK, Coleman N, Moore BB, Peebles RS, Faccioli LH, Peters-Golden M (2007) Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol* **178**:1628-1634.
11. Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, и Narumiya S (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* **122**:217-224
12. Johnson RA, Alvarez, R, Salomon, Y. (1994) Determination of adenylyl cyclase

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ex vivo предварительной обработки гемопоэтических стволовых клеток (HSC) для улучшения приживления гемопоэтических стволовых клеток, включающий следующие стадии:
 - а) получение образца, содержащего гемопоэтические стволовые клетки;
 - б) смешивание указанного образца по меньшей мере с одним аналогом простациклина, выбранным из группы, состоящей из трепростинила, илопроста, цикапроста или берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, вместе с форсколином, где соотношение аналога простациклина и форсколина составляет 1:3, для получения смеси;
 - в) инкубирование указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимулирования G альфа_s-пути передачи сигнала в указанных клетках.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий выделение стимулированных клеток.
3. Способ по п. 1 или 2, в котором указанный образец является костным мозгом.

4. Способ по п.1 или 2, в котором указанные стволовые клетки получают из пуповинной крови, донорного костного мозга или плаценты.

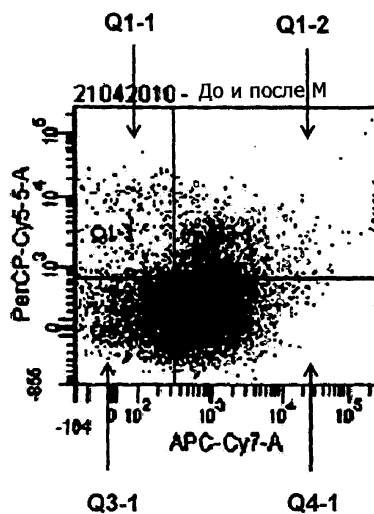
5. Фармацевтическая композиция для улучшения приживления HSC после трансплантации у пациентов с заболеваниями костного мозга, включающая по меньшей мере один аналог простациклина, выбранный из группы, состоящей из трепростинила, илопроста, цикапроста или берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, вместе с форсколином, и стимулированные гемопоэтические стволовые клетки, полученные способом по любому из пп.1-4.

6. Композиция по п.5, изготовленная в форме для внутривенного введения.

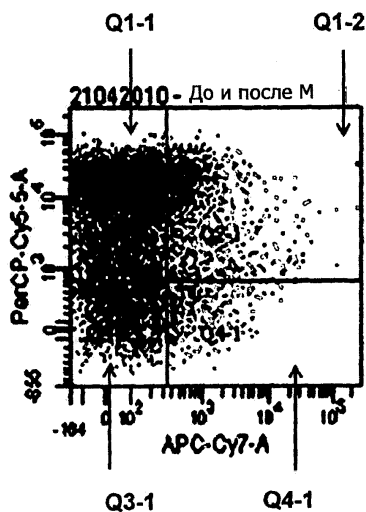
7. Применение композиции по п.5 для лечения индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга.

8. Применение по п.7, в котором заболевание костного мозга представляет собой лейкоз, гемоглобинопатию, нарушение функции нейтрофильных гранулоцитов или заболевания костного мозга, вызванные химиотерапией или облучением.

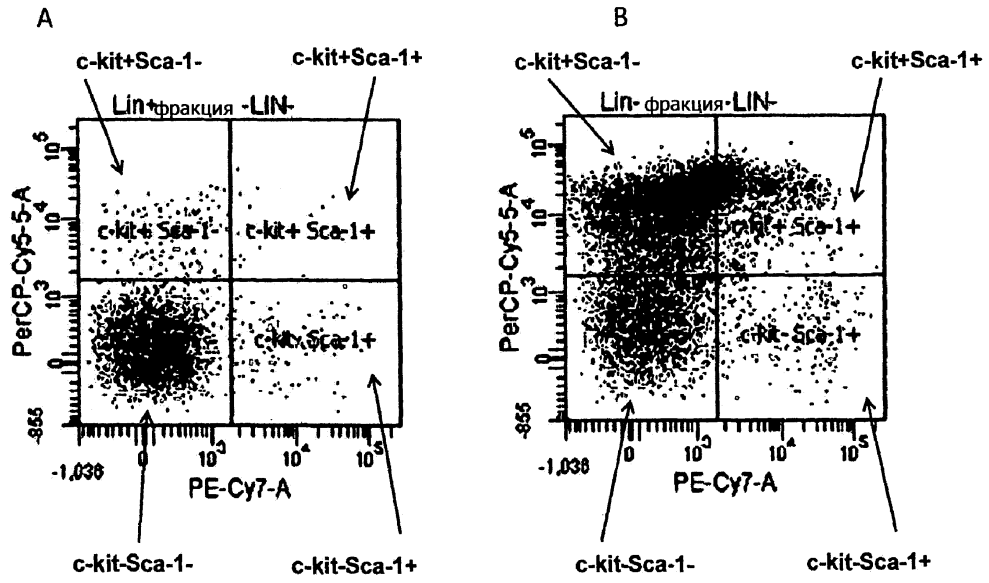
9. Применение по любому из пп.7, 8, где композиция используется после трансплантации костного мозга.



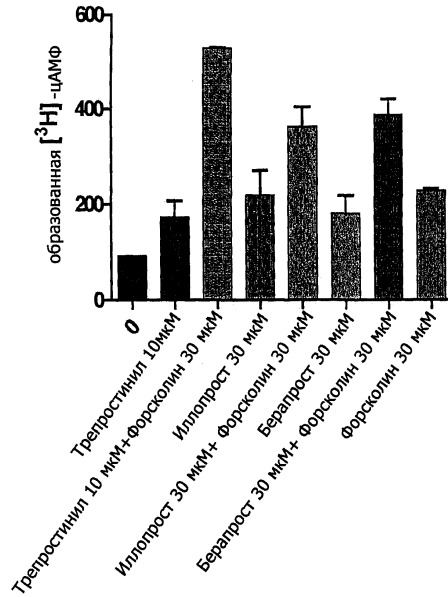
Фиг. 1



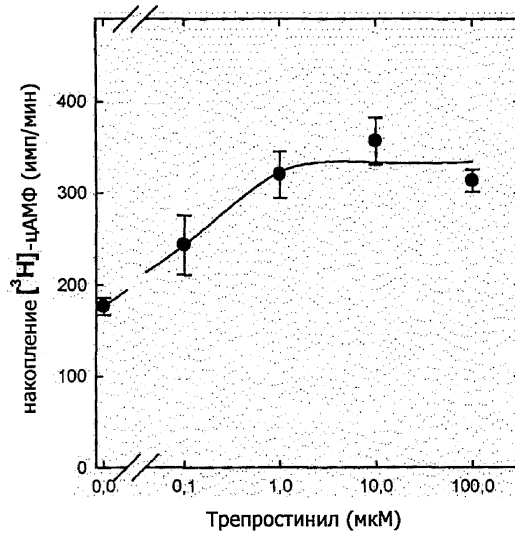
Фиг. 2



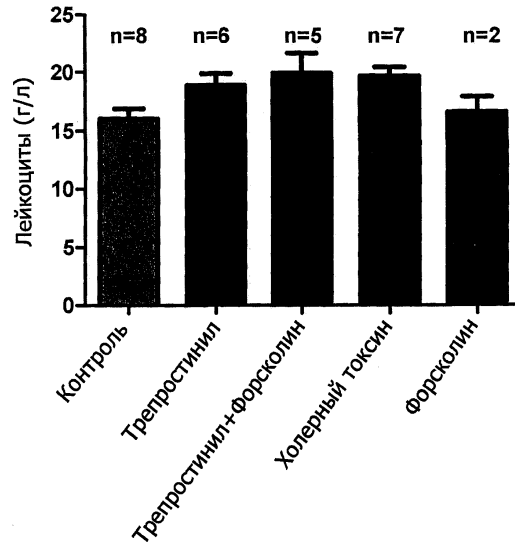
Фиг. 3



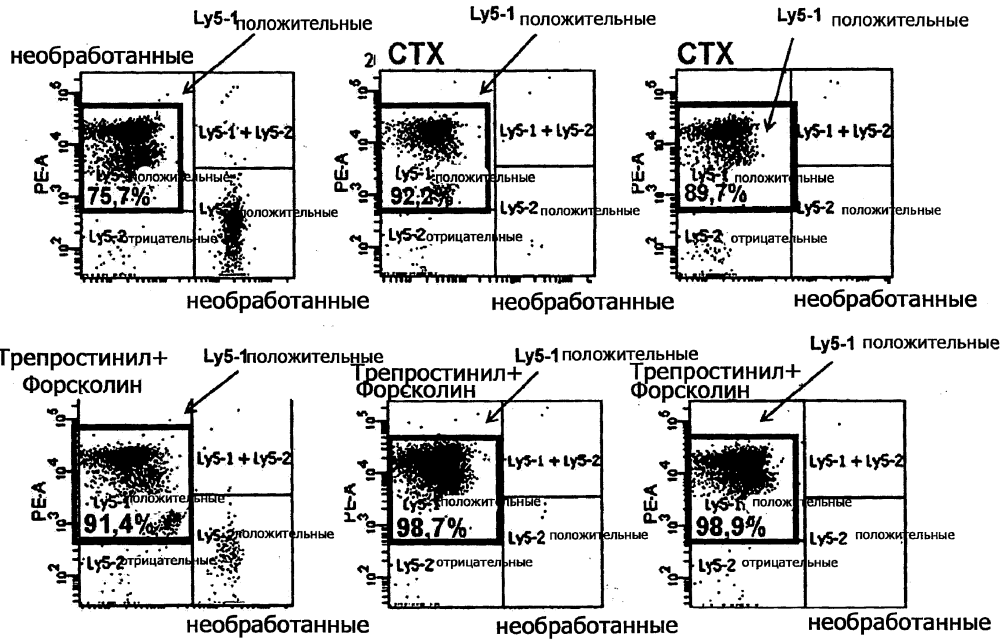
Фиг. 4



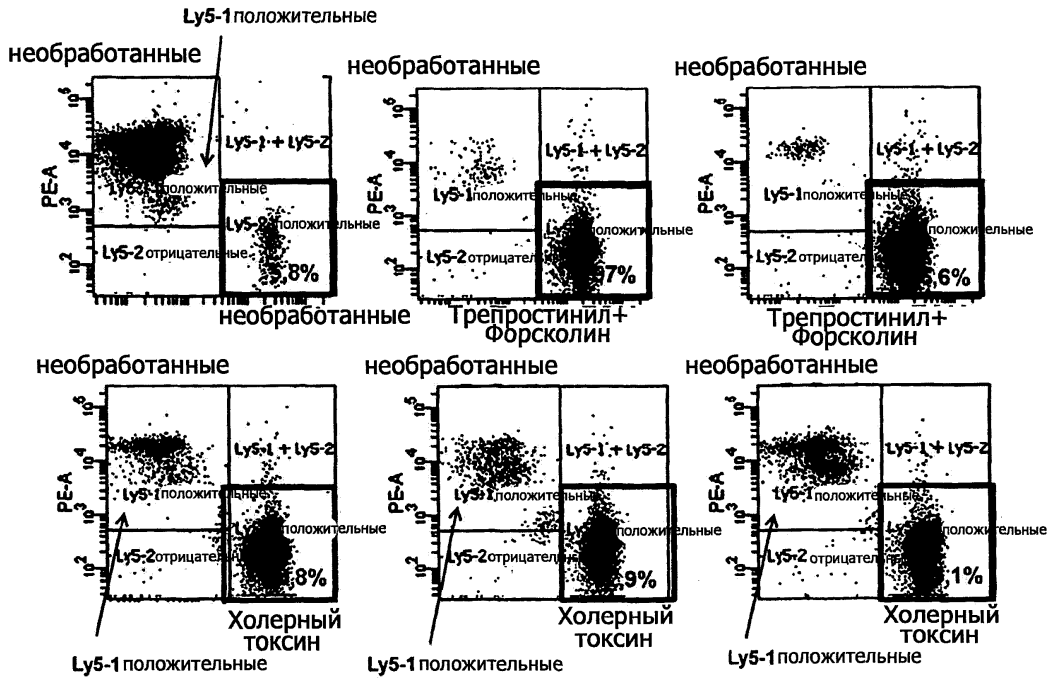
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

