

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 872 698**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/40** (2006.01)  
**A61K 31/403** (2006.01)  
**A61K 31/497** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/522** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)  
**C12N 5/077** (2010.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2016 PCT/EP2016/051672**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120310**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2016 E 16701770 (6)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3250202**

54 Título: **Composición novedosa para su uso en el aumento de la eficacia del injerto de células madre hematopoyéticas después del trasplante**

30 Prioridad:

**27.01.2015 EP 15152664**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2021**

73 Titular/es:

**SCIPHARM SÀRL (100.0%)  
7, Fausermillen  
6689 Mertert, LU**

72 Inventor/es:

**FREISSMUTH, MICHAEL;  
ZEBEDIN-BRANDL, EVA-MARIA y  
KAZEMI, ZAHRA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 872 698 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición novedosa para su uso en el aumento de la eficacia del injerto de células madre hematopoyéticas después del trasplante

5 La presente invención proporciona el nuevo uso de una composición que comprende el inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) vildagliptina para aumentar la migración y el anidamiento de células progenitoras hematopoyéticas en receptores de trasplante de células madre, en donde dichas células progenitoras hematopoyéticas habían sido tratadas *in vitro* antes del trasplante de dichas células con el análogo de prostaciclina Treprostinil para potenciar el injerto de dichas células progenitoras. Específicamente, el pretratamiento se realiza con el análogo de prostaciclina y el potenciador de AMPc forskolina antes del trasplante.

10 Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células primitivas capaces de regenerar todos los hemoderivados a lo largo de la vida de un individuo, equilibrando su auto-renovación con la diferenciación de la progenie. Las HSC experimentan una transición de ubicación durante el desarrollo y circulan en los mamíferos a lo largo de la vida, entrando y saliendo del torrente sanguíneo para participar en los nichos de la médula ósea en etapas sucesivas de anidamiento e injerto. El anidamiento es el proceso por el cual las células madre del donante encuentran su camino  
15 hacia la médula ósea, el injerto de células madre significa su crecimiento en la médula ósea.

Las HSC tienen potencial terapéutico como resultado de su capacidad para restaurar la sangre y las células inmunitarias en los receptores de trasplantes. Además, las HSC tienen el potencial de generar células para otros tejidos tales como el cerebro, los músculos y el hígado. Los métodos de trasplante de médula ósea humana autólogos y alogénicos se utilizan actualmente como terapias para enfermedades tales como la leucemia, el linfoma y otras  
20 enfermedades potencialmente mortales. El trasplante autólogo de médula ósea es un procedimiento convencional que se utiliza para aumentar la ventana terapéutica de los fármacos citotóxicos y, por tanto, permitir la quimioterapia de alta intensidad de dosis (Aksentijevich I, Flinn I (2002) Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. *Cancer Biother Radiopharm* 17:399-403, Awedan AA (2002) High intensity regimens with autologous hematopoietic stem cell transplantation as treatment of multiple myeloma. *Ann Transplant* 7:38-43). Para estos procedimientos, sin embargo, se debe aislar una gran cantidad de médula ósea del donante para garantizar que haya suficientes HSC para el injerto.

25 El tráfico de células, específicamente el anidamiento de HSC, está regulado por varios mecanismos intracelulares diferentes.

En primer lugar, se describe la necesidad de una señal transducida por  $G\alpha_s$  *in vivo* para poblar el nicho de la médula ósea por HSC (Adams GB et al., (2009) Haematopoietic stem cells depend on  $G\alpha_s$ -mediated signaling to engraft bone marrow. *Nature* 459:103-107). Estos hallazgos confirman experimentos *in vitro* anteriores, que demostraron que la activación de  $G\alpha_s$  promueve la supervivencia y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (Dexter TM et al., (1985) Inhibitors of cholera toxin-induced adenosine diphosphate ribosylation of membrane-associated proteins block stem cell differentiation. *Blood* 65:1544-1548, Long MW et al., (1988) Cholera toxin and phorbol diesters synergistically modulate murine hematopoietic progenitor cell proliferation *Exp Hematol.* 16:195-200).  $G\alpha_s$  es la subunidad  $\alpha$  de unión al nucleótido de guanina de la proteína G heterotrímica que estimula las 9 isoformas de la adenilil ciclasa de mamífero unida a la membrana.  $G\alpha_s$  se puede activar constitutivamente *ex vivo/in vitro* tratando las células con la toxina del cólera. Esto se debe a que la toxina del cólera ocasiona la APD-ribosilación del resto de arginina catalítico ( $R^{186/187/201/202}$ , el número exacto de la arginina depende de la variante de empalme de  $G\alpha_s$ ); se requiere un resto de arginina intacto para la hidrólisis de GTP y la desactivación resultante de  $G\alpha_s$  (Freissmuth M, Gilman AG (1989) Mutations of  $G\alpha$  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). De hecho, se puede observar un injerto mejorado después del pretratamiento de células madre hematopoyéticas con toxina del cólera: había aproximadamente el doble (Lin<sup>-</sup>) células precursoras en la médula ósea, si la preparación de células madre se había tratado previamente con toxina del cólera (Adams, 2009). En segundo lugar, las HSC expresan los cuatro receptores de prostaglandina E (EP1-4). El pretratamiento de las células madre hematopoyéticas con prostaglandina E2 (dimetilada) mejora su injerto (North TE, et al., (2007) Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447:1007-1011, 8; Hoggatt J, et al., (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation (*Blood* 113:5444-5455). Este efecto está mediado por la señalización dependiente  $G\alpha_s$  canónica, ya que la activación inducida por AMPc de la proteína quinasa A (PKA) experimenta sinergia con señales dependientes de Wnt para estabilizar la  $\beta$ -catenina (Goessling W et al. (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136:1136-1147).

Además, PGE2 también aumenta la expresión de ARNm y de superficie de HSC CXCR4, mejora su migración al factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) *in vitro* y anidamiento en la médula ósea *in vivo* y estimula la entrada de HSC y la progresión a través del ciclo celular.  
55

Un método para mejorar el injerto de HSC utilizando un análogo de prostaciclina, opcionalmente combinado con forskolina, se describe en el documento WO2012/095511.

También se sabe que el eje SDF-1 -CXCR4 está implicado en el anidamiento celular. El SDF-1 juega un papel fundamental en la regulación del tráfico de HSC normales y su anidamiento y retención en la médula ósea (Kucia et al., Stem Cells, 2005).  
60

De acuerdo con el documento WO2009/152186 A1, la inhibición de la actividad de la peptidasa CD26 (DPP-IV, dipeptidilpeptidasa IV) puede potenciar la actividad de migración y se describe el uso de inhibidores de la peptidasa CD26 para potenciar el anidamiento y el injerto de células.

5 El documento WO 2012/074676 describe una composición para la conservación del hígado que contiene un antagonista de GLP-1 y un inhibidor de DPP-IV.

Hussain Filza et al. informan sobre el efecto de Treprostinil en el trasplante de células madre (BMC Pharmacology, vol 11, núm. Supl 2, 2011, p A6).

El documento US 2008/085264 describe el uso de un inhibidor de DPP-IV/inhibidor de peptidasa CD26 para el pretratamiento para aumentar la eficacia del trasplante de células madre hematopoyéticas.

10 Broxmeyer H. et al. proporcionan una encuesta sobre el trasplante con células madre hematopoyéticas. (STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2013, vol. 22, supl. 1, pág. 103-110) y comentan adicionalmente el uso de dmPGE2 combinado con sitagliptina (Broxmeyer H. y Pelus, L. 2014, Blood Cells, Molecules and Diseases 53, 34-38).

Schwaiger E. et al. divulgan el uso de inhibidores de DPP-IV y divulgan que la presencia de estos inhibidores no implica el injerto de médula ósea (Experimental Hematology, 2011, vol. 40, núm. 2, pág. 97-106).

15 Hoggatt J. et al. informan sobre el uso de PGE2 para estimular las células madre hematopoyéticas (BLOOD, 2009, vol. 113, núm. 22, pág. 5444-5455).

El documento WO2012/095511 describe el tratamiento de células madre hematopoyéticas con Treprostinil y forskolina.

Farag S.S. et al. describen la inhibición de DPP-4 in vivo con sitagliptina para mejorar el injerto de trasplantes de sangre de cordón de una sola unidad (Stem Cells & Dev., 2013, 22, 7, 1007-1015).

20 Focosi D. et al. informan sobre la mejora del injerto de células madre hematopoyéticas utilizando sitagliptina (Leukemia Res., 2009, 33, 178-204).

La localización de las células madre después del trasplante es un factor determinante fundamental para el éxito del trasplante. En la actualidad, se necesita una gran cantidad de células madre para el trasplante ya que las células madre no se injertan fácilmente en la médula ósea y existe un largo período de aplasia de la médula ósea que conduce a una disminución de las células sanguíneas maduras.

25 Por tanto, sigue siendo necesario proporcionar métodos y regímenes de tratamiento para estimular eficazmente las HSC para aumentar el anidamiento, el injerto y la retención de las HSC aisladas en los nichos de la médula ósea de los sujetos sometidos a trasplantes de médula ósea y para reducir el número de HSC necesarias para el trasplante.

**Breve descripción de la invención:**

30 El problema se resuelve mediante las realizaciones de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se basa en la observación de que el anidamiento y el injerto de células madre hematopoyéticas pueden aumentarse con éxito mediante el pretratamiento ex vivo de dichas células madre y/o progenitoras con un análogo de prostaciclina y al menos un potenciador de AMPc y administrando adicionalmente un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV (DPP)-IV al individuo que fue trasplantado con dichas células madre hematopoyéticas.

35 Específicamente, la invención proporciona una composición que comprende vildagliptina para su uso en la mejora del injerto de células madre hematopoyéticas en receptores trasplantados con dichas células madre hematopoyéticas, en donde

40 (a) antes del trasplante, dichas células madre hematopoyéticas han sido pretratadas in vitro con Treprostinil, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y forskolina; y

(b) la composición se administra durante un período de al menos 1 día después del trasplante de dichas células madre hematopoyéticas.

La invención demostró sorprendentemente que la incubación de células madre hematopoyéticas aisladas antes del trasplante, con Treprostinil, junto con el potenciador de AMPc forskolina, y la administración del inhibidor de DPP-IV vildagliptina poco antes y después del trasplante de dichas células a un paciente que lo necesita, aumenta enormemente el anidamiento y la eficiencia del injerto de las HSC.

45 Esto es sorprendente porque la inhibición de DPP-IV (por una gliptina) no es suficiente *per se* para mejorar el trasplante de médula ósea en modelos murinos (Schwaiger E et al., Exp Hematol. feb 2012; 40(2):97-106.)

50 Como se describe en la presente memoria, las células madre hematopoyéticas se incuban con una combinación del análogo de prostaciclina, Treprostinil, y un compuesto capaz de elevar aún más el AMPc, forskolina o inhibidor de la degradación del AMPc (inhibidor de la fosfodiesterasa) vildagliptina. En un modelo animal in vivo, la administración de

un inhibidor de DPP-IV, específicamente de vildagliptina, después del trasplante de dichas células aumenta significativamente la tasa de supervivencia de dichos receptores de células hematopoyéticas en comparación con la administración de un análogo de prostaciclina. Por el contrario, una administración combinada de un análogo de prostaciclina, Treprostinil, y el inhibidor de DPP-IV vildagliptina, después del trasplante de células madre hematopoyéticas pretratadas con Treprostinil y forskolina, son mutuamente antagónicos.

La presente invención es particularmente útil para el tratamiento de un grupo seleccionado de individuos, es decir, individuos que padecen una enfermedad de la médula ósea o una enfermedad relacionada con la médula ósea, específicamente la enfermedad de la médula ósea es leucemia, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, anemia aplásica, enfermedad de células falciformes, un defecto del compartimento de células sanguíneas, enfermedades de la médula ósea inducidas por quimioterapia o irradiación que se someten a un trasplante de células madre utilizando muestras de células madre hematopoyéticas que habían sido pretratadas *in vitro* con el análogo de prostaciclina, Treprostinil, y el potenciador de AMPc, forskolina, antes del trasplante.

Más específicamente, la enfermedad puede ser un defecto del compartimento de células sanguíneas que puede ser hemoglobinopatía o un defecto en la función de los granulocitos neutrófilos, un defecto en los linfocitos T y/o B (p. ej., inmunodeficiencia combinada grave, agammaglobulinemia de Bruton).

Según una realización adicional, el inhibidor de DPP-IV se administra adicionalmente al menos 5, específicamente al menos 10, específicamente al menos 15, específicamente al menos 24 horas antes del trasplante de células madre hematopoyéticas.

En una realización de la presente invención, la vildagliptina se administra durante al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, después del trasplante de células madre hematopoyéticas.

**Figuras:**

Fig.1: La preincubación de células madre y progenitoras hematopoyéticas murinas y humanas en presencia de Treprostinil y forskolina aumenta su migración hacia SDF-1/CXCL12

Fig.2: Inhibición por el antagonista de CXCR4 AMD3100 de la migración inducida por SDF-1/CXCL12 de células madre y progenitoras hematopoyéticas murinas, que habían sido estimuladas en presencia de Treprostinil y forskolina

Fig.3: La vildagliptina mejora la migración de células madre y progenitoras hematopoyéticas, que fueron preincubadas con Treprostinil y forskolina, hacia SDF-1/CXCL12

Fig.4: Vildagliptina y Treprostinil aumentan el anidamiento de las células madre y progenitoras hematopoyéticas, que fueron preincubadas con Treprostinil y forskolina, pero son mutuamente antagónicos cuando se combinan *in vivo*

Fig.5: La administración combinada de Treprostinil y vildagliptina a ratones receptores BALB/c irradiados letalmente, a los que se habían inyectado células madre y progenitoras hematopoyéticas pretratadas *in vitro* con la combinación de Treprostinil y forskolina, es menos eficaz para mejorar la supervivencia de estos ratones que la administración única *in vivo* de vildagliptina o Treprostinil.

Fig. 6: Expresión del receptor de prostanoides (A, B) en células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) murinas y humanas. Se aisló ARN de HSPC murinas (A) y humanas (B) y se sometió a transcripción inversa. El ARN preparado a partir de células cerebrales murinas (cultivo mixto de neuronas y células gliales) y las líneas celulares humanas PC3 y HCT116 sirvieron como controles positivos. La amplificación dependiente de PCR se realizó utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1. Los amplicones para todos los receptores prostanoides E (EP1 a EP4), el receptor prostanoides I (IP) y el receptor prostanoides D-1 (DP1) se resolvieron electroforéticamente en un gel de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La calle marcada con H2O indica el control, donde la amplificación se realizó en ausencia de transcripción inversa previa. El ARNm que codificaba GAPDH se amplificó como referencia interna.

Fig. 7: Comparación de la acumulación de AMPc inducida por Treprostinil y dmPGE2 en HSPC humanas.

Fig. 8: El pretratamiento de HSPC murinas y humanas con Treprostinil y forskolina no induce apoptosis ni altera la progresión del ciclo celular o el potencial de diferenciación. Las HSPC humanas se incubaron con Treprostinil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M durante 1 hora. Posteriormente, se evaluó la inducción de la apoptosis (A, B) y la progresión del ciclo celular (C, D) mediante análisis de citometría de flujo. No se detectó ninguna diferencia en las células apoptóticas o la distribución de las células según las fases G0/1, S y G2 entre las células tratadas y no tratadas (ANOVA de una vía). (E, F). Los datos son las medias  $\pm$  ETM (n = 3).

Fig. 9: El pretratamiento *in vitro* con Treprostinil y forskolina mejora la expresión de CXCR4 (A y B) y CD26/DPPIV (B).

Fig. 10: El pretratamiento *in vitro* con Treprostinil y forskolina potencia la acción de SDF-1 a través de CXCR4.

Fig. 11: La administración in vivo de antagonista de CXCR4 (AMD3100) anula el efecto beneficioso de Treprostínil sobre la supervivencia de los ratones receptores. Las HPSC murinas se pretrataron in vitro con Treprostínil y forskolina como se indica en la leyenda de la Figura 4 y se inyectaron ( $2 \times 10^5$  por ratón) en ratones receptores irradiados letalmente. Posteriormente se dividieron en dos grupos. Los ratones asignados al grupo 1 ( $n = 10$ ) se sometieron adicionalmente a tratamiento *in vivo* con Treprostínil ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1} 8 \text{ h}^{-1}$ ) mientras que los ratones del grupo 2 ( $n = 10$ ) recibieron tanto Treprostínil ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1} 8 \text{ h}^{-1}$ ) y AMD3100 ( $3,3 \text{ mg kg}^{-1} 8 \text{ h}^{-1}$ ) mediante inyección subcutánea cada 8 h durante 10 días. La diferencia entre las dos curvas de supervivencia fue estadísticamente significativa ( $P = 0,007$ , prueba de rango logarítmico).

Fig. 12: El tratamiento in vivo de ratones receptores con vildagliptina sola y Treprostínil, pero no con su combinación, aumenta el anidamiento de las HSPC, que se habían preincubado con Treprostínil y forskolina.

Fig. 13: La administración única in vivo del inhibidor de DPP-IV vildagliptina aumenta el efecto beneficioso del tratamiento in vitro de HSPC con Treprostínil y forskolina sobre la tasa de supervivencia en ratones receptores.

### Descripción detallada

La divulgación técnica detallada que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención per se, y también puede proporcionar antecedentes técnicos para desarrollos técnicos relacionados. Se apreciará que los antecedentes técnicos adicionales proporcionados no están destinados a definir la invención como tal (que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas), sino más bien a colocarla en un contexto técnico más amplio. En consecuencia, se apreciará que los términos "realizaciones", "aspectos", "tema" reflejan detalles específicos de la divulgación, pero en la medida en que se refieren a una parte de los antecedentes técnicos adicionales, no se pretende que se definan como parte del objeto de la invención que no cae dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La provisión de métodos y medios para aumentar el anidamiento y el injerto de células madre hematopoyéticas en el entorno de la médula ósea tiene fuertes implicaciones biológicas y médicas. La localización de las células madre después del trasplante es muy importante para los procedimientos clínicos, ya que actualmente se requieren cantidades masivas de células madre en el trasplante clínico, lo que conduce a la necesidad de grandes cantidades de células del donante. Tales métodos también son muy útiles ya que un número significativo de trasplantes de donantes autólogos contienen un número insuficiente de células madre o HSC. Asimismo, los pacientes a menudo no pueden encontrar donantes histocompatibles, lo que enfatiza la necesidad de métodos y composiciones para reducir el número de HSC necesarias para un trasplante exitoso. La capacidad de mejorar las propiedades de anidamiento e injerto de las HSC *in vitro* o *ex vivo* permite la recolección de menos células de donantes, reduciendo así el tiempo y la incomodidad asociados con la recolección de células madre periféricas/médula ósea, y aumentando el grupo de donantes de HSC dispuestos.

En la presente memoria se divulga un uso novedoso de inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) en el tratamiento de pacientes que se someten a un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas con la condición de que dichas células madre utilizadas para el trasplante se hayan incubado con al menos un análogo de prostaciclina para mejorar la injerto de las células, específicamente con un potenciador de AMPc antes de la administración o devolución de dichas células al organismo de un individuo.

Las células madre y progenitoras hematopoyéticas, específicamente las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) murinas y humanas, expresan varios receptores prostanoideos (es decir, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub>, IP y DP1, Figura 6). Se sabe que el Treprostínil activa específicamente todos los receptores acoplados a G<sub>s</sub>, es decir, receptores EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>, IP y DP1 mientras que dmPGE2 también estimula los receptores EP<sub>3</sub>. Se ha demostrado que Treprostínil estimula el AMPc en células progenitoras hematopoyéticas. En células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas, la curva de concentración-respuesta para Treprostínil fue de más de dos órdenes de magnitud entre 10 y 90% de la respuesta. Esto es compatible con la activación de varios receptores estimuladores. La acumulación de AMPc inducida por Treprostínil se puede potenciar con la combinación con forskolina, un activador directo de la adenilil ciclasa.

Las células madre y progenitoras hematopoyéticas se pueden exponer a la combinación de Treprostínil y forskolina sin ningún efecto detectable sobre su viabilidad y su capacidad para sufrir posteriormente una división y diferenciación celular asimétrica al linaje eritroide y de granulocito/monocito. Por tanto, el número de células necesarias para el trasplante es significativamente menor en comparación con las células necesarias para el trasplante sin tratamiento previo con un análogo de prostaciclina y forskolina.

El pretratamiento de células madre y progenitoras hematopoyéticas con la combinación de Treprostínil y forskolina mejora el injerto de médula ósea en organismos irradiados.

El tratamiento adicional del receptor con Treprostínil *in vivo* mejora adicionalmente el injerto de médula ósea.

Dichos inhibidores de DPP-IV se seleccionan específicamente del grupo de gliptinas.

Como se emplea en la presente memoria y en las reivindicaciones, la forma singular, por ejemplo, "una", "uno", y "el" y "la" incluye el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Específicamente, el análogo de prostaciclina se selecciona del grupo de Treprostinil, Iloprost, Beraprost y Cicaprost o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 El Treprostinil es un análogo sintético de prostaciclina y es metabólicamente estable. El Treprostinil se comercializa como Remodulin™. El Treprostinil es una sal monosódica del ácido (1*R*,2*R*,3*aS*,9*aS*)-[[2,3,3*a*,4,9,9*a*-hexahidro-2-hidroxi-1-[(3*S*)-3-hidroxiocetil]-1*H*-benzo[*f*]inden-5-il]oxi]acético.

El Iloprost se comercializa como "ilomedina" y es un ácido 5-[(*E*)-(1*S*,5*S*,6*R*,7*R*)-7-hidroxi-6[(*E*)-(3*S*,4*RS*)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-bi-ciclo[3,3,0]octan-3-ilideno]pentanoico.

El Beraprost es un ácido 2,3,3*a*,8*b*-tetrahidro-2-hidroxi-1-(3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil)-1*H*-ciclopenta(*b*)benzofurano-5-butanoico.

10 El Cicaprost es un ácido 2-[(2*E*)-2-[(3*aS*,4*S*,5*R*,6*aS*)-5-hidroxi-4-[(3*S*,4*S*)-3-hidroxi-4-metilnona-1,6-diinil]-3,3*a*,4,5,6,6*a*-hexahidro-1*H*-pentalen-2-ilideno]etoxi]acético.

Como se emplea en la presente memoria, el término "análogos de prostaciclina" incluye derivados funcionales y análogos funcionales de dichas sustancias.

15 Los términos "análogo" o "derivado" se refieren a una molécula química que es similar a otra sustancia química en estructura y función, que a menudo difiere estructuralmente en un solo elemento o grupo, que puede diferir en la modificación de más de un grupo (p. ej., 2, 3 o 4 grupos) si conserva la misma función que la sustancia química parental. Tales modificaciones son rutinarias para los expertos e incluyen, por ejemplo, radicales químicos adicionales o sustituidos, tales como ésteres o amidas de un ácido, grupos protectores tales como un grupo bencilo para un alcohol o tiol y grupos terc-butoxilcarbonilo para una amina. También se incluyen modificaciones en las cadenas laterales de alquilo, tales como sustituciones de alquilo (p. ej., metilo, dimetilo, etilo, etc.), modificaciones en el nivel de saturación o insaturación de las cadenas laterales y la adición de grupos modificados tales como fenilo y fenoxi sustituidos. Los derivados también pueden incluir productos conjugados, tales como radicales de biotina o avidina, enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y similares, y radicales radiomarcados, bioluminiscentes, quimioluminiscentes o fluorescentes. Adicionalmente, se pueden añadir radicales a los agentes descritos en la presente memoria para alterar sus propiedades farmacocinéticas, tal como para aumentar la semivida *ex vivo*, o para incrementar sus propiedades de penetración celular, entre otras propiedades deseables. También se incluyen profármacos, que se sabe que mejoran numerosas cualidades deseables de los productos farmacéuticos (p. ej., solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.).

25 El término "derivado" también incluye dentro de su alcance las alteraciones que se han realizado en una molécula parental, incluyendo adiciones, deleciones y/o sustituciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes o funcionalmente mejoradas.

El derivado de Treprostinil se puede seleccionar del grupo de derivados ácidos de Treprostinil, profármacos de Treprostinil, polimorfos de Treprostinil, polimorfos anhidros de Treprostinil o isómeros de Treprostinil.

35 De manera similar, Iloprost, Cicaprost o Beraprost pueden ser derivados del grupo de derivados ácidos, profármacos, polimorfos o isómeros de los mismos.

Posiblemente, se pueden utilizar dos, específicamente tres o más análogos de prostaciclina diferentes en el método inventivo. Alternativamente, se pueden utilizar cuatro, cinco o seis o incluso más análogos de prostaciclina diferentes.

Específicamente, además del análogo de prostaciclina, se puede utilizar prostaglandina E2 (dimetilada).

40 La 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> es un inhibidor competitivo de 15-hidroxi PGDH, pero no es un sustrato de la enzima. Debido a su resistencia al metabolismo por la 15-hidroxi PGDH, tiene una semivida prolongada *in vivo*. La 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> actúa como agonista en la mayoría de los subtipos de receptores EP. La K<sub>D</sub> para activación de receptores EP<sub>2</sub> aislados es de aproximadamente 1 nM.<sup>3</sup> La 16,16-dimetil PGE<sub>2</sub> se utiliza para preservar las propiedades de auto-renovación al tiempo que evita la diferenciación de las células madre hematopoyéticas durante la expansión en cultivo.<sup>4,5</sup>

45 La DPP-IV es una serina aminodipeptidasa unida a membrana no clásica que elimina los dipéptidos Xaa-Pro del extremo amino de polipéptidos y proteínas. Dentro de la médula ósea, la DPP-IV se localiza en microdominios especializados sobre las membranas del estroma del tejido conectivo.

50 Las gliptinas son una clase de hipoglucemiantes selectivos que inhiben la DPP-IV y que se utilizan principalmente en el tratamiento de la diabetes mellitus. Las gliptinas ayudan a reducir la glucosa posprandial al inhibir la descomposición del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), un secretagogo de insulina sintetizado por las células de la pared intestinal en respuesta a los alimentos.

Las gliptinas son sitagliptina, vildagliptina, alogliptina, saxagliptina, linagliptina, anagliptina, teneligliptina, gemigliptina o dutogliptina y cualquier otra gliptina que haya demostrado ser un potente inhibidor de la dipeptidilpeptidasa purificada, soluble o de la superficie celular.

Específicamente, la administración del inhibidor de DPP-IV al individuo puede ser antes, durante o después de la

administración de las HSC que han sido pretratadas de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, los términos "tratar", "pretratar" o "incubación" se pueden utilizar indistintamente. Los términos se utilizan con respecto a células madre hematopoyéticas aisladas que se ponen en contacto con un análogo de prostaciclina y un potenciador de AMPc.

5 Más específicamente, significa que una muestra que contiene células madre hematopoyéticas se mezcla con al menos un análogo de prostaciclina Treprostnil y al menos un potenciador de AMPc forskolina para obtener una mezcla, incubando dicha mezcla durante un período de tiempo suficiente para estimular la señalización de G alfa<sub>s</sub> en dichas células.

10 La composición para su uso puede contener Treprostnil junto con uno de Iloprost, Beraprost o Cicaprost y un potenciador de AMPc, forskolina. Alternativamente, Treprostnil se puede mezclar combinado con más de uno, por ejemplo con otros dos, tres, cuatro o cinco análogos de prostaciclina diferentes, por ejemplo, pero sin limitarse a Iloprost, Beraprost o Cicaprost o sales fisiológicamente aceptables de los mismos combinados con un potenciador de AMPc, específicamente forskolina.

15 Según el uso de la invención, el inhibidor de DPP-IV es vildagliptina y las células madre hematopoyéticas han sido tratadas *in vitro* con Treprostnil y forskolina antes del trasplante.

20 Como se describe en la presente memoria, se puede utilizar el potenciador de AMP cíclico (AMPc) o, como alternativa, un ligando para un receptor de prostaglandina EP para el pretratamiento de las células madre. Los ejemplos de potenciadores de AMPc incluyen, pero no se limitan a, dibutilil-AMPc (DBAMPc), éster de forbol, forskolina, esclarelina, 8-bromo-AMPc, toxina del cólera (CT), aminofilina, 2,4-dinitrofenol (DNP), norepinefrina, epinefrina, isoproterenol, isobutilmetil-xantina (IBMX), cafeína, teofilina (dimetilxantina), dopamina, rolipram, prostaglandina E<sub>1</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>, polipéptido activador de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) y polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), entre otros conocidos en la técnica, se pueden añadir a las células madre o las células madre/Treprostnil o células madre/mezcla de Treprostnil, Iloprost, Cicaprost y/o Beraprost antes de la incubación. Los ejemplos de potenciadores de AMPc también incluyen AMPc y análogos de AMPc, tales como sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS), entre otros.

25 La forskolina está incluida en la composición.

La cantidad de Treprostnil, análogo de prostaciclina, depende del método para preparar HSC estimuladas.

Muy específicamente, para la aplicación inventiva, la concentración efectiva de Treprostnil está en el intervalo de 0,1 μM a 100 μM, específicamente 1 μM a 50 μM, específicamente 5 μM a 25 μM, específicamente aproximadamente 10 μM.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" incluye una desviación del valor numérico de un máximo de 10%, específicamente un máximo de 5%, más específicamente un máximo de 1%. Como ejemplo, el término "aproximadamente 10 μM" define así un intervalo de 9 a 11 μM, específicamente de 9,5 a 10,5 μM, específicamente, de 9,9 a 1,1 μM.

El intervalo de concentración óptimo para el análogo de prostaciclina corresponde a 10 a 30 veces su CE<sub>50</sub> para la estimulación de la acumulación de AMPc en dichas células.

35 La razón de análogo de prostaciclina y forskolina puede ser de aproximadamente 1:3. Las HSC tratadas con forskolina y análogos de prostaciclina se pueden purificar antes de ser reimplantadas, sin embargo, estas HSC también pueden reimplantarse sin más etapas de purificación ya que pueden estar presentes cantidades bajas de forskolina pero no causar efectos secundarios negativos.

40 Según un aspecto específico, la concentración del potenciador de AMPc forskolina utilizado para incubar las células madre puede estar entre 1 μM y 100 μM, específicamente entre 10 μM y 50 μM, aproximadamente 30 μM.

El inhibidor de DPP-IV se administra al menos 5, específicamente al menos 10, específicamente al menos 15, específicamente al menos 24 horas antes del trasplante de células madre hematopoyéticas.

45 Alternativamente, el inhibidor de DPP-IV se puede administrar al paciente antes de la operación, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días antes de someterse al trasplante y/o postoperatoriamente, es decir, al menos 5, específicamente al menos 10, específicamente al menos 15, específicamente al menos 24 horas después del trasplante, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días.

Específicamente, la vildagliptina se puede administrar a un individuo en una cantidad de 50 a 200 mg/d, específicamente 75 a 150 mg/d, específicamente aproximadamente 100 mg/d.

50 Específicamente, la sitagliptina se puede administrar a un individuo en una cantidad de 50 a 200 mg/d, específicamente 75 a 150 mg/d, específicamente aproximadamente 100 mg/d.

Específicamente, la saxagliptina se puede administrar a un individuo en una cantidad de aproximadamente 2,5 a 10 mg/d, específicamente aproximadamente 5 mg/d.

Específicamente, la linagliptina se puede administrar a un individuo en una cantidad de aproximadamente 2,5 a 10 mg/d,

específicamente aproximadamente 5 mg/d.

Específicamente, la alogliptina se puede administrar a un individuo en una cantidad de aproximadamente 12,5 a 50 mg/d, específicamente aproximadamente 25 mg/d.

5 En la presente memoria se divulgan células madre estimuladas, que se pueden administrar directamente a individuos y adicionalmente estimulan el anidamiento y el injerto de dichas células.

Se pretende que "individuo" incluya ampliamente cualquier animal, específicamente mamíferos, específicamente seres humanos que reciben trasplante de células madre pretratadas de acuerdo con la invención.

Las HSC tratadas con vildagliptina y el análogo de prostaciclina Treprostinil se pueden purificar antes de ser reimplantadas, sin embargo, estas HSC también se pueden reimplantar sin etapas de purificación adicionales.

10 El período de tiempo que se necesita para estimular la señalización de G alfa<sub>s</sub> en dichas células se puede medir de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, utilizando mediciones de AMPc de las cuales hay muchas variaciones: RIA, Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET) con EPAC (epac1) (Ponsiouen B. et al., EMBO Reports, 5, 12, 1176-1180 (2004)), métodos radioquímicos, etc. Las células estimuladas en donde se produce la  
15 señalización de G alfa<sub>s</sub> se pueden seleccionar o discriminar o aislar de células no estimuladas mediante métodos conocidos en la técnica como un informador de AMPc basado en FRET.

El período de tiempo necesario para inhibir la actividad de la peptidasa CD26 y eficaz para aumentar la respuesta migratoria a SDF-1 en dichas células se puede medir de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, mediante determinación fluorométrica de la escisión de Ala-Pro-7-amido-trifluorometilcumarina. Alternativamente, la inhibición de la escisión de sustratos naturales tales como CXCL12 o GLP-1 se puede controlar mediante HPLC o ELISA.

20 En un aspecto, el tiempo de incubación de las células respectivas es de aproximadamente 30 min a 24 h, preferiblemente de aproximadamente 1 h y 12 h, preferiblemente de aproximadamente 1 h a 4 h.

Según un aspecto adicional, el tiempo de incubación *in vitro* para el pretratamiento de las HSC con el análogo de prostaciclina y el potenciador de AMPc es al menos 10 minutos, específicamente al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 40 minutos, al menos 50 minutos, al menos 60 minutos.

25 Según un aspecto adicional, se incuban al menos  $1 \times 10^5$  células de donante/mL con el análogo de prostaciclina y el potenciador de AMPc a aproximadamente 37°C.

La vía dependiente de AMPc es una vía esencial para promover el injerto de células madre hematopoyéticas. Se ha demostrado que un análogo de prostaciclina puede desencadenar una elevación de AMPc en células madre hematopoyéticas. Lo hace activando múltiples receptores, es decir, receptores IP y EP, lo que conduce a un aumento  
30 de la señalización de G alfa<sub>s</sub>. En consecuencia, los análogos de prostaciclina como Treprostinil, Iloprost, Cicaprost o Beraprost están aumentando los niveles de AMPc de manera más eficaz.

El término "células madre hematopoyéticas" (HSC) o el término más general "células madre" se entienden como términos equivalentes en la descripción de la presente invención, y generalmente se refieren a "células madre" pluripotentes o multipotentes que dan lugar a los tipos de células sanguíneas, incluidos linajes mieloides (p. ej., monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas)  
35 y linfoides (p. ej., células T, células B, células NK) y otras conocidas en el arte.

Las "células madre" se caracterizan habitualmente por su capacidad para formar múltiples tipos de células (es decir, ser multipotentes) y su capacidad para auto-renovarse. Sin embargo, también se pueden incluir progenitores oligopotentes y unipotentes.

40 El término "célula progenitora" incluye una célula biológica que, como una célula madre, tiene tendencia a diferenciarse en un tipo específico de célula, pero ya es más específica que una célula madre y es empujada a diferenciarse a su célula "diana". Las células progenitoras son descendientes tempranos de las células madre que pueden diferenciarse para formar uno o más clases de células. La diferencia más importante entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre pueden replicarse indefinidamente, mientras que las células progenitoras  
45 pueden dividirse solo un número limitado de veces. La mayoría de las progenitoras se describen como oligopotentes, pueden compararse con las células madre adultas. Se dice que las progenitoras se encuentran en una etapa adicional de diferenciación celular. Están en el "centro" entre las células madre y las células completamente diferenciadas. El tipo de potencia que tienen depende del tipo de célula madre "parental" y también de su nicho. Las progenitoras se pueden moverse por el organismo y migrar hacia el tejido donde se necesitan. Las células madre adultas y las células  
50 progenitoras comparten muchas propiedades.

Las células progenitoras se encuentran en organismos adultos y actúan como un sistema de reparación para el organismo. Reponen células especiales, pero también mantienen la sangre, la piel y los tejidos intestinales. También se pueden encontrar en el desarrollo de tejido pancreático embrionario.

"Hematopoyesis" se refiere generalmente al proceso de diferenciación celular o formación de células sanguíneas especializadas a partir de una HSC. Durante el desarrollo, la hematopoyesis se transloca desde el hígado fetal a la  
55

médula ósea, que a continuación sigue siendo el sitio de la hematopoyesis durante la edad adulta. Una vez establecidas en la médula ósea, las HSC no se distribuyen al azar por toda la cavidad ósea. Más bien, las HSC se encuentran típicamente muy cerca de las superficies endosteales. Las células madre más maduras aumentan en número a medida que aumenta la distancia desde la superficie ósea.

- 5 Los tejidos hematopoyéticos contienen células con capacidad de regeneración a largo y corto plazo, así como progenitores comprometidos multipotentes, oligopotentes y unipotentes.

La muestra que contiene HSC específicamente puede ser médula ósea.

- 10 Las HSC se pueden obtener mediante técnicas conocidas de cualquier fuente que se sepa que contiene HSC, específicamente de sangre periférica, cordón umbilical o sangre de cordón, placenta y médula ósea. Alternativamente, también son posibles fuentes como hígado fetal, bazo fetal y aorta-gónada-mesonefros de animales. Se prefieren las HSC de origen humano para los métodos y composiciones de la invención.

- 15 Por ejemplo, las HSC se pueden encontrar en la médula ósea de los adultos, incluidos los fémures, la cadera, las costillas, el esternón y otros huesos. Las HSC se pueden obtener directamente extrayéndolas de la cadera con una aguja y una jeringa, o de la sangre, a menudo después del tratamiento previo con citocinas, tales como G-CSF (factores estimulantes de colonias de granulocitos), que inducen la liberación de células desde el compartimento de la médula ósea.

- 20 Las HSC se pueden identificar de acuerdo con ciertos marcadores fenotípicos o genotípicos. Por ejemplo, las HSC se pueden identificar por su pequeño tamaño, falta de marcadores de linaje (lin), tinción baja (población lateral) con colorantes vitales tales como rodamina 123 ( $\rho^{10}$ ) o Hoechst 33342, y presencia de varios marcadores antigénicos en su superficie, muchos de los cuales pertenecen al grupo de series de diferenciación (p. ej., CD5, CD11b, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4, Ter-119 y c-kit). Las HSC son principalmente negativas para los marcadores que se utilizan típicamente para detectar el compromiso del linaje y, por lo tanto, a menudo se denominan células lin(-). La mayoría de las HSC humanas se pueden caracterizar como CD5<sup>+</sup>, CD45R (B220)<sup>+</sup>, CD11<sup>+</sup>, GR-1<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Thy/CD90<sup>+</sup>, CD38<sup>low</sup>, c-kit/CD117<sup>+</sup> y lin(-). Sin embargo, no todas las células madre están cubiertas por estas combinaciones, ya que ciertas HSC son CD347<sup>+</sup> y CD38<sup>+</sup>. Además, algunos estudios sugieren que las células madre más tempranas pueden carecer de c-kit en la superficie celular.

- 30 Para la purificación de HSC lin(-) por citometría de flujo, o FACS, se puede utilizar una matriz de anticuerpos marcadores de linaje sanguíneo maduro para agotar las células lin(+) o progenitores multipotentes tardíos (MPP), incluidos, por ejemplo, anticuerpos contra CD3epsilon, CD5, CD45R, CD11b, CD16, GR-1, 7-4 y Ter-119, CD 13, CD32 y CD33, CD71, CD 19, CD61, Mac-1 (CD11b/CD18), Gr-1, 117Ra, CD3, CD4, CD5 y CD8 entre otros conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica métodos de purificación adicionales, por ejemplo, métodos que utilizan la firma particular de la familia de "moléculas de activación de linfocitos de señalización" (SLAM) de moléculas de la superficie celular.

- 35 Las HSC, ya sean de sangre de cordón, médula ósea, sangre periférica u otra fuente, se pueden cultivar o expandir en cualquier medio adecuado, disponible comercialmente o definido personalizado, con o sin suero. Las HSC de origen humano son realizaciones preferidas de la invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el medio sin suero puede utilizar albúmina y/o transferrina. Adicionalmente, se pueden incluir citocinas, tales como ligando Flt-3, factor de células madre (SCF) y trombopoyetina (TPO), entre otros. Las HSC también se pueden cultivar en recipientes tales como biorreactores. Un medio adecuado para la expansión de HSC *ex vivo* también puede comprender células de soporte de las HSC, tales como las células del estroma (p. ej., las células del estroma linforreticular), que se pueden obtener, por ejemplo, de la disgregación del tejido linfoide, y que se ha demostrado que respaldan el mantenimiento, el crecimiento y la diferenciación *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* de las HSC, así como de su progenie.

- 45 "Sangre del cordón" o "sangre del cordón umbilical" se refiere generalmente a una cantidad relativamente pequeña de sangre (hasta aproximadamente 180 mL) de un bebé recién nacido que regresa a la circulación neonatal. La sangre del cordón es rica en HSC y se puede recolectar y almacenar para su uso posterior de acuerdo con mecanismos conocidos en la técnica.

- 50 Los términos "*ex vivo*" o "*in vitro*" se refieren a actividades que tienen lugar fuera de un organismo, tales como la experimentación o las mediciones realizadas en o sobre tejido vivo en un ambiente artificial fuera del organismo, preferiblemente con mínima alteración de las condiciones naturales. En ciertas realizaciones, tales tejidos o células se pueden recolectar y congelar y a continuación, descongelar para el tratamiento *ex vivo*. Los experimentos o procedimientos de cultivo de tejidos que duran más de unos pocos días utilizando células o tejidos vivos se consideran típicamente "*in vitro*" aunque este término se puede utilizar indistintamente con *ex vivo*. Las recitaciones "administración *ex vivo*", "tratamiento *ex vivo*", o "uso terapéutico *ex vivo*", se refieren generalmente a procedimientos médicos en los que uno o más órganos, células o tejidos se obtienen de un sujeto vivo o recientemente fallecido, opcionalmente se purifican/enriquecen, se exponen a un tratamiento o procedimiento para tratar las células madre o progenitoras (p. ej., una etapa de administración *ex vivo* que implica incubar las células con una composición de la presente invención para mejorar las capacidades de injerto de las HSC), y a continuación se administran al mismo individuo o a un individuo diferente después de ese tratamiento o procedimiento opcionales.

La cantidad de inhibidor de DPP-IV administrada a un individuo depende de las características de ese sujeto, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos, así como del grado, gravedad

y tipo de reacción al Treprostinil y/o al trasplante de células.

Los individuos que reciben un trasplante de células madre pueden padecer cualquier enfermedad de la médula ósea, es decir, una enfermedad en donde la arquitectura normal de la médula ósea se ve desplazada por neoplasias, enfermedad de células falciformes, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, anemia aplásica o infecciones que conducen a una disminución de la producción de glóbulos y plaquetas sanguíneas. Dicha enfermedad de la médula ósea puede ser, por ejemplo, leucemia, un defecto del compartimento de las células sanguíneas o la necesidad de un trasplante de médula ósea tras un tratamiento de quimioterapia o irradiación.

Más específicamente, el defecto del compartimento de células sanguíneas puede ser una hemoglobinopatía como la talasemia, defectos en la función de los granulocitos neutrófilos, un defecto en la función de los granulocitos neutrófilos, un defecto en los linfocitos T y/o B, p. ej., inmunodeficiencia combinada grave, agammaglobulinemia de Bruton.

El uso para el tratamiento de personas que padecen enfermedades de la médula ósea, por ejemplo, debido a quimioterapia o irradiación y, por lo tanto, se someten a un trasplante de células madre hematopoyéticas mediante la administración de uno o más inhibidores de la DPP-IV durante un período de tiempo limitado después del trasplante de médula ósea, está cubierto por la presente invención.

Se puede utilizar al menos un análogo de prostaciclina junto con uno o más potenciadores de AMPc para el pretratamiento de células madre aisladas y la administración de uno o más inhibidores de DPP-IV a los pacientes trasplantados para mejorar el injerto de HSC humanas durante trasplantes de médula ósea o tras la reconstitución de la médula ósea mediante el uso de HSC. El injerto acelerado acorta el período en el que los sujetos son susceptibles a infecciones potencialmente letales, hemorragias y otras complicaciones graves. Por lo tanto, un análogo de prostaciclina combinado con una gliptina debería ser una opción terapéutica útil para pretratar la médula ósea del donante para mejorar el injerto de médula ósea (es decir, al reducir el número de células necesarias y acortar la duración de la aplasia de la médula ósea).

El tratamiento continuo de los sujetos durante varios días después del trasplante de médula ósea con un inhibidor de la DPP-IV produce un mejor resultado clínico al mejorar el injerto (es decir, al reducir el número de células necesarias y acortar la duración de la aplasia de la médula ósea).

Así, en un aspecto particular, el tratamiento se realiza al menos durante un día, específicamente cinco días después del trasplante, más específicamente durante al menos 10 días, más específicamente durante al menos 14 días después del trasplante.

El inhibidor de DPP-IV se puede administrar al sujeto mediante cualquier modo aplicable y conocido en la técnica. Más específicamente, se proporciona la administración enteral, intravenosa o subcutánea.

La administración intravenosa es el modo de administración preferido.

Sin embargo, el inhibidor de DPP-IV puede estar en una forma disponible por vía oral seleccionada del grupo de formas de liberación sostenida, comprimidos o cápsulas.

En la presente memoria se describe también un kit de partes que comprende

- a) una cantidad de al menos un análogo de prostaciclina y forskolina en una primera forma de dosificación unitaria,
- b) y una cantidad de al menos un inhibidor de DPP-IV seleccionado entre gliptina,

en forma de dos, tres, cuatro o más unidades separadas de los componentes a) y b), específicamente para su uso en el tratamiento de una enfermedad de la médula ósea, específicamente la enfermedad de la médula ósea es la leucemia, un defecto del compartimento de las células sanguíneas, enfermedades de la médula ósea inducidas por quimioterapia o irradiación.

Además, en la presente memoria se describe un paquete que comprende el kit junto con las instrucciones de uso.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son meramente representativos de métodos para poner en práctica una o más realizaciones de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### Ejemplos:

##### Ejemplo 1:

##### Ensayo de migración *in vitro*

Se pretrataron células progenitoras hematopoyéticas murinas *in vitro* con la combinación de Treprostinil (Trep) 10  $\mu$ M y forskolina (Fsk) 30  $\mu$ M (Sigma Aldrich, Viena, Austria) o vehículo durante 1 hora a 37°C en medio de células madre que contenía factor de crecimiento [(StemSpan™ (SFEM) (Stemcell Technologies, EE.UU.) (50 ng/mL de factor de células madre murinas (SCF), 50 ng/mL de ligando de tirosina quinasa-3 similar a fms (Flt3), 50 ng/mL de interleucina 11 (IL11) y 150 ng/mL de interleucina 3 murina (mIL3)] adquirido a PeproTech (Londres, Reino Unido)).

Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/mL en medio.

La suspensión celular (0,1 mL que contenía  $2 \times 10^5$  células) se añadió a la cámara superior de placas Transwell™ (diámetro de poro de 5  $\mu\text{m}$ ). La cámara inferior se siguió con medio o medio que contenía 100 ng/mL de factor 1 derivado del estroma murino (SDF-1 = CXCL12). Se permitió que las células migraran durante 4 h a 37°C.  
5 Posteriormente, se determinó el número de células recuperadas de la cámara inferior mediante un contador de células. El número de células migradas se expresó como porcentaje del total de células añadidas a la cámara superior.

Las células CD34+ derivadas de la sangre del cordón umbilical humano se mantuvieron en medio de células madre [X-VIVO™ 15 (Lonza, Suiza), con un suplemento de 50 ng/mL de Flt3 humano, 50 ng/mL de trombopoyetina humana y 50 ng/mL de (SCF) humano, adquirido a PeproTech (Londres, Reino Unido)]. El ensayo de migración se realizó  
10 como se describe para las células murinas, con la excepción de que se añadió SDF-1 humano recombinante a la cámara inferior. Los datos mostrados representan medias  $\pm$  ETM de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnett (\*,  $p < 0,05$ ).

Los datos se muestran en la Figura 1.

### 15 **Ejemplo 2:**

Inhibición por el antagonista de CXCR4 AMD3100 de la migración inducida por SDF-1/CXCL12 de células progenitoras hematopoyéticas murinas, que habían sido estimuladas en presencia de Treprostnil y forskolina

Las células madre y progenitoras hematopoyéticas se preincubaron con Treprostnil (10  $\mu\text{M}$ ; T) y forskolina (30  $\mu\text{M}$ ; F) durante 1 h a 37°C, se lavaron y se resuspendieron a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/mL. La suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células en 0,1 mL) se añadió a la cámara superior de la placa Transwell™, que contenía medio con y sin antagonista de CXCR4 AMD3100 10  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{M}$ ). El medio de la cámara inferior contenía 100 ng/mL de SDF-1 murino. La incubación duró 4 h a 37°C; posteriormente, las células recuperadas en la cámara inferior se contaron como se indica en la leyenda de la Fig. 1. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ETM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de comparaciones múltiples de Dunnett (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).  
20  
25

El antagonista de CXCR4 AMD3100 inhibe la migración inducida por SDF-1/CXCL12 de células progenitoras hematopoyéticas murinas, que fueron estimuladas en presencia de Treprostnil y forskolina.

Los datos se muestran en la Figura 2.

### **Ejemplo 3:**

30 La vildagliptina mejora la migración inducida por SDF-1/CXCL12 de células progenitoras hematopoyéticas, que habían sido preincubadas con Treprostnil y forskolina.

Se preincubaron células progenitoras hematopoyéticas murinas (mHPC; panel izquierdo) y células CD34+ humanas derivadas de sangre del cordón umbilical (panel derecho) en ausencia o presencia de Treprostnil (10  $\mu\text{M}$ ; T) y forskolina (30  $\mu\text{M}$ ; F) durante 1 h. Después de eso, se añadió la suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células en 0,1 mL) a las  
35 cámaras superiores de las placas Transwell™, que contenían medio con o sin vildagliptina 30 nM (Vil). El medio de la cámara inferior contenía 100 ng/mL de SDF-1 murino o humano, según fuera apropiado. La incubación duró 4 h a 37°C; después de eso, las células recuperadas en la cámara inferior se contaron como se indica en la leyenda de la Fig. 1. Los datos mostrados son medias  $\pm$  ETM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples de Dunnett (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).  
40

Los datos se muestran en la Figura 3.

### **Ejemplo 4:**

#### **Ensayo de anidamiento in vivo**

45 La vildagliptina y el Treprostnil aumentan el anidamiento de células progenitoras hematopoyéticas, que fueron preincubadas con Treprostnil y forskolina, pero son mutuamente antagonísticos cuando se combinan *in vivo*.

Se aislaron células madre y progenitoras hematopoyéticas murinas de ratones donantes BALB/c de 6-8 semanas (15 ratones) mediante clasificación magnética de células utilizando anticuerpos específicos de linaje que retuvieron células de linaje mieloide, eritroide, megacariocítico y linfoide y microesferas MACS (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las células sca1+, c-Kit+, de linaje negativo (Lin-) se preincubaron  
50 en ausencia (control de vehículo = células no tratadas) y presencia de la combinación de Treprostnil (10  $\mu\text{M}$ ) y forskolina (30  $\mu\text{M}$ ) (= células tratadas) durante 1h.

Las células madre progenitoras hematopoyéticas (no tratadas y tratadas) ( $1 \times 10^6$  células) se inyectaron posteriormente a través de la vena de la cola en ratones receptores BALB/c irradiados letalmente (9 Gy). Los ratones receptores no

recibieron ningún tratamiento adicional (barras marcadas como células no tratadas y células tratadas) o a los ratones se les inyectaron Treprostinil (3 µg/8 h; barras marcadas como "trep *in vivo*"), vildagliptina (10 mg/kg/24 h; barras marcadas como "vil *in vivo*") o la combinación de Treprostinil y vildagliptina (barras marcadas como "trep + vil *in vivo*") comenzando 24 h antes del trasplante de médula ósea.

5 La capacidad de las células para anidar en la médula ósea se evaluó después de 20 h mediante un ensayo de formación de colonias. El fémur y las tibias se lavaron abundantemente con PBS para recolectar células de la médula ósea. Los glóbulos rojos se eliminaron mediante tampón de lisis de glóbulos rojos (Stemcell Technologies, EE.UU.). Las células restantes se resuspendieron en un medio semisólido basado en metilcelulosa (MethoCult, Stemcell Technologies, EE.UU.). Cada condición se evaluó por triplicado. Se añadieron factores de crecimiento específicos para apoyar la formación de unidades formadoras de colonias, granulomonocitos (CFU-GM) y unidades formadoras de colonias de eritrocitos (CFU-E), es decir, eritropoyetina 3U/mL, IL3 10 ng/mL, IL7 10 ng/mL, GM-CSF 10 ng/mL. Los cultivos se mantuvieron durante 6 días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se contó el número de colonias bajo el microscopio. Por definición, estas colonias surgieron de aquellas células que habían sido inyectadas y habían migrado a la médula ósea, ya que la médula ósea endógena de los ratones receptores había sido destruida por irradiación. Por consiguiente, no se obtuvieron colonias si se sembró en placa médula ósea de ratones irradiados, a los que no se habían inyectado células progenitoras hematopoyéticas (control negativo).

Es evidente que (i) la preincubación *in vitro* con Treprostinil y forskolina aumento el anidamiento (véanse las barras marcadas como no tratados y tratados),

20 (ii) el único tratamiento de los ratones receptores con Treprostinil y/o vildagliptina no promovió el anidamiento (véase la segunda barra "no tratados" con las barras 3 a 5 marcadas como "+ trep *in vivo*", "+ vil *in vivo*", "+ trep + vil *in vivo*"),

(iii) el tratamiento de los ratones receptores, a los que se habían inyectado células tratadas, con Treprostinil o con vildagliptina promovieron el anidamiento (véanse la sexta barra "no tratados" con la barras 7 y 8 marcadas como "+ trep *in vivo*", "+ vil *in vivo*"), pero

25 (iv) que la combinación (última barra de la derecha marcada como "+ trep + vil *in vivo*") fue menos eficaz que cualquier compuesto administrado solo (barras 7 y 8 marcadas como "+ trep *in vivo*", "+ vil *in vivo*"). Por lo tanto, cuando se combinan *in vivo*, Treprostinil y vildagliptina son mutuamente antagonicos.

La vildagliptina y el Treprostinil aumentan el anidamiento de células progenitoras hematopoyéticas, que fueron preincubadas con Treprostinil y forskolina, pero son mutuamente antagonicos cuando se combinan *in vivo*. Los datos se muestran en la Figura 4.

### Ejemplo 5:

#### Ensayo de injerto *in vivo*

La administración combinada de Treprostinil y vildagliptina a ratones receptores BALB/c irradiados letalmente, a los que se inyectaron células progenitoras hematopoyéticas pretratadas *in vitro* con la combinación de Treprostinil y forskolina, es menos eficaz para mejorar la supervivencia de estos ratones que la administración *in vivo* sola de vildagliptina o Treprostinil.

Las células progenitoras hematopoyéticas se aislaron de médula ósea de ratones donantes (BALB/c) como se indica en la leyenda de la Fig. 4. Las células se trataron *in vitro* con Treprostinil 10 µM y forskolina 30 µM o vehículo durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se inyectaron 0,2x10<sup>6</sup> células progenitoras hematopoyéticas de linaje negativo a través de la vena de la cola en ratones receptores BALB/c (10/grupo) irradiados letalmente (9 Gy). Si no se trata previamente *in vitro* con la combinación de Treprostinil y forskolina, este número de células progenitoras hematopoyéticas es demasiado bajo para rescatar a los animales receptores. En consecuencia, el grupo de ratones, que recibió células que no habían sido pretratadas, murió en el plazo de la primera semana (línea de color negro, CTRL). El número límite de células madre hematopoyéticas fue suficiente para rescatar 50% de los ratones, que habían recibido células pretratadas y a continuación, se trataron con Treprostinil (3 µg/8 h s.c. durante 10 días; curva de color rojo marcada como células pretratadas *in vitro* + tratamiento *in vivo* de ratones receptores con Treprostinil). El régimen más eficaz fue la inyección de células progenitoras hematopoyéticas pretratadas seguida de la administración de vildagliptina (10 mg/24 h s.c.): todos los ratones (es decir, 10 de cada 10) sobrevivieron (curva marcada como células pretratadas *in vitro* + tratamiento *in vivo* de ratones receptores con vildagliptina). Por el contrario, los ratones que recibieron la combinación de Treprostinil (3 µg/8 h) y vildagliptina (10 mg/kg/24 h) tuvieron el peor resultado de todos los ratones receptores que habían recibido células pretratadas: solo 2 de cada diez ratones sobrevivieron (línea de color gris marcada como células pretratadas *in vitro* + tratamiento *in vivo* de ratones receptores con la combinación de Treprostinil y vildagliptina). Las inyecciones de fármaco (es decir, administración de Treprostinil y/o vildagliptina mediante inyecciones subcutáneas) se iniciaron inmediatamente después del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y se continuaron durante 10 días. Todas las curvas son significativamente diferentes entre sí (prueba de rango logarítmico).

La administración combinada de Treprostinil y vildagliptina a ratones receptores BALB/c irradiados letalmente, a los que se inyectaron células progenitoras hematopoyéticas pretratadas *in vitro* con la combinación de Treprostinil y

forskolina, es menos eficaz para mejorar la supervivencia de estos ratones que la administración *en vivo* sola de vildagliptina o Treprostinil. Los datos se muestran en la Figura 5.

### Ejemplo 6:

5 Los autores de la presente invención exploraron las condiciones bajo las cuales se mejoró adicionalmente la acción de Treprostinil y forskolina. Esto se basó en la observación de que la acción de la combinación de Treprostinil y forskolina estaba mediada al menos en parte por la inducción del receptor CXCR4 (es decir, el receptor del factor 1 derivado del estroma de quimiocina = SDF1 = CXCL12). Además, los autores de la presente invención compararon el efecto de dimetil-PGE2 y Treprostinil sobre la acumulación de AMPc por las HSPC humanas.

### Materiales y métodos

#### 10 **Aislamiento de células madre y progenitoras hematopoyéticas murinas y humanas**

Se sacrificaron diez ratones (C57BL/6 o Balb/C) mediante dislocación cervical. Los huesos largos de las extremidades traseras (es decir, fémures y tibias) se liberaron de tejido muscular y conectivo y se lavaron con medio RPMI utilizando una jeringa y una aguja de 27½ G. La suspensión celular se liberó del tejido conectivo visible, se recogió y se transfirió a tubos de centrifuga. Las células se cosecharon por centrifugación (1200 rpm/~ 100 g durante 5 min) y se resuspendieron en 3 mL de tampón de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH ajustado de 7,2 a 7,4). La suspensión celular se incubó durante 2 min a 20°C seguido de 4 min en hielo. A continuación, se añadió RPMI (10 mL) y las células se cosecharon por centrifugación y se contaron. El rendimiento típico de células fue 3 \* 10<sup>7</sup>/ratón.

20 Las células se resuspendieron en PBS (solución salina tamponada con fosfato) enfriado con hielo que contenía FCS (suero de ternero fetal) al 2% a una densidad celular de 2,5 \* 10<sup>8</sup> células/mL a lo que se añadió un cóctel de anticuerpos biotinilados ("Lineage Cell Depletion Kit" de Miltenyi Biotec) que contenía anticuerpos específicos del linaje dirigidos contra CD5, CD45R (B220), CD11b, GR-1 (= Ly-6G/C), 7-4 y Ter-119 a una razón de 0,1 mL de solución de anticuerpo por 10<sup>8</sup> células. Las células se incubaron durante 20 min en hielo con los anticuerpos y se sedimentaron mediante centrifugación. Después de la resuspensión (3,3 \* 10<sup>8</sup> células/mL), se añadieron las segundas MicroBeads recubiertas con antibiotina (0,2 mL/10<sup>8</sup> células, provistas del "Lineage Cell Depletion Kit" de Miltenyi Biotec) a la suspensión celular y la mezcla se incubó durante 15 min en hielo. Posteriormente, la muestra se diluyó en tampón MACS (30 mL), las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 6 mL de tampón MACS. Esta suspensión se cargó en columnas LS preempaquetadas, que contenían esferas ferromagnéticas recubiertas con un material plástico compatible con las células. Normalmente, se emplearon tres columnas para (2 mL de suspensión de células/columna). El flujo continuo contenía las células negativas para el marcador de linaje (células Lin<sup>-</sup>), mientras que las células de linaje comprometido se retuvieron en la columna. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se resuspendieron en 2 mL de PBS. El rendimiento típico fue 7 \* 10<sup>5</sup> células lin<sup>-</sup>/ratón.

35 Se cosecharon células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas (HSPC) de cordones umbilicales de donantes sanos: se recogieron muestras de sangre del cordón umbilical (≈ 50 mL) durante partos sanos a término. Las células CD34<sup>+</sup> se aislaron utilizando el Kit de Aislamiento Directo de Células Progenitoras CD34 con clasificador de células activado magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec) y se expandieron como se describe (3). Brevemente, la sangre del cordón se diluyó con un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS); esta suspensión (25 mL) se colocó en capas sobre LymphoPrep™ (un medio de densidad obtenido a través de Nycomed que contiene una mezcla de triatoato de sodio y polisacáridos). Los tubos se centrifugaron en un rotor de cubeta oscilante durante 30 min a 355 g. La capa que contenía células mononucleares se recogió, se diluyó con PBS (hasta 50 mL) y se centrifugó a 400 g durante 8 min para eliminar el LymphoPrep™ residual. Los eritrocitos se eliminaron mediante lisis en tampón que contenía NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM y EDTA 0,1 mM (pH ajustado de 7,2 a 7,4 con HCl) durante 10 min a 4°C. Se determinó el número de células mononucleares y se ajustó a 2 \* 10<sup>8</sup> células/mL en el tampón MACS proporcionado con el Kit de Aislamiento. Se añadió el Cóctel de Selección Positiva EasySep® (suspensión celular 0,1 mL/mL), la suspensión se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se añadieron nanopartículas magnéticas EasySep® (50 µL/mL). Después de una incubación adicional durante 10 min a temperatura ambiente, la suspensión celular se diluyó a 2,5 mL mediante la adición de medio. El tubo se colocó en el imán durante 5 min y posteriormente se recogieron las células. Esta etapa se repitió 5 veces. Las células enriquecidas se propagaron durante 6 días (es decir, dos duplicaciones de población) en cultivos en suspensión que contenían medio X-VIVO15 sin suero (BioWhittaker) con un suplemento de GlutaMAX (2,5 mM; Gibco/Invitrogen) y penicilina/estreptomina (P/S; 125 U/mL cada una) y Flt3L, SCF y TPO (cada uno a 50 ng/mL). Los rendimientos típicos fueron 9 \* 10<sup>5</sup> células CD34<sup>+</sup>/espécimen de sangre de cordón, que se expandieron para obtener 3,5 \* 10<sup>6</sup> células. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Médica de Viena para estos estudios. El consentimiento informado se proporcionó de acuerdo con la Declaración de los Principios de Helsinki.

#### 55 **Citometría de flujo**

La pureza de las preparaciones de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) murinas y humanas se evaluó mediante citometría de flujo. Los anticuerpos empleados para la tinción de marcadores de superficie celular procedían de las siguientes fuentes: los anticuerpos del panel de linaje de ratón eran de Becton Dickinson Biosciences (BD 559971, que contenían productos biotinilados de anti-CD3ε, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-Ly-6G/Ly-6c, anti-Ter-119), el CD16/CD32 anti-ratón de rata purificado por afinidad (bloque de ratón Fcγ<sub>II/III</sub>, BD 553142) y el colorante

fluorescente estreptavidina-alofococianina-Cy7 (estreptavidina APC-Cy7, BD554063) también eran de Becton Dickinson Biosciences. Anti-Ly6A/E de ratón marcado con ficoeritrina (PE)-Cy7 (= antígeno de células madre -1 = Sca1), anti-CD117 de ratón (c-Kit) con PE-Cy7 (núm. de catálogo 25-5981-82) y PE-Cy5 (núm. de catálogo 15-1171-81) eran de eBiosciences.

5 Directamente después de MACS,  $1 \times 10^6$  células de linaje positivo (Lin+) y negativo (Lin-) se transfirieron a tubos FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) y se almacenaron en hielo en 50  $\mu$ l de PBS. Mientras tanto, los siguientes anticuerpos adecuados para FACS se diluyeron (1:50) y se mezclaron en PBS: anti CD16/CD32 purificado (para bloquear los receptores de Fc), anti-CD3 $\epsilon$  biotinilado, anti-CD11b biotinilado, anti-CD45R biotinilado, anti-Ly-6G/Ly-6C biotinilado y anti-Ter-119 biotinilado, APC-Cy7 marcado con estreptavidina, anti-Sca-1 marcado con PE-Cy7, anti-c-kit marcado con PE-Cy5. Esta mezcla maestra (50  $\mu$ l) se añadió a cada muestra, que a continuación, se  
10 mezcló mediante agitación suave con vórtex y se incubó a 4°C en la oscuridad durante 15 min. Posteriormente, las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron en 2 mL de PBS y se resuspendieron en PBS. Las muestras se analizaron en un FACS Canto II (Becton Dickinson). El procedimiento de acotamiento de subpoblaciones de interés fue el siguiente: las ventanas de análisis para las células vivas se establecieron registrando la dispersión hacia adelante y hacia los lados. Las células vivas se discriminaron adicionalmente basándose en la expresión de  
15 marcadores de linaje (es decir., CD11b, CD45R, Ly-6G/Ly-6C, Ter-119). Esto permitió definir las ventanas de análisis para las células Lin<sup>-</sup>, que se analizaron adicionalmente para la determinar la expresión de Sca-1 y c-Kit.

La citometría de flujo también se utilizó para controlar la expresión de CXCR4 y CD26/DPPIV (dipeptidilpeptidasa-IV) por HSPC humanas. Se midió la expresión de CXCR4 y CD26/DPPIV después del tratamiento con Treprostinil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M durante 2 h, 4 h y 6 h. Después de la incubación, las células CD34<sup>+</sup> humanas se lavaron y se tiñeron con anticuerpos (eBioscience) para determinar CXCR4 y CD26 de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se  
20 cuantificaron mediante análisis FACS. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes por separado y a continuación, se promediaron los datos para el análisis estadístico. Los datos se presentan como media  $\pm$  ETM y las comparaciones se realizaron utilizando ANOVA de una vía.

### 25 **Ensayo de acumulación de $^3\text{H}$ JAMPc**

Se preincubaron en primer lugar células madre y progenitoras CD34<sup>+</sup> hematopoyéticas humanas (HSPC,  $4 \times 10^5$ /mL) durante 16 h en ausencia/presencia de 100 ng/mL de toxina pertussis (Sigma Aldrich) en medio X-VIVO15 con un suplemento de factores de crecimiento seguido de marcaje metabólico de la reserva de nucleótidos de adenina durante un período de incubación adicional de 4 h en [ $^3\text{H}$ ]adenina (Perkin Elmer, 1  $\mu$ Ci/mL) en el medio X-VIVO15 con un  
30 suplementado de factores de crecimiento y 10  $\mu$ g/mL de adenosina desaminasa (Roche). Después de eso, las células se sensibilizaron con Treprostinil 1 o 10  $\mu$ M, dimetil-PGE2 (dmPGE2) 1 o 10  $\mu$ M, forskolina (30  $\mu$ M) o la combinación de forskolina y prostanoïdes durante 30 min. A continuación, se sedimentaron las células (5 min a 100 g), se eliminó el medio y se lisó el sedimento en ácido perclórico al 2,5% enfriado con hielo (0,9 mL) que contenía AMPc 0,1 mM, se mantuvo en hielo durante 1 h y se neutralizó con KOH 4,2 M (0,1 mL). El ATP y el AMPc se separaron mediante  
35 cromatografía secuencial en columnas que contenían Dowex AG50-X8 y alúmina neutra (3).

### **Viabilidad celular, distribución del ciclo celular y formación de colonias**

Se incubaron HSPC humanas o murinas en presencia de vehículo o la combinación de Treprostinil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M a 37°C durante 1 h y 24 h. Después de lavar con PBS a 4°C, las células se tiñeron para determinar fosfatidilserina externalizada con el PE Annexin-V Apoptosis Detection Kit I® de acuerdo con el protocolo del fabricante  
40 o para determinar el contenido de ADN con PI (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> en PBS) durante 40 min a 37°C. Los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron con el soporte lógico FACS Diva®. La formación de colonias de HSPC murinas se determinó de la siguiente manera: después de una incubación durante 1 h en presencia de Treprostinil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M, las células se resuspendieron en MethoCult® que contenía GM-CSF e IL-3 (10 ng mL<sup>-1</sup> cada uno) para la formación de CFU-GM y 3 U mL<sup>-1</sup> de EPO e IL-3 para CFU-E, y se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 7-  
45 10 días. El número de colonias se contó con un microscopio óptico.

### **Ensayo de migración**

Se estimularon Células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de linaje negativo murinas de médula ósea de ratones donantes BALB/c y HSPC CD34<sup>+</sup> humanas aisladas de la sangre del cordón umbilical con la combinación de Treprostinil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M durante 1 hora en el medio de células madre murinas (SFEM™; 50 ng mL<sup>-1</sup> de cada factor de crecimiento; SCF, Flt3, IL11 y 150 ng mL<sup>-1</sup> de IL3) o medio de células madre humanas (X-VIVO™ 15, 50 ng mL<sup>-1</sup> de cada TPO, FL3 y SCF). Después del lavado, la suspensión celular ( $2 \times 10^6$  células en 0,1 mL) se colocó en la cámara superior de un Transwell™ (6,5 mm de diámetro, tamaño de poro de 3  $\mu$ m). La cámara inferior se cargó con 300  $\mu$ l de medio que contenía factores de crecimiento y 100 ng mL<sup>-1</sup> SDF-1. Cuando se indica, tanto la cámara superior como la inferior se complementaron con vildagliptina 30 nM. Se determinó la quimiotaxis para SDF-1 después  
50 de 4 horas de incubación a 37°C. Las HSPC, que habían migrado a la cámara inferior, se contaron en un contador de células. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Ensayo de anidamiento**

Las HSPC de linaje negativo se aislaron de células de médula ósea completas de ratones donantes B6.SJL-PtrcAPep3B/Boyl (CD45.1+) utilizando microesferas MACS (véase más arriba). Las células fueron tratadas *in vitro* con

Treprostiniil 10  $\mu\text{M}$  y forskolina 30  $\mu\text{M}$  o control de vehículo durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se inyectaron  $0,2 \times 10^6$  células CD45.1<sup>+</sup> de linaje negativo en los ratones receptores C57Bl/6 (CD45.2<sup>+</sup>) irradiados letalmente (10 Gy). Los ratones receptores también fueron tratados *in vivo* con Treprostiniil (0,15 mg kg<sup>-1</sup> 8 h<sup>-1</sup>), vildagliptina (10 mg kg<sup>-1</sup>) o con la combinación de ambos fármacos por vía subcutánea. A los ratones de control se les inyectó el mismo volumen de vehículo. Las células de médula ósea completas se aislaron de ratones receptores 16 h después del trasplante. Después de la lisis de los glóbulos rojos, las células se tiñeron para los marcadores CD45.1 y CD45.2. La proporción de células CD45.1<sup>+</sup> y CD45.2<sup>+</sup> en la médula ósea se determinaron mediante citometría de flujo.

**Trasplante de médula ósea:**

Se sometieron ratones receptores isogénicos (C57Bl/6 o BALB/c) a irradiación letal. Si no se rescataban mediante la administración intravenosa de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC), estos ratones morían en las dos primeras semanas. Se prepararon células HSPC Lin<sup>-</sup> (Sca1<sup>+</sup> y c-Kit<sup>+</sup>) como se describe anteriormente y se pretrataron *ex vivo* en ausencia y presencia de la combinación de Treprostiniil 10  $\mu\text{M}$  + forskolina 30  $\mu\text{M}$  (FSK) durante 1 h a 37°C. Después de eso, las células (1 -  $5 \times 10^5$ /ratón) se inyectaron a través de la vena de la cola. Los recuentos de glóbulos blancos se determinaron mediante FACS, se recogieron muestras de sangre cada 3 a 5 días a partir del día 9 (donde el recuento de glóbulos blancos fue ~ 1 G/L. En algunos casos, los ratones (25 - 30 g) también se trataron con (i) Treprostiniil (0,15 mg kg<sup>-1</sup> 8 h<sup>-1</sup>) y vildagliptina (10 mg kg<sup>-1</sup> 12 h<sup>-1</sup>) o con la combinación de ambos administrados por vía subcutánea cada 8 h durante 10 días.

**Aislamiento de ARN de células madre y progenitoras hematopoyéticas y reacción en cadena de la polimerasa:**

Se aisló ARN de células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas y murinas ( $3 \times 10^6$  células), de cultivos mixtos (es decir, neuronales y gliales) preparados a partir de corteza cerebral murina, a partir de la línea celular de cáncer de próstata humano PC3 y la línea celular de carcinoma de colon humano HCT116 (como controles positivos) utilizando 2 mL de Trizol® (Invitrogen). Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió cloroformo (0,4 mL) al producto lisado celular y el tubo se agitó vigorosamente a mano durante 15 segundos. Después de la incubación durante 3 min a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase de fenolcloroformo de color rojo inferior, una interfase y una fase acuosa incolora superior. La fase acuosa (ARN) se transfirió a un tubo nuevo y el ARN se precipitó mezclándolo con 1 mL de alcohol isopropílico. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, la muestra se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de ARN en forma de gel se lavó una vez con 2 mL de etanol del 75%. La muestra se mezcló mediante agitación vorticial y se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4°C. El sedimento de ARN se secó al aire durante 10 min y se disolvió en 80  $\mu\text{L}$  de agua (altamente purificada) pasando la solución varias veces a través de una punta de pipeta e incubando durante 10 min a 55°C (almacenada a -20°C).

El ARN (1  $\mu\text{g}$ ) se transcribió de forma inversa a ADNc con el RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) en presencia de 1  $\mu\text{l}$  de cebador oligo (dT)18, 4  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción 5x, 1  $\mu\text{l}$  de inhibidor de ARNasa RiboLock™ (20 u/ $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  de RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ $\mu\text{l}$ ) y agua purificada para proporcionar un volumen total de 12  $\mu\text{l}$  durante 60 min a 42°C seguido de una incubación durante 5 min a 70°C.

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de los receptores de prostaglandina humanos y de CXCR4 se realizó con 1  $\mu\text{l}$  de ADNc, 1  $\mu\text{l}$  de dNTP 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  de cebador directo [10  $\mu\text{M}$ ], 1  $\mu\text{l}$  de cebador inverso [10  $\mu\text{M}$ ], 4  $\mu\text{l}$  de tampón GoTaq® [5x], 0,2  $\mu\text{l}$  de polimerasa GoTaq® y agua purificada hasta un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  (11,8  $\mu\text{l}$ ). La mezcla se incubó en primer lugar a 95°C durante 5 min seguido de 40 ciclos (desnaturalización de 45 s a 95°C, reasociación de 30 s a 57°C, extensión de 45 s a 72°C) y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2%.

Tabla 1. Cebadores utilizados (directo e inverso):

<b>hEP1 f</b>	GAGAGCCAGGGCGCAGT (SEQ ID NO 1)	<b>mEP4 f</b>	TCTCTGGTGGTGCTCATCTG (SEQ ID NO 15)
<b>hEP1 r</b>	GCAAGGGCTCATGTCAGG (SEQ ID NO 2)	<b>mEP4 r</b>	TGCAAATCTGGGTTTCTGCT (SEQ ID NO 16)
<b>mEP1 f</b>	AGCAGGAGCCAAGTTCCAG (SEQ ID NO 3)	<b>hCXCR4 f</b>	AGGAAGCTGTTGGCTGAAAA (SEQ ID NO 17)
<b>mEP1 r</b>	CATCCGCTAGGCTCAGGTT A (SEQ ID NO 4)	<b>hCXCR4 r</b>	CTCACTGACGTTGGCAAAGA (SEQ ID NO 18)
<b>hEP2 f</b>	CCACCTCATTCTCCTGGCTA (SEQ ID NO 5)	<b>mCXCR4 f</b>	AGGTGCAGGTAGCAGTGAC C (SEQ ID NO 19)
<b>hEP2 r</b>	TTTCCTTTGGGAAGAGGTT (SEQ ID NO 6)	<b>mCXCR4 r</b>	ACTCACACTGATCGGTTCCA (SEQ ID NO 20)
<b>mEP2 f</b>	TTATGACCATCACCTTCGCC (SEQ ID NO 7)	<b>mPI f</b>	GGGCACGAGAGGATGAAGT (SEQ ID NO 21)

mEP2 r	TAAAAACCGAAGAGCTCGG A (SEQ ID NO 8)	mPI r	GATGGCCTGAGTGAAGCCT (SEQ ID NO 22)
hEP3 f	AGCGACCATTTGGAAAGAT G (SEQ ID NO 9)	hPI f	GTGTGCTCCCTGCCTCTC (SEQ ID NO 23)
hEP3 r	TGATGTGATCCTGGCAGAA A (SEQ ID NO 10)	hPI r	GGGGTTGAAGGCGTAGAAG (SEQ ID NO 24)
mEP3 f	TGGATCCCTGGGTTTATCTG (SEQ ID NO 11)	m PGRD f	AAGGCTCCATAGTACGCACG (SEQ ID NO 25)
mEP3 r	GGGAAACAGGTACTGCAAT GA (SEQ ID NO 12)	m PGRD r	CTCAGACTACAGGCACGGG T (SEQ ID NO 26)
hEP4 f	TTACTCATTGCCACCTCCCT (SEQ ID NO 13)	h PGRD f	CGGAGGTCTTCTGCTTCTTC (SEQ ID NO 27)
hEP4 r	CGCTCCAAACTGGCTGATA (SEQ ID NO 14)	h PGRD r	CACTATGTGTTCTCTGCCCG (SEQ ID NO 28)

**Resultados:**

**Acumulación de AMP cíclico inducida por Treprostnilil y dmPGE2 en células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas**

5 Después del marcaje metabólico con [3H]adenina, las HSPC humanas se estimularon con Treprostnilil (Trep, 10 µM), dmPGE2 (10 µM) o forskolina (Fsk, 30 µM), la combinación de Treprostnilil (10 µM) o de dmPGE2 (10 µM) con forskolina (30 µM) como se describe en Materiales y métodos. Cuando se indicó, las HSPC se habían tratado previamente con toxina pertussis (PTX) durante 16 h antes de la estimulación. Los datos son de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, las barras de error indican e.t.m. En presencia de forskolina 30 µM, Treprostnilil 10 µM fue más eficaz que dmPGE2 10 µM (P = 0,03; prueba de Wilcoxon). Esta diferencia fue eliminada por el pretratamiento con toxina pertussis (ns, no significativo). Los datos se muestran en la Figura 7.

15 La reserva de nucleótidos de adenina de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) humanas CD34+ se marcó metabólicamente con [3H]adenina y se examinó su respuesta a Treprostnilil y a dimetil-PGE2 (dmPGE2) en presencia y ausencia de forskolina 30 µM. Resulta evidente a partir de la Fig. 7 que Treprostnilil fue significativamente más eficaz que dmPGE2, independientemente de si las células se estimularon en ausencia o presencia de forskolina. Este diterpeno se une en la hendidura del pseudosustrato entre los dominios catalíticos C1 y C2 de la adenilil ciclasa y hace que las diversas isoformas de la enzima respondan mejor a la proteína G estimuladora Gαs (5-7). La menor eficacia de dmPGE2 puede justificarse teniendo en cuenta que dmPGE2 también es un agonista completo en el receptor EP3 acoplado a Gi (8,9) y por lo tanto causa, un estimulación dependiente de Gs de la adenilil ciclasa a través de los receptores EP2 y EP4 y una inhibición concomitante a través de receptores EP3 acoplados Gi. La toxina pertussis anula la interacción de los receptores acoplados a Gi con Gi (y proteínas G relacionadas tales como Go y Gi) mediante ADP-ribosilación de un resto de cisteína, alejado cuatro aminoácidos del extremo C-terminal de la subunidad Gαi. Por consiguiente, las HSPC se preincubaron durante 16 h en presencia de toxina pertussis. Este pretratamiento aumentó la respuesta a dmPGE2 (véanse la 6ª y 9ª barras en la Fig. 7) de modo que no hubo diferencia significativa entre la respuesta de AMPc provocada por Treprostnilil + forskolina y la causada por dmPGE2 + forskolina (véanse la 8ª y 9ª barras en la Fig. 7). Esto confirma que existe una diferencia importante en la acción de dmPGE2 y de Treprostnilil sobre las HSPC humanas: dmPGE2 activa un receptor acoplado a Gi pero Treprostnilil no lo hace.

**El pretratamiento de las HSPC con Treprostnilil y forskolina no altera la viabilidad celular, la progresión del ciclo celular o el potencial de diferenciación**

30 Una elevación persistente del AMPc puede desencadenar la apoptosis en las células hematopoyéticas (10). El injerto mejorado de las células madre hematopoyéticas tratadas con dmPGE2 se atribuyó a los efectos sobre la supervivencia, la proliferación y el anidamiento celular (11). Treprostnilil y dmPGE2 difieren en su capacidad para reclutar proteínas G: el reclutamiento de Gi inducido por dmPE2 puede tener particular relevancia, ya que la señalización a través de Gi puede conducir a la activación de la lípido quinasa PI3-quinasa y la quinasa aguas abajo AKT, que estimula la proliferación y supervivencia de las células (12,13). Por tanto, los autores de la presente invención examinaron si el tratamiento *in vitro* de HSPC humanas con la combinación de forskolina 30 µM y 10 µM

40 El pretratamiento de HSPC murinas y humanas con Treprostnilil y forskolina no induce apoptosis ni altera la progresión del ciclo celular o el potencial de diferenciación. Las HSPC humanas se incubaron con Treprostnilil 10 µM y forskolina 30 µM durante 1 hora. Posteriormente, se evaluó la inducción de la apoptosis (A, B) y la progresión del ciclo celular (C, D) mediante análisis de citometría de flujo. Se representan imágenes originales representativas (A, C, panel de la izquierda) y se resumen los datos obtenidos en tres experimentos independientes (B, D, panel de la derecha). No se detectó ninguna diferencia en las células apoptóticas o la distribución de las células según las fases G0/1, S y G2

entre las células tratadas y no tratadas (ANOVA de una vía) (E, F). Las HSPC murinas se aislaron de la médula ósea, se pretrataron y se resuspendieron en un medio de metilcelulosa que contenía factores de crecimiento necesarios para apoyar la diferenciación y el crecimiento de las unidades formadoras de colonias del linaje de granulomonocitos (CFU-GM) y de eritrocitos (BFU-E). Después de 10 días, se contó el número de colonias bajo un microscopio óptico y se observó la forma y morfología de las colonias. Se muestran fotomicrografías representativas y la cuantificación de tres experimentos independientes. Los datos son medias  $\pm$  ETM (n = 3).

(los datos se muestran en la Fig. 8)

Treprostínil hizo que las células fueran más susceptibles a la apoptosis (Fig. 8A y B) o impidió su entrada y progresión a través del ciclo celular (Fig. 8C y D) o alteró la capacidad de las HSPC murinas para dar lugar a linajes específicos (Fig. 8E y F). Como se ilustra mediante los gráficos de puntos originales (Fig. 8A) y se resume en la Figura 8B, la presencia de células muertas y apoptóticas tempranas viables fue comparable y el número de células positivas a anexina-V no aumentó tras el tratamiento *in vitro* con forskolina 30  $\mu$ M y Treprostínil 10  $\mu$ M. De manera similar, la distribución del ciclo celular de las HSPC humanas no tratadas que crecen de forma asincrónica y las HSPC mantenidas en presencia de Treprostínil y forskolina fue comparable, independientemente de si las HSPC se expusieron durante 1 h o 24 h (véase la Fig. 8C para los histogramas originales representativos y la Fig. 8D para los datos promediados). Es importante destacar que los autores de la presente invención pudieron detectar ningún efecto de Treprostínil y forskolina sobre la formación de colonias mieloides y eritroides: se aislaron HSPC murinas de la médula ósea, se incubaron durante 1 h en presencia de Treprostínil y forskolina y se resuspendieron en un medio que contenía metilcelulosa con factores de crecimiento necesarios para apoyar la diferenciación y el crecimiento de unidades formadoras de colonias de CFU-GM y de BFU-E. Después de 10 días, la morfología (Fig. 8E) y el número de colonias eran comparables (Fig. 8F).

### **Treprostínil estimula la migración de HSPC humanas y murinas hacia SDF-1/CXCL-12**

Como se mencionó anteriormente, el injerto mejorado de las células madre hematopoyéticas tratadas con dmPGE2 se atribuyó a efectos sobre la supervivencia, la proliferación y el anidamiento celular (10). Bajo las condiciones experimentales de los autores de la presente invención, el tratamiento *in vitro* de HSPC murinas y humanas con Treprostínil y forskolina aumentó la reconstitución de médula ósea (véase más abajo y la Fig.13), pero no alteró la viabilidad celular o la progresión del ciclo celular *in vitro* (véase la Figura 8).

El eje SDF-1/CXCR4 juega un papel importante en el anidamiento de las HSCP al nicho de la médula ósea. Por lo tanto, los autores de la presente invención supusieron que la acción beneficiosa de Treprostínil resultó de un injerto mejorado de HSPC a través de efectos mediados por SDF-1/CXCR4.

En la Fig. 9 se muestran los siguientes datos: El pretratamiento *in vitro* con Treprostínil y forskolina potencia la expresión de CXCR4 (A y B) y CD26/DPPIV (B). (A) Se aisló ARN de HSPC humanas, que se habían incubado en ausencia (sin tratar) o en presencia de la combinación de Treprostínil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M (Trep + Fsk) durante 1 h. El ARN preparado a partir de la línea celular humana PC3 sirvió como control positivo. Después de la transcripción inversa, se realizó la amplificación dependiente de PCR utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1. Los amplicones para CXCR4 se resolvieron electroforéticamente en un gel de agarosa y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. El ARNm que codifica la  $\beta$ -actina se amplificó como control interno. Los datos son representativos de dos experimentos adicionales con resultados similares. (B, C) Se incubaron células CD34+ humanas (B) y mHSPC con Treprostínil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M o controles de vehículo (sin tratar) durante 2 h, 4 h y 6 h. Posteriormente, las muestras fueron analizadas para determinar la expresión de CXCR4 (B) y CD26 (FIC) mediante FACS. Se muestra el porcentaje de células positivas en  $\geq 3$  experimentos independientes (media  $\pm$  ETM; \*P <0,05 frente al control no tratado, ANOVA).

Esta conjetura se examinó de la siguiente manera: (i) la preestimulación de HSPC humanas con Treprostínil y forskolina elevó los niveles de ARNm de CXCR4 (Fig. 9A). Esto también se tradujo en una mejora de la expresión de la proteína CXCR4 (Fig. 9B). Curiosamente, esto también estuvo acompañado por una regulación por incremento de CD26/DPPIV (dipeptidilpéptidos-IV), la enzima que degrada el ligando de CXCR4 SDF-1/CXCL12 (mostrado para las HSPC murinas en la Fig. 9C). (ii) La regulación por incremento de CXCR4 dio como resultado una mejora de la migración de las HSPC humanas (Fig. 10A) y murinas hacia SDF-1 (Fig. 10B), respectivamente. (iii) Esta migración dirigida fue específica, porque fue bloqueada por el antagonista selectivo de CXCR4 plerixafor/AMD3100 (Fig. 10C). Asimismo, la migración basal (es decir, la migración aleatoria en ausencia de SDF-1) no se potenció mediante el tratamiento previo de las HSPC con Treprostínil y forskolina (véanse la primera y la tercera barras en las Fig. 10A y B).

La Figura 10 muestra los siguientes datos: El pretratamiento *in vitro* con Treprostínil y forskolina potencia la acción de SDF-1 a través de CXCR4. Se pretrataron *in vitro* HPSC murinas y humanas recién aisladas con vehículo (barras abiertas) o Treprostínil 10  $\mu$ M y forskolina 30  $\mu$ M (Trep + Fsk, barras cerradas) durante 1 h a 37°C seguido de etapas de lavado. Se añadió una suspensión (2  $\times$  10<sup>5</sup> células en 0,1 mL de medio que contenía factores de crecimiento) de HSPC humanas (A) o murinas (B, C) a la cámara Transwell™ superior y se dejó que migrara hacia SDF-1 (100 ng/mL en la cámara inferior) durante 4 h. Se contaron las células que habían migrado a través del filtro de 5  $\mu$ m. Las HSPC también se incubaron en ausencia y presencia de AMD3100 10  $\mu$ M (C). Los datos representan medias  $\pm$  ETM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. La comparación estadística se realizó mediante ANOVA seguido de la comparación múltiple de Tukey. (\*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001).

**El bloqueo de CXCR4 atenúa el efecto beneficioso de Treprostínil en el trasplante de médula ósea**

El antagonismo de AMD3100 fue recapitulado *in vivo*: la médula ósea de los ratones receptores irradiados letalmente se reconstituyó con HSPC murinas pretratadas con Treprostínil y forskolina y posteriormente se administró a los ratones por vía subcutánea la dosis óptima de Treprostínil durante 10 días. La administración concomitante de AMD3100 ( $3,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ 8 h}^{-1}$ ) atenuó la acción beneficiosa del Treprostínil de modo que todos los ratones receptores finalmente sucumbieron a la insuficiencia de la médula ósea (Figura 11). Por lo tanto, en conjunto, las observaciones indican un vínculo mecanicista entre la acumulación de AMPc inducida por Treprostínil, el aumento de la expresión de CXCR4 y la señalización mejorada por CXCR4 en las HSPC tratadas con Treprostínil. Además, también documentan que la acción del Treprostínil depende de CXCR4: si la señalización por CXCR4 estaba bloqueada, la médula ósea no se injertaba y todos los animales morían.

**La Inhibición de CD26/DPPIV por vildagliptina mejora el anidamiento y la reconstitución de la médula ósea por las HPSC solo con la administración secuencial pero no concomitante con Treprostínil.**

Se sabe que varias quimiocinas son degradadas por CD26/DPPIV (dipeptidil peptidasa-IV). Esto también se verifica para SDF-1/CXCL12. Dados los hallazgos de que la acción de Treprostínil está mediada, al menos en parte, por la inducción de CXCR4 y depende de CXCR4. Por consiguiente, se pronostica que una acción mejorada de SDF-1/CXCL12 será beneficiosa. En este contexto, cabe considerar que el tratamiento con Treprostínil y forskolina también indujo la expresión de CD26, que era esencialmente indetectable en HSPC no estimuladas, pero se detectó en más de 10% de las HSPC, que habían sido estimuladas con Treprostínil y forskolina (Figura 9C). Se encuentran disponibles varios inhibidores de DPP-IV, su farmacología humana es bien conocida, se han administrado a millones de pacientes durante muchos años en el tratamiento de la diabetes tipo II. De hecho, la gran mayoría de los pacientes toleran los inhibidores de DPP-IV sin efectos secundarios peligrosos.

Dado que los inhibidores de DPP-IV pueden ser un compañero de combinación adecuado para Treprostínil, los autores de la presente invención exploraron si el inhibidor de DPP-IV, vildagliptina, potenciaba la acción de Treprostínil. Esto se sometió a prueba por primera vez en un enfoque que midió la capacidad de las HSPC inyectadas para anidar en la médula ósea: las HSPC recolectadas de la médula ósea de ratones donantes CD 45.1<sup>+</sup> se inyectaron en receptores de CD45.2 isogénicos. Los animales se sacrificaron después de 16 horas y se cuantificó mediante FACS la cantidad de células CD45.1<sup>+</sup> que se recuperaron de la médula ósea.

Estos experimentos demostraron que

(i) el único pretratamiento de HSPC con la combinación de Treprostínil + forskolina *in vitro* no fue suficiente para producir un anidamiento mejorado estadísticamente significativo (véase la tercera barra y la primera barra en la Fig. 12).

La Fig. 12 muestra que el tratamiento *in vivo* de ratones receptores con vildagliptina y Treprostínil solo, pero no con su combinación, aumenta el anidamiento de las HSPC, que se habían preincubado con Treprostínil y forskolina. Las HSPC murinas aisladas de la médula ósea de ratones donantes CD 45.1<sup>+</sup> se pretrataron con vehículo ("células no tratadas") o con Treprostínil y forskolina ("células tratadas") y se trasplantaron ( $2 \times 10^5$  células por ratón) a ratones receptores C57Bl/6 (CD45.2<sup>+</sup>) irradiados letalmente mediante inyección en la vena de la cola. A continuación, los ratones receptores se dividieron en 7 grupos. Los ratones de los grupos 1 y 2 solo tenían células de control sin tratar; además, los ratones del grupo 2 se trataron *in vivo* con vildagliptina (Vil,  $10 \text{ mg kg}^{-1}/\text{d}$ ). Los ratones asignados al grupo 3 recibieron solo células tratadas *in vitro*, los del grupo 4 se sometieron, además, a Treprostínil *in vivo* (Trep,  $0,15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ 8 h}^{-1}$ ). A los ratones asignados al grupo 5 se les administró un tratamiento combinado *in vivo* con Treprostínil ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ 8 h}^{-1}$ ) y AMD3100 ( $3,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ 8 h}^{-1}$ ). Los ratones del grupo 5 recibieron *in vivo* tanto Treprostínil ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ 8 h}^{-1}$ ) y vildagliptina ( $10 \text{ mg kg}^{-1}/\text{d}$ ), y finalmente los ratones del grupo 6 fueron sometidos a vildagliptina *in vivo*. La capacidad de las células CD45.1<sup>+</sup> para anidar en la médula ósea se evaluó después de 16 h analizando la médula ósea de los receptores mediante FACS. Los datos son medias  $\pm$  ETM ( $n = 3$ ). Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA seguido de la comparación múltiple de Tukey. La combinación de pretratamiento *in vitro* + vildagliptina *in vivo* (última barra, "+ (Vil) *in vivo*") es estadísticamente significativa entre todas las demás (\*\*,  $p < 0,01$ ). La cuarta barra ("+ Trep *in vivo*") difiere de manera estadísticamente significativa de las tres primeras barras, la quinta ("+ (Trep + AMD 3100) *in vivo*") y la sexta barra ("+ (Trep + Vil) *in vivo*") (\*,  $p < 0,05$ ).

Observaciones anteriores habían demostrado que el pretratamiento *in vitro* con dmPE2 mejoró el anidamiento de las HSPC (11). Por lo tanto, estos hallazgos nuevamente resaltan la diferencia entre una preincubación de HSPC en dmPGE2 (11) y en la combinación de Treprostínil y forskolina.

(ii) el pretratamiento de HSPC con la combinación de Treprostínil + forskolina *in vitro* aumentaron su anidamiento en la médula ósea de los ratones receptores siempre que estos ratones receptores también fueran tratados con Treprostínil *in vivo* (véanse la cuarta barra y tercera barra, Fig.12).

(iii) el anidamiento mejorado resultante del pretratamiento secuencial *in vitro* (con Treprostínil + forskolina) seguido de administración *in vivo* de Treprostínil se suprimía si a los ratones receptores se les administraba el antagonista de CXCR4 AMD3100/plerixafor (véanse la cuarta barra y quinta barra, Fig.12). Esta observación es compatible con los hallazgos resumidos anteriormente y en las Figs. 9, 10 y 11, que demostraron que la acción de Treprostínil dependía de la inducción de CXCR4.

(iv) la sola administración *in vivo* de vildagliptina a ratones receptores, que habían recibido HSPC sin tratar, no mejoró el anidamiento (véanse la segunda barra y primera barra, Fig.12).

5 (v) la administración *in vivo* de vildagliptina a ratones receptores, que habían recibido HSPC pretratadas con Treprostinil + forskolina y a los que se había administrado con posterioridad Treprostinil *in vivo*, anuló el efecto de anidamiento de Treprostinil (véanse la cuarta barra y sexta barra, Fig.12).

10 (vi) se observó el aumento más pronunciado en el anidamiento, si las HSPC se pretrataban *in vitro* con la combinación de Treprostinil y forskolina y se había administrado vildagliptina a los ratones receptores; el anidamiento después de este régimen superó el de todos los demás, incluida la inyección de HSPC pretratadas con Treprostinil +forskolina seguida de la administración de Treprostinil *in vivo* (véanse la séptima barra y cuarta barra, Fig. 12) o seguida de la administración de Treprostinil y vildagliptina *in vivo* (véanse la séptima barra y sexta barra, Fig. 12).

***La inhibición de CD26/DPPIV por vildagliptina mejora la reconstitución de la médula ósea por HPSC con Treprostinil+forskolina solo tras la administración secuencial***

15 Los ratones BALB/c irradiados letalmente fueron rescatados mediante la inyección intravenosa de  $2 \times 10^5$  HSPC Lin<sup>-</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup>. En estas condiciones, el número de HSPC es limitante de modo que todos los animales a los que se les había inyectado HSPC sin tratar morían (línea continua en la Fig. 13). Por el contrario, 60% de los animales sobrevivían, si las HSPC se habían pretratado con la combinación de Treprostinil y forskolina *in vitro* y se administraba Treprostinil a los animales receptores durante 10 días (líneas de puntos/triángulos en la Fig. 13). La supervivencia de los ratones receptores aumentó a 100%, si las HSPC se habían pretratado con la combinación de Treprostinil y forskolina *in vitro* y a los animales receptores se les había administrado vildagliptina durante 10 días (líneas de puntos/círculos en la Fig. 13). Sin embargo, la administración combinada de Treprostinil y vildagliptina dio como resultado un antagonismo mutuo pronunciado: la gran mayoría de los receptores fallecieron si se les inyectaban HSPC pretratadas con la combinación de Treprostinil y forskolina *in vitro* y a continuación se les administraba Treprostinil y vildagliptina (líneas de puntos/cuadrados en la Fig. 13). Estas observaciones son compatibles con los resultados del ensayo de anidamiento resumidos en la Fig. 13; en otras palabras, dos enfoques independientes documentaron antagonismo mutuo de Treprostinil y vildagliptina, cuando se administraban concomitantemente *in vivo*, pero sinergia cuando se aplicaron en la secuencia temporal correcta, es decir, pretratamiento *in vitro* de HSPC con Treprostinil + forskolina seguido de administración *in vivo* de vildagliptina a ratones receptores.

30 ***El bloqueo de CXCR4 por AMD3100/plerixafor suscita antagonismo/atenúa los efectos beneficiosos de la vildagliptina sobre la supervivencia de los ratones receptores, pero AMD3100/plerixafor per se también mejora la supervivencia:***

35 La hipótesis de trabajo que subyace a este proyecto postula que la administración de vildagliptina a ratones receptores, que recibieron HSPC pretratadas con la combinación de forskolina + Treprostinil, debido a que se inhibe la degradación de SDF-1/CXCL12 y, por lo tanto, se mejora la señalización a través de CXCR4 regulado por incremento. Si este fuera el caso, la acción de vildagliptina debería mitigarse mediante la administración simultánea de AMD3100/plerixafor. Se realizó un experimento con siete grupos de ratones receptores BALB/c (5/grupo). Varios de estos grupos eran controles internos, que se incluyeron para verificar que se recapitularan los hallazgos anteriores. Todos los ratones recibieron HSPC, que habían sido pretratadas con la combinación de Treprostinil y forskolina *in vitro* antes de su inyección a través de la vena de la cola. El número de HSPC era limitante ( $2 \times 10^5$ /ratón en BALB/c) de modo que la sola inyección de HSPC pretratadas no fue suficiente para rescatar a los receptores. Los ratones receptores, a los que se había inyectado vildagliptina, obtuvieron mejores resultados; su supervivencia fue mejor que en el grupo al que se había administrado Treprostinil (datos de la Fig. 11, véase más abajo). Además, a los animales a los que se administró la combinación de Treprostinil y vildagliptina tuvieron malos resultados; por tanto, estas observaciones recapitulan los resultados mostrados en la Fig. 13. La supervivencia de los receptores, que habían recibido la combinación de vildagliptina y AMD3100/plerixafor, fue menor que la de los animales tratados con vildagliptina sola. Por lo tanto, la acción de la vildagliptina puede explicarse, al menos en parte, por una mejor señalización de SDF-1/CXCL12 a través de CXCR4. Se destaca que todas las condiciones se probaron en paralelo, por lo que una comparación es legítima.

**Conclusiones:**

Los principales hallazgos se pueden resumir de la siguiente manera:

50 (i) Treprostinil difiere de dmPGE2, porque Treprostinil activa los receptores prostanoideos acoplados a G<sub>s</sub> en HSPC (murinas y humanas), dmPGE2 también activa los receptores EP3 acoplados a G<sub>i</sub>, que también están presentes en las HSPC. En consecuencia, el solo tratamiento *in vitro* con Treprostinil (combinado con forskolina) no mejora la proliferación y supervivencia de las HSPC *in vitro* (Fig. 8) ni su anidamiento en la médula ósea *in vivo* (Fig. 11). Esto contrasta con los datos publicados para dmPGE2 (11). El anidamiento solo se mejora si los animales receptores son tratados continuamente con Treprostinil *in vivo* (Fig. 12).

55 (ii) La acción de Treprostinil depende, al menos en parte, de la inducción de CXCR4 (Fig. 9) y la señalización mejorada resultante de SDF-1/CXCL12 a través de CXCR4. Esto se documentó *in vitro* al mostrar una mayor migración (quimiotaxis) de las HSPC pretratadas con Treprostinil + forskolina hacia SDF1 (Fig.10A, B), mediante el bloqueo de este efecto con el antagonista de CXCR4 AMD3100/plerixafor (Fig. 10C), e *in vivo* demostrando la inhibición por AMD3100/plerixafor del anidamiento mejorado inducido por Treprostinil (Fig. 12) y el injerto/supervivencia de médula

ósea de los ratones receptores (Fig. 11).

(iii) La inhibición de CD26/DPP-IV por sí misma no afecta al anidamiento de las HSPC a la médula ósea, pero crea sinergia con Treprostínil siempre que las HSOPC se expongan primero a Treprostínil y forskolina *in vitro* y a continuación, a vildagliptina *in vivo* (Fig. 12). Si los dos compuestos se administran simultáneamente *in vivo*, existe un antagonismo mutuo. Esta sinergia y antagonismo mutuo se recapitularon en experimentos independientes, donde se probó el injerto de HSPC en lugar de su anidamiento, es decir., la capacidad de las HSPC para reconstituir la médula ósea en ratones receptores irradiados letalmente y así apoyar su supervivencia (Fig. 13).

La Figura 13 muestra que la sola administración *in vivo* del inhibidor de DPP-IV vildagliptina aumenta el efecto beneficioso del tratamiento *in vitro* de las HSPC con Treprostínil y forskolina sobre la tasa de supervivencia en ratones receptores. Las HSPC murinas aisladas de ratones BALB/c donantes se trataron *in vitro* con Treprostínil 10  $\mu\text{M}$  y forskolina 30  $\mu\text{M}$  o vehículo (línea continua) durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se inyectaron  $2 \times 10^5$  células en ratones BALB/c receptores irradiados letalmente (10 Gy). El grupo de ratones, que recibió HSPC tratadas con vehículo, no recibió ningún tratamiento adicional *in vivo* y sirvió como control para la irradiación (línea continua, n = 19): todos murieron debido a insuficiencia de la médula ósea. Otro grupo de ratones (líneas de puntos/triángulos; n = 20) recibió HSPC pretratadas con Treprostínil 10  $\mu\text{M}$  y forskolina 30  $\mu\text{M}$ , y también se trataron *in vivo* con Treprostínil (0,15 mg kg<sup>-1</sup> 8h<sup>-1</sup>). El siguiente grupo de ratones (líneas de puntos/cuadrados; n = 20) nuevamente recibió HSPC *in vitro* pretratadas con forskolina + Treprostínil y se trataron adicionalmente *in vivo* con Treprostínil (0,15 mg kg<sup>-1</sup> 8h<sup>-1</sup>) y vildagliptina (10 mg/kg/24 h). Finalmente, un grupo de ratones (líneas de puntos/círculos; n = 20) recibió HSPC *in vitro* pretratadas con forskolina + Treprostínil y se trató *in vivo* con vildagliptina (10 mg kg<sup>-1</sup> por día). El tratamiento *in vivo* se realizó mediante inyecciones subcutáneas, se inició directamente después del trasplante y se continuó durante 10 días. Las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de rango logarítmico; la diferencia entre las tres condiciones de tratamiento es estadísticamente significativa (p <0,01).

Este hallazgo sorprendente es difícil de entender, pero destaca la importancia de la secuencia de señales: la señal dependiente el G<sub>s</sub> proporcionada por Treprostínil debe preceder a la señal dependiente de G<sub>i</sub>/G<sub>q</sub> generada por SDF-1/CXCL12 a través de CXCR4.

(iv) AMD3100/plerixafor *in vivo* suscita antagonismo del efecto beneficioso de la administración tanto de Treprostínil como de vildagliptina. Este antagonismo es predecible, ya que Treprostínil induce CXCR4 y vildagliptina bloquea la enzima que degrada SDF-1/CXCL12. Por tanto, ambas manipulaciones dan como resultado una señalización mejorada a través de CXCR4, que está bloqueado por AMD3100/plerixafor. Esta observación destaca la importancia de proporcionar las señales correctas a las HSPC trasplantadas en un orden secuencial (véase el punto (iii) anterior). Además, los autores de la presente invención observaron anteriormente que, *in vivo*, la curva de respuesta a la dosis de Treprostínil tenía forma de campana, es decir, las dosis más altas eran menos beneficiosas para promover el injerto de médula ósea que la dosis convencional utilizada en los experimentos actuales. Esto se puede deber a la presencia de receptores EP4 sobre las células que recubren el nicho endosteal, cuya estimulación puede contrarrestar las acciones de los prostanoides sobre el injerto de HSPC (15). Asimismo, es concebible que SDF1/CXCL12 también ejerza acciones complejas sobre el nicho endosteal, que pueden favorecer e impedir la reconstitución de la médula ósea dependiendo del contexto de señalización.

Basándose en estos hallazgos, se puede concluir que

(i) el pretratamiento *in vitro* de las HSPC con la combinación de Treprostínil y forskolina puede combinarse con la administración *in vivo* de Treprostínil o de vildagliptina para mejorar la reconstitución de la médula ósea.

(ii) la combinación de aplicación simultánea de ambos compuestos (es decir, Treprostínil y vildagliptina) da como resultado un antagonismo mutuo y, por tanto, tiene menos valor. Sin embargo, es concebible que un régimen secuencial, en el que se administren vildagliptina y Treprostínil en un esquema alterno, pueda ser útil.

## Referencias

1. 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.
2. Whittle BJ, Silverstein AM, Mottola DM, Clapp LH (2012) Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, Treprostínil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostínil is a potent DP1 and EP2 agonist. *Biochem. Pharmacol.* 84:68-75.
3. Taschner S, Koesters C, Platzer B, Jorgl A, Ellmeier W, Benesch T, Strobl H (2007) Down-regulation of RXR $\alpha$  expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors. *Blood* 109:971-979.
4. Johnson RA, Alvarez, R, Salomon Y (1994) Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double chromatographic procedures. *Methods in Enzymology* 238:31-56

5. Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ .GTP $\gamma$ S. *Science* 278:1907 -1916.
6. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:461-480.
- 5 7. Kudlacek O, Mitterauer T, Nanoff C, Hohenegger M, Tang WJ, Freissmuth M, Kleuss C (2001) Inhibition of adenylyl and guanylyl cyclase isoforms by the antiviral drug foscarnet. *J. Biol. Chem.* 276:3010-3016
8. Woodward DF, Jones RL and Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* 63:471-538.
- 10 9. Kiriya M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, 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
10. Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H y Zambon AC (2012) Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* 204:277-287.
- 15 11. Hoggatt J, Singh P, Sampath J y Pelus LM (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 113:5444-5455.
12. Jia S, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Should individual PI3 kinase isoforms be targeted in cancer? *Curr Opin Cell Biol.* 21:199-208.
- 20 13. Zhang J, Zou F, Tang J, Zhang Q, Gong Y, Wang Q, Shen Y, Xiong L, Breyer RM, Lazarus M, Funk CD, Yu Y (2013) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes injury-induced vascular neointimal hyperplasia through the E-prostanoid 3 receptor. *Circ Res.* 113:104-114.
14. Kang Y, Chen BJ, Deoliveira D, Mito J, Chao NJ (2010) Selective enhancement of donor hematopoietic cell engraftment by the CXCR4 antagonist AMD3100 in a mouse transplantation model. *PLoS One* 28;5(6):e11316.
- 25 15. Hoggatt J, Mohammad KS, Singh P, Hoggatt AF, Chitteti BR, Speth JM, Hu P, Poteat BA, Stilger KN, Ferraro F, Silberstein L, Wong FK, Farag SS, Czader M, Milne GL, Breyer RM, Serezani CH, Scadden DT, Guise TA, Srour EF y Pelus LM (2013) Differential stem- and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E2. *Nature* 495:365-369.

**Lista de secuencias**

- <110> SciPharm SàRL
- 30 <120> Composición novedosa para su uso en el aumento de la eficacia del injerto de células madre hematopoyéticas después del trasplante
- <130> SP001P
- 35 <160> 28
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> Cebador
- <400> 1  
gagagccagg gcgcagt
- 50 <210> 2  
<211> 18  
<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 2	
	gcaagggctc atgtcagg	18
	<210> 3	
10	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 3	
	agcaggagcc aagttccag	19
	<210> 4	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 4	
	catccgctag gctcaggta	20
30	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
40	ccacctcatt ctctggcta	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 6	
50	tttcctttcg ggaagaggtt	20
	<210> 7	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 7	
	ttatgaccat cacctcgcc	20
	<210> 8	
65	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 8 taaaaaccga agagctcgga	20
10	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 9 agcgaccatt tggaagatg	20
20	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 10 tgatgtgac ctggcagaaa	20
30	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
40	<400> 11 tggatccctg ggttatctg	20
45	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 12 gggaaacagg tactgcaatg a	21
55	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador	
	<400> 13 ttactcattg ccacctcct	20
65	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 872 698 T3

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 14  
 5 cgctccaaac ttggctgata 20  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 15  
 15 tctctggtgg tgctcatcg 20  
  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 16  
 25 tgcaaatctg ggtttctgct 20  
  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 17  
 35 aggaagctgt tggctgaaaa 20  
  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 18  
 50 ctactgacg ttggcaaaga 20  
  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 19  
 60 aggtgcaggt agcagtgacc 20  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

	<223> Cebador	
	<400> 20	
5	actcacactg atcggttcca	20
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 21	
15	gggcacgaga ggatgaagt	19
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 22	
25	gatggcctga gtgaagcct	19
	<210> 23	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
35	<400> 23	
	gtgtgctccc tgctctc	18
	<210> 24	
40	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador	
	<400> 24	
	ggggtgaag gcgtagaag	9
50	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 25	
60	aaggctccat agtacgcacg	20
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador	

# ES 2 872 698 T3

	<400> 26 ctcagactac aggcacgggt	20
5	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
15	<400> 27 cggaggtctt ctgcttctc	20
20	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 28 cactatgtgt tctctgcccg	20

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende vildagliptina para su uso en la mejora del injerto de células madre hematopoyéticas en receptores trasplantados con dichas células madre hematopoyéticas, en donde
- 5 (a) antes del trasplante, dichas células madre hematopoyéticas han sido pretratadas in vitro con Treprostinil, o sus sales farmacéuticamente aceptables, y forskolina; y
- (b) la composición se administra durante un período de al menos 1 día después del trasplante de dichas células madre hematopoyéticas.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde la vildagliptina se administra adicionalmente al menos 5, específicamente al menos 10, específicamente al menos 15, específicamente al menos 24 horas antes del trasplante de células madre hematopoyéticas.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la vildagliptina se administra durante un período de al menos 2, específicamente al menos 3, específicamente al menos 4 días después del trasplante de células madre hematopoyéticas.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el receptor es un individuo que padece una enfermedad de la médula ósea.
- 15 5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad de la médula ósea es leucemia, un defecto del compartimento de las células sanguíneas, enfermedad de la médula ósea inducida por quimioterapia o irradiación.
6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho defecto del compartimento de células sanguíneas es una hemoglobinopatía, un defecto en la función de los granulocitos neutrófilos o un defecto en los linfocitos T y/o B.
- 20

Figura 1

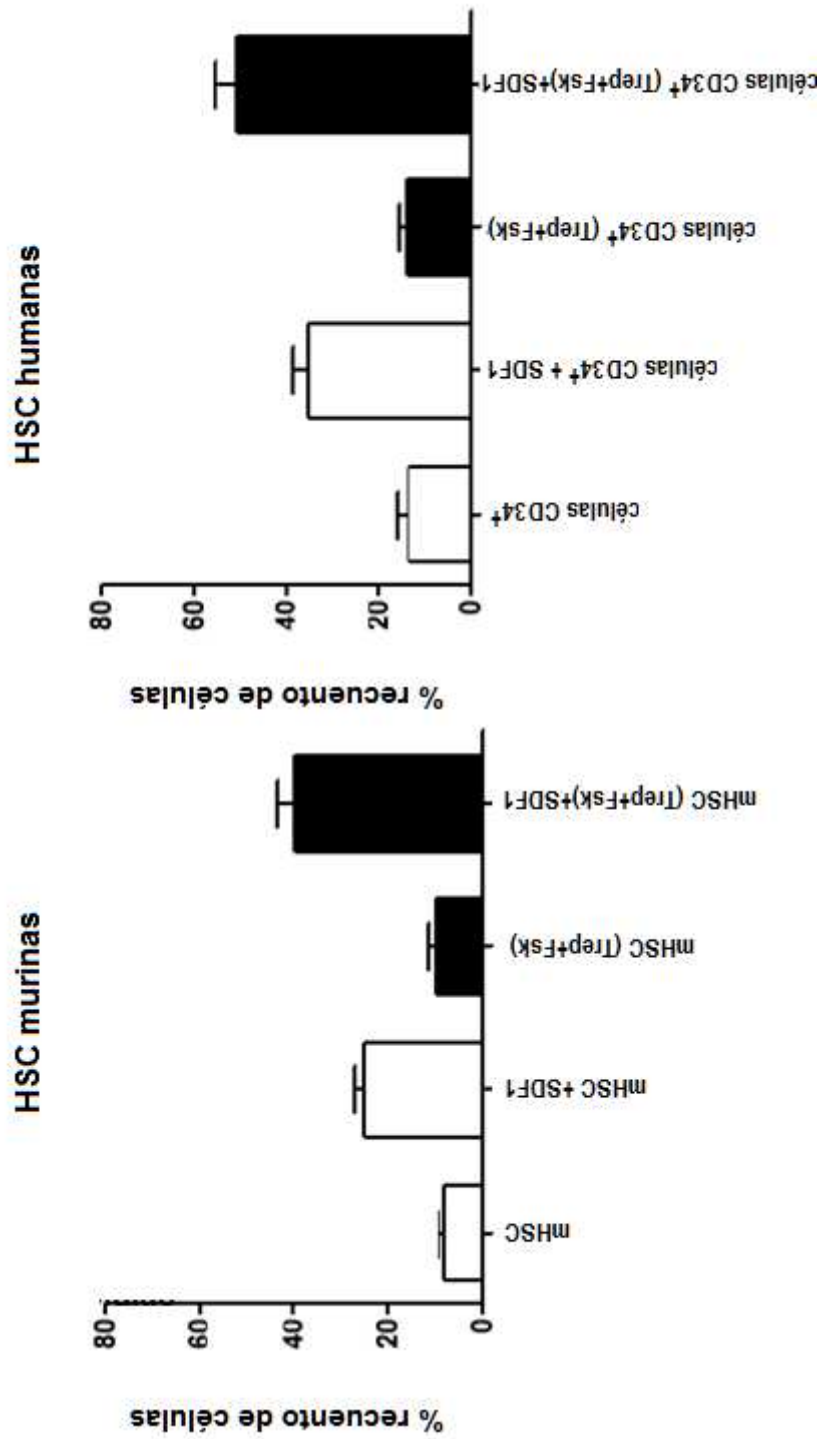


Figura 2

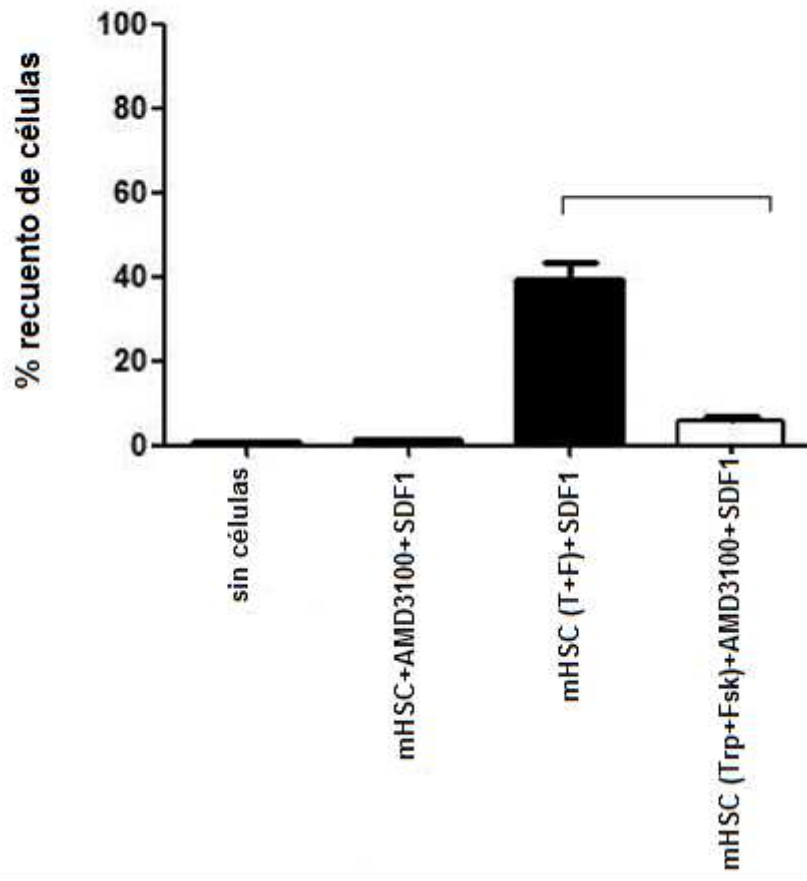


Figura 3

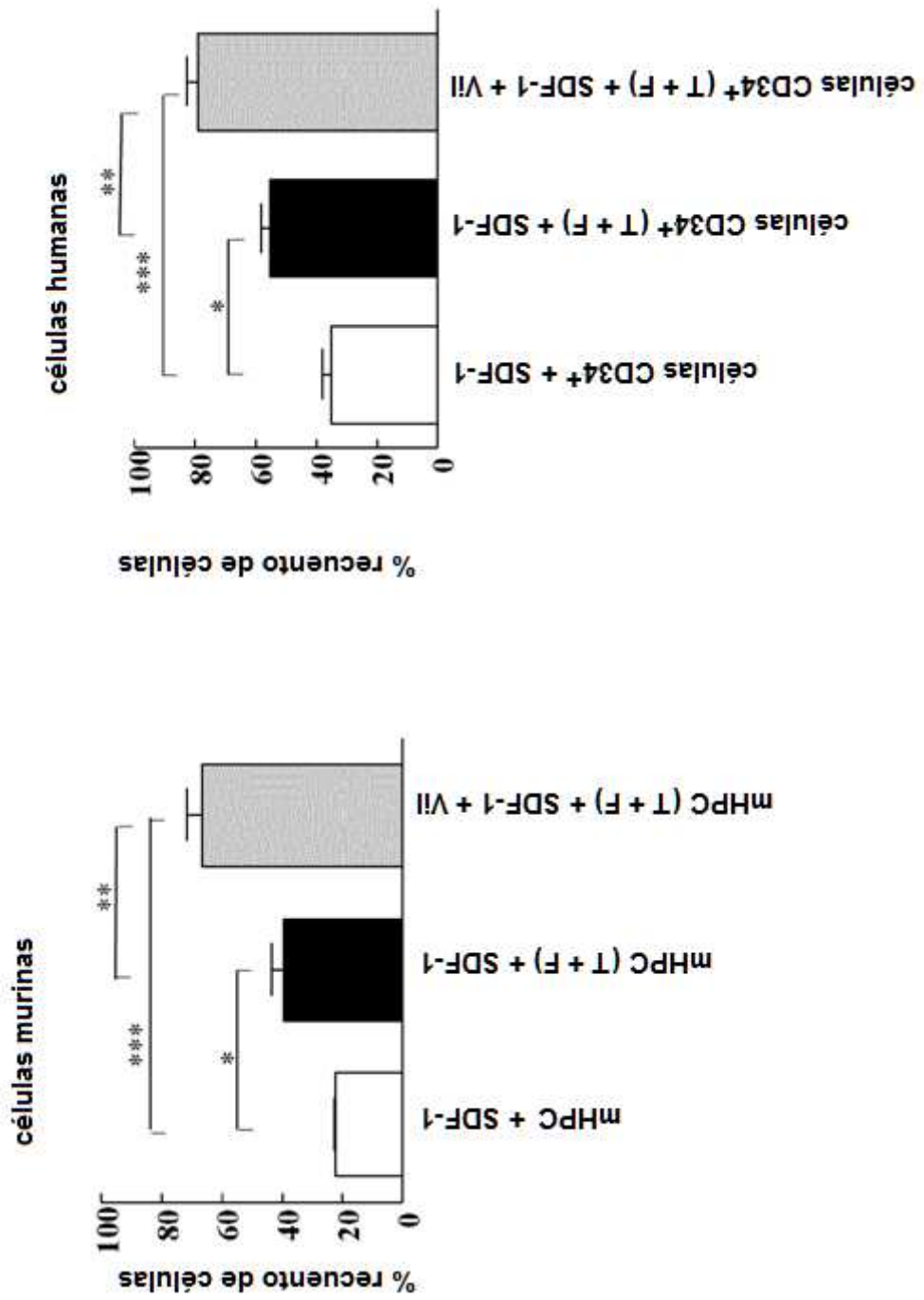


Figura 4

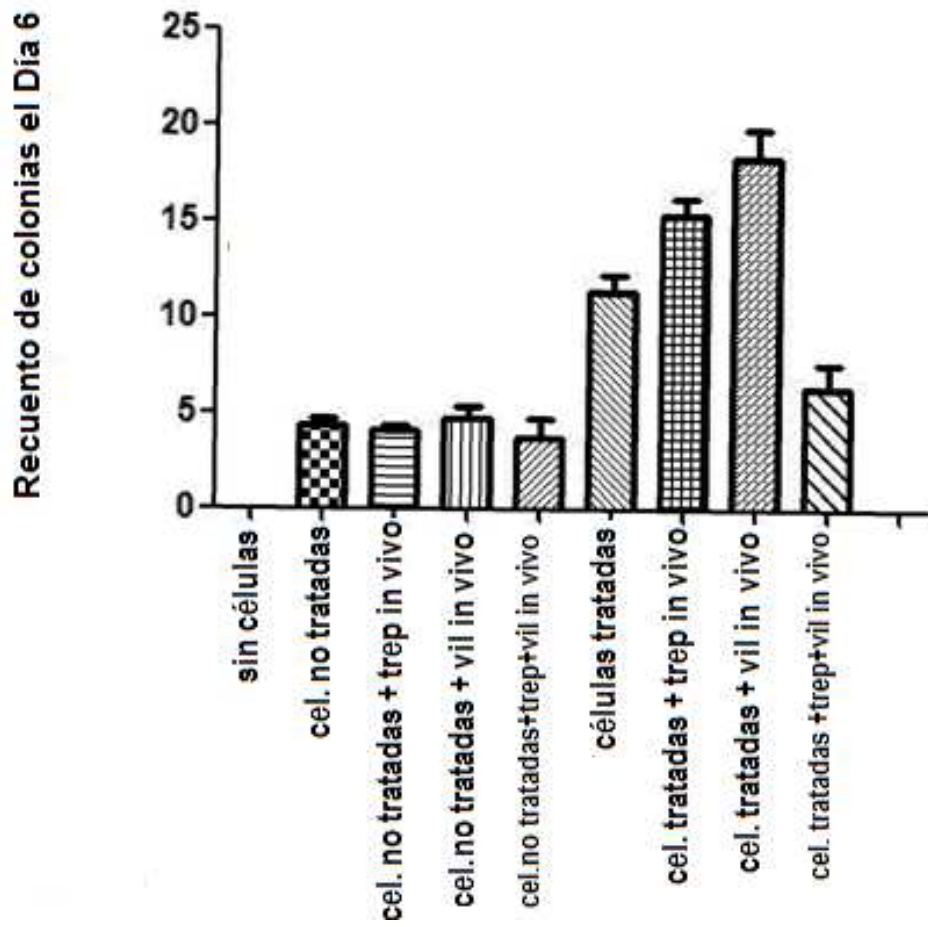


Figura 5

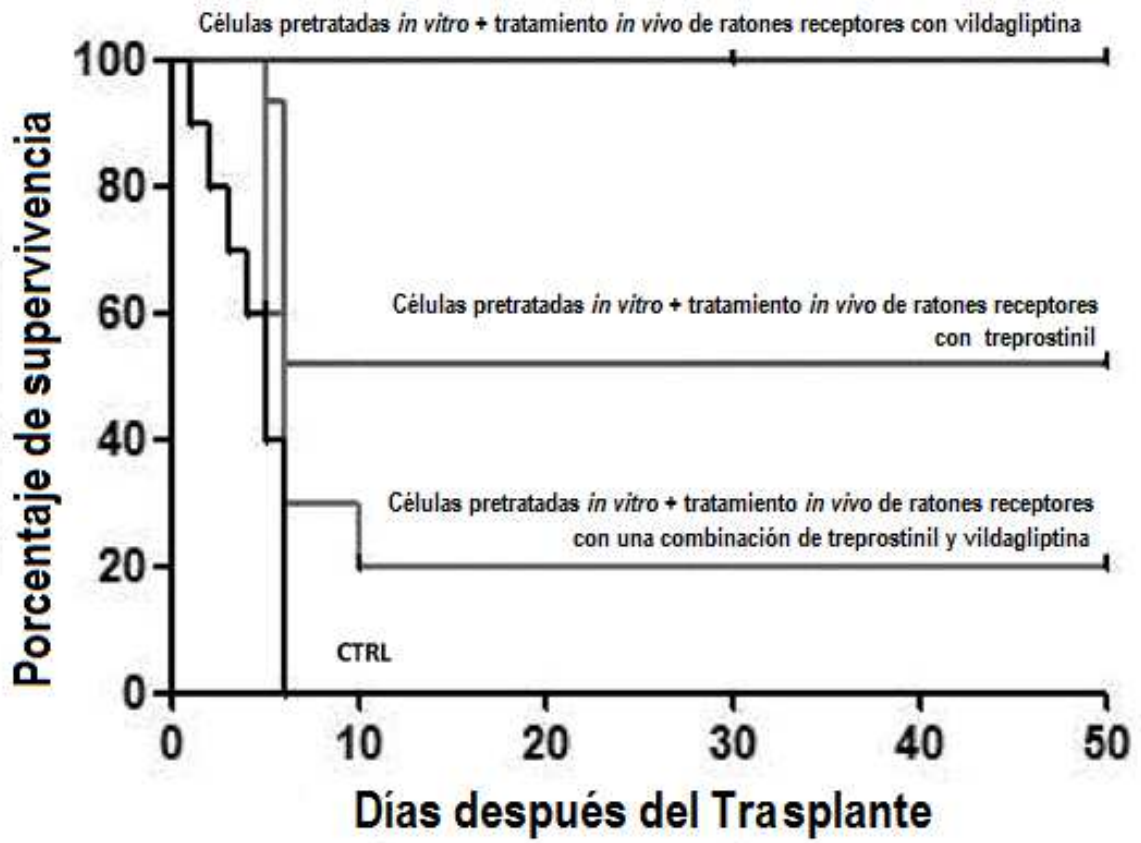
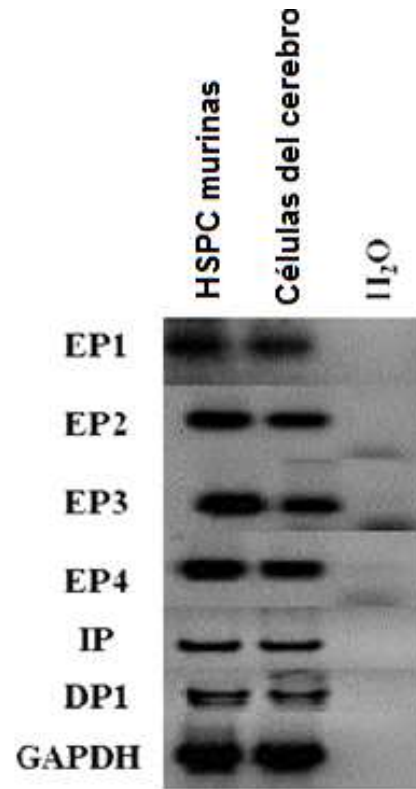


Figura 6

A



B

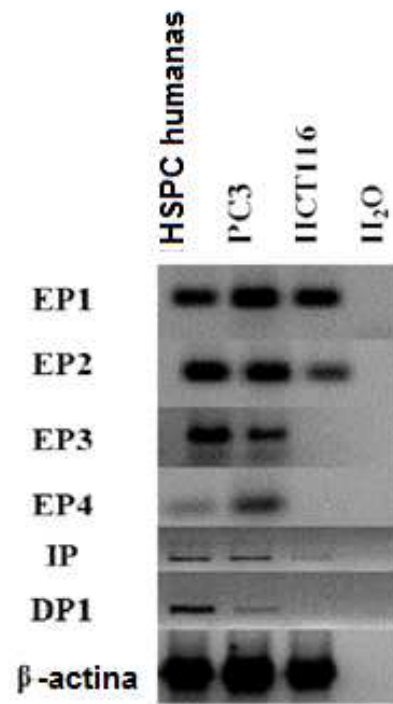


Figura 7

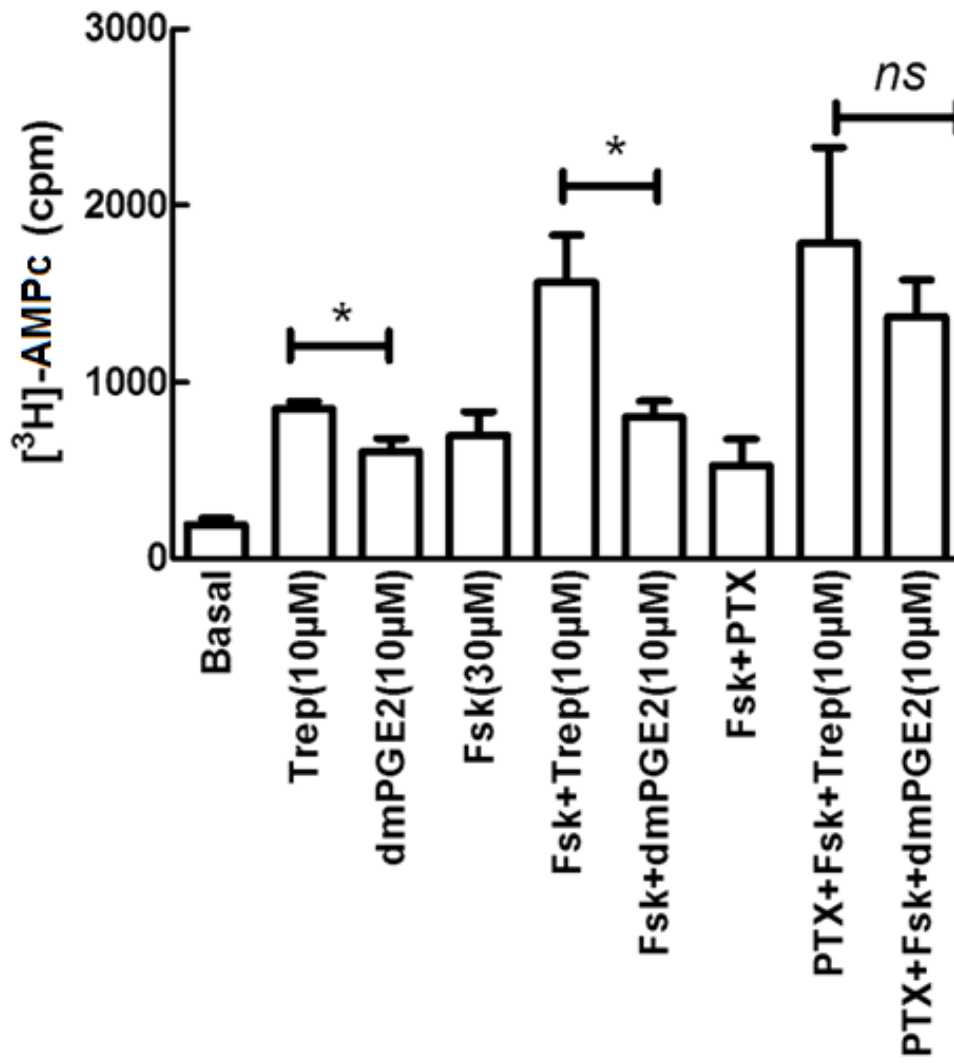


Figura 8

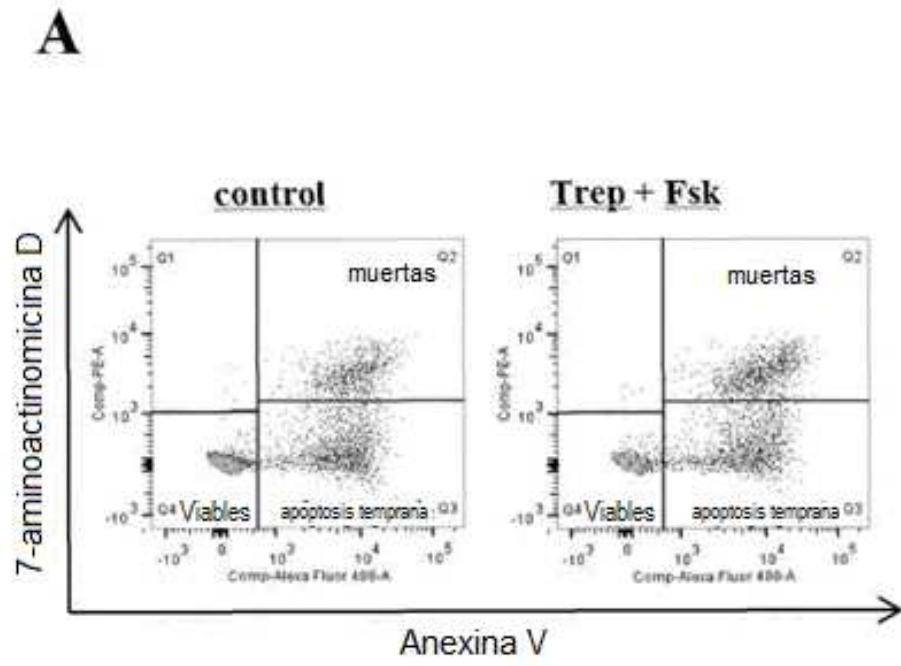


Figura 8 continuación

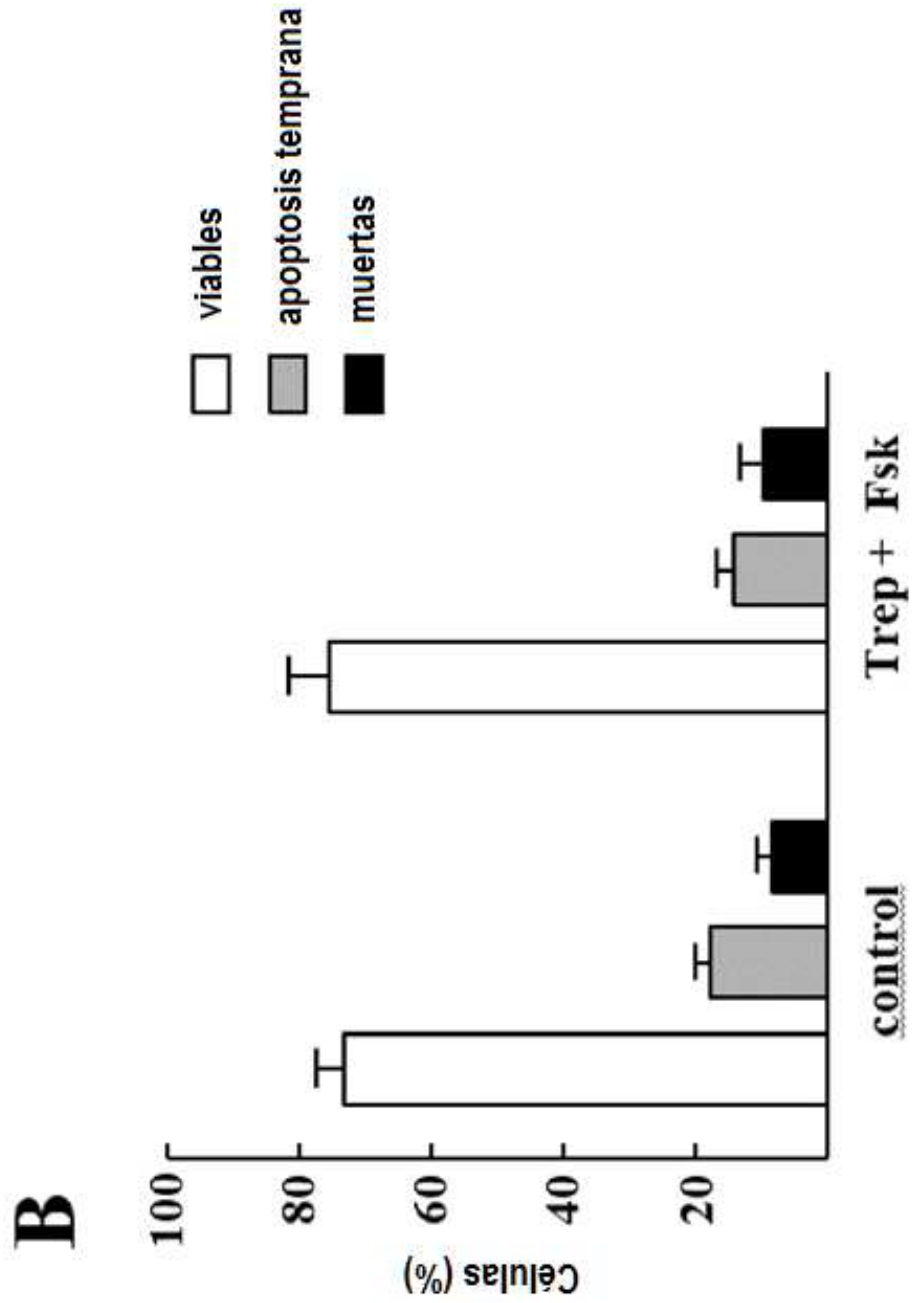


Figura 8 continuación

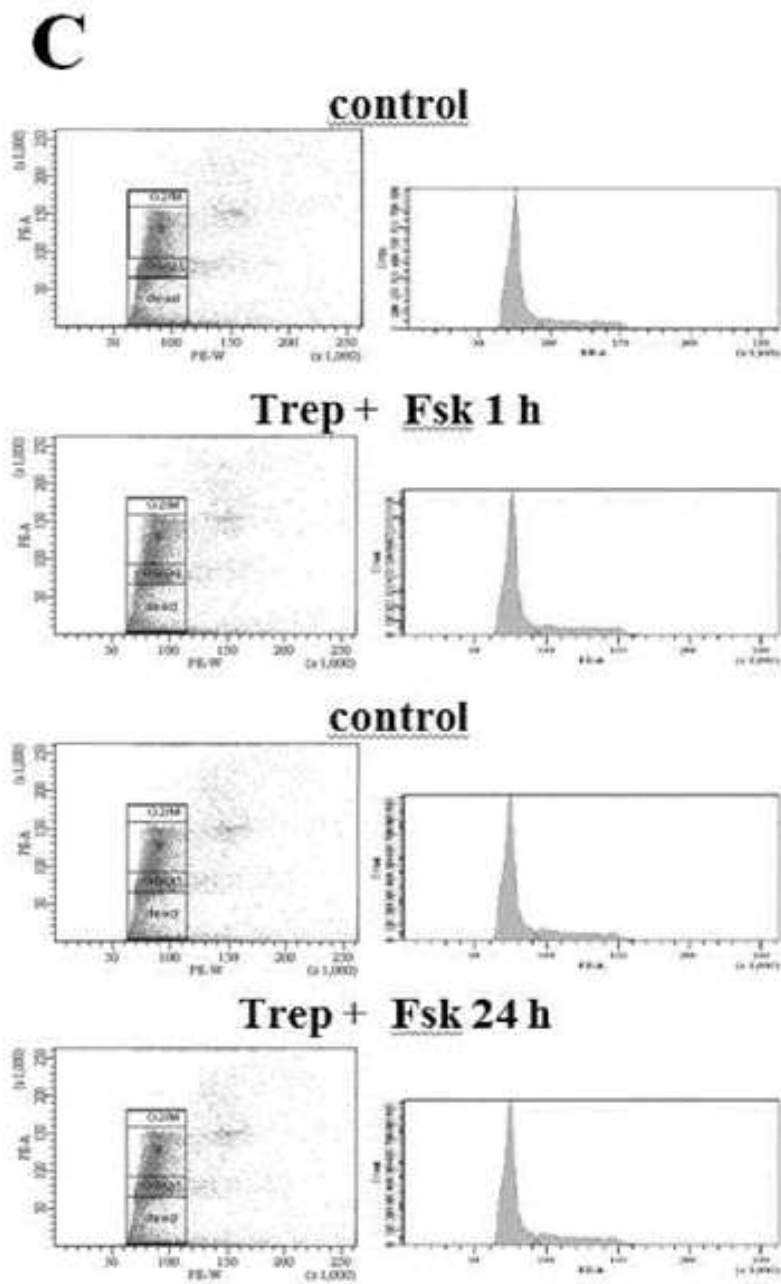
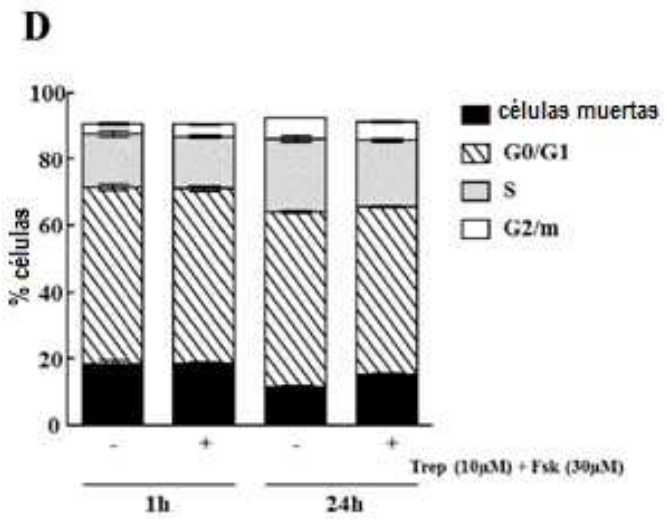


Figura 8 continuación



**E**

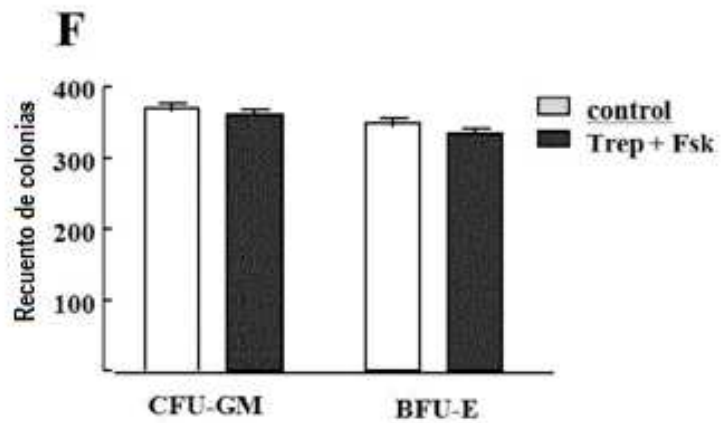
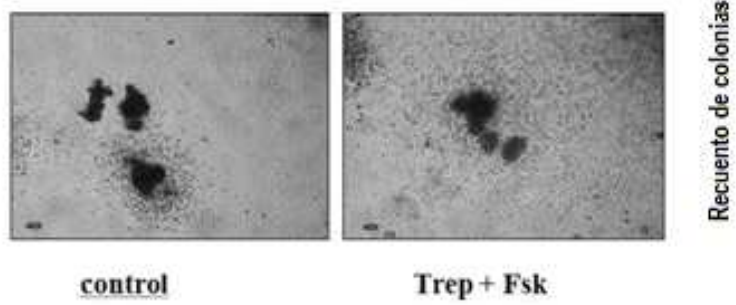


Figura 9

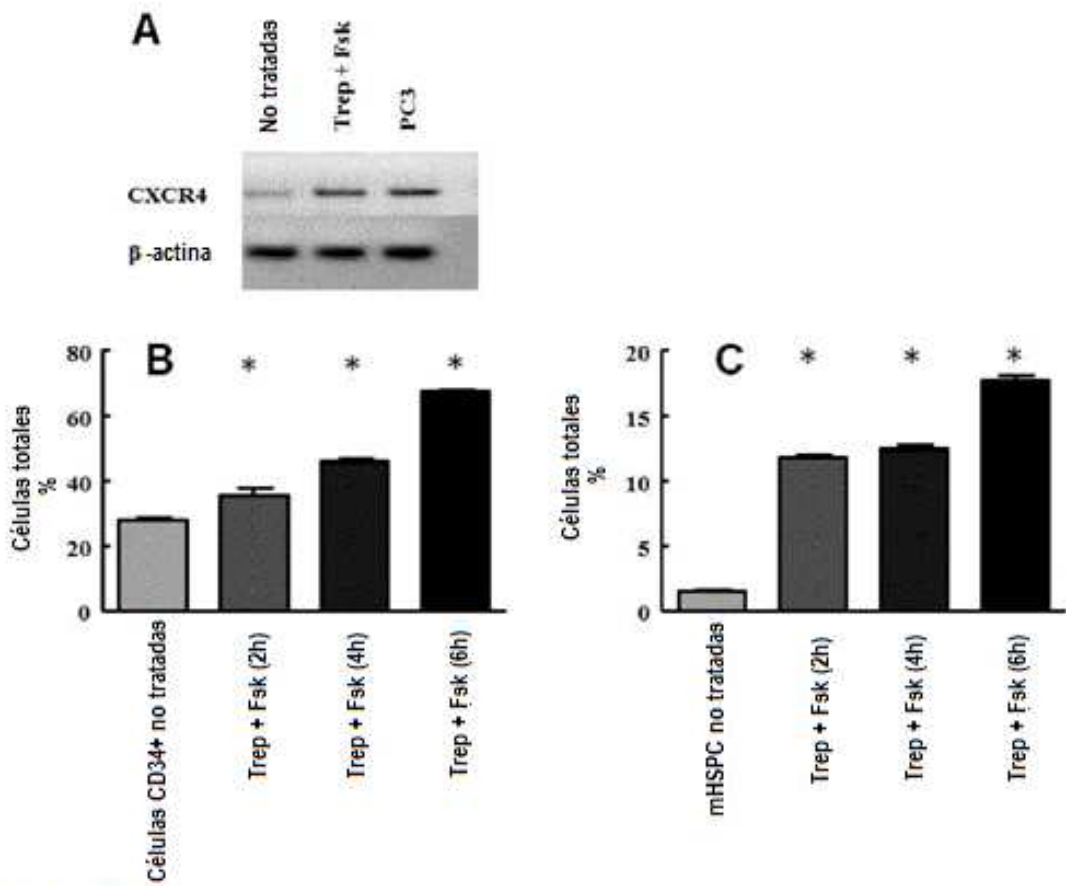


Figura 10

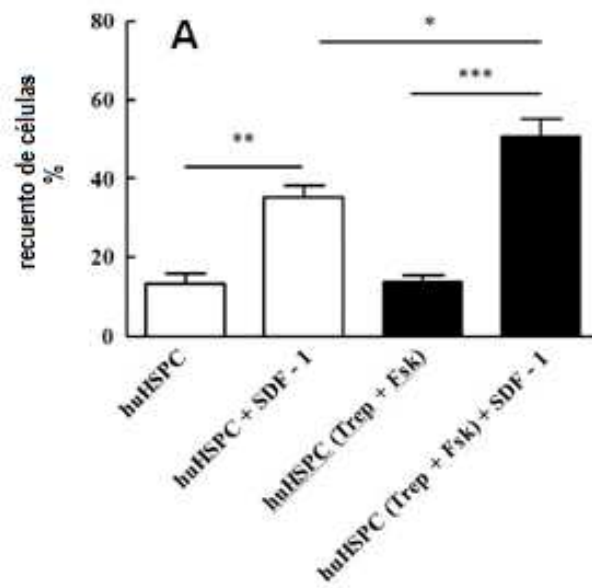


Figura 10 continuación

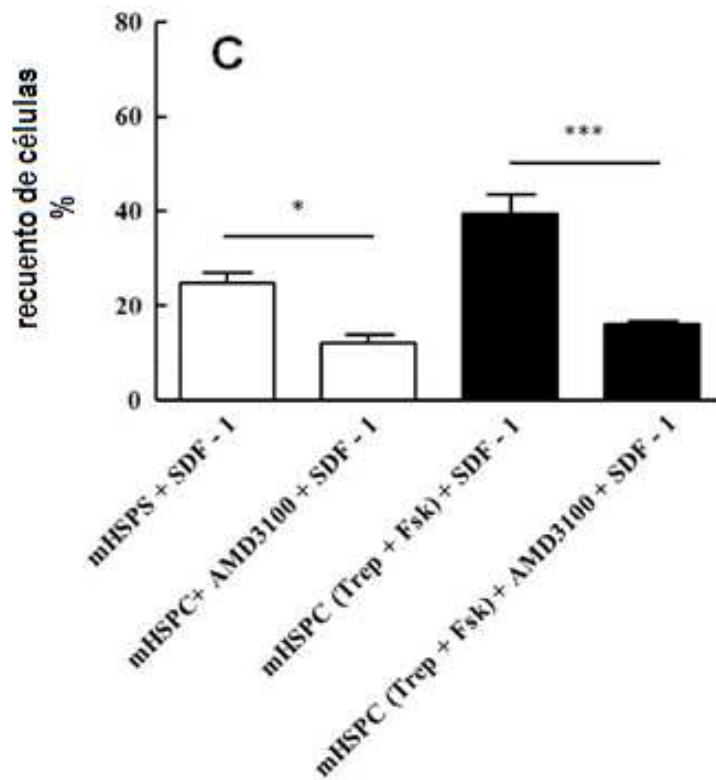
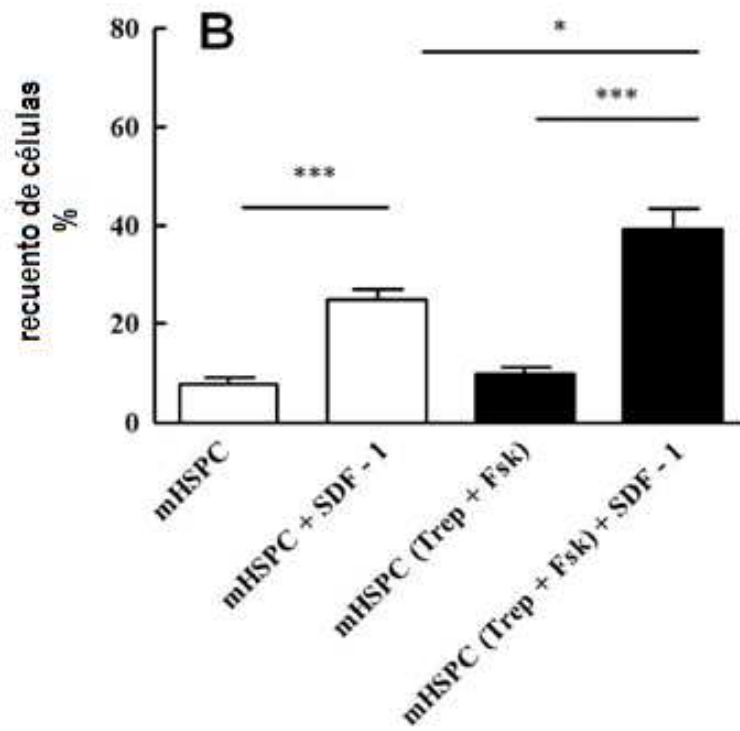


Figura 11

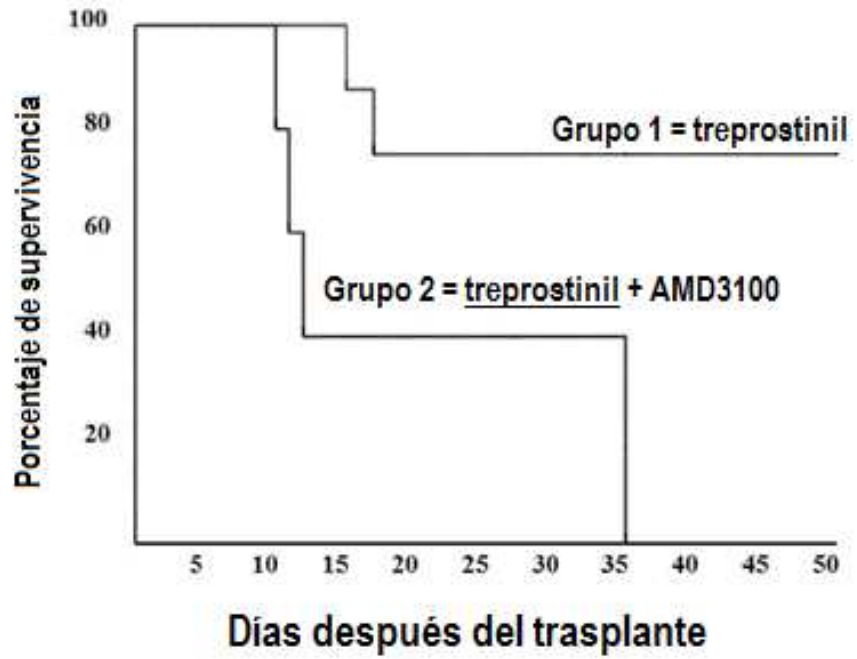


Figura 12

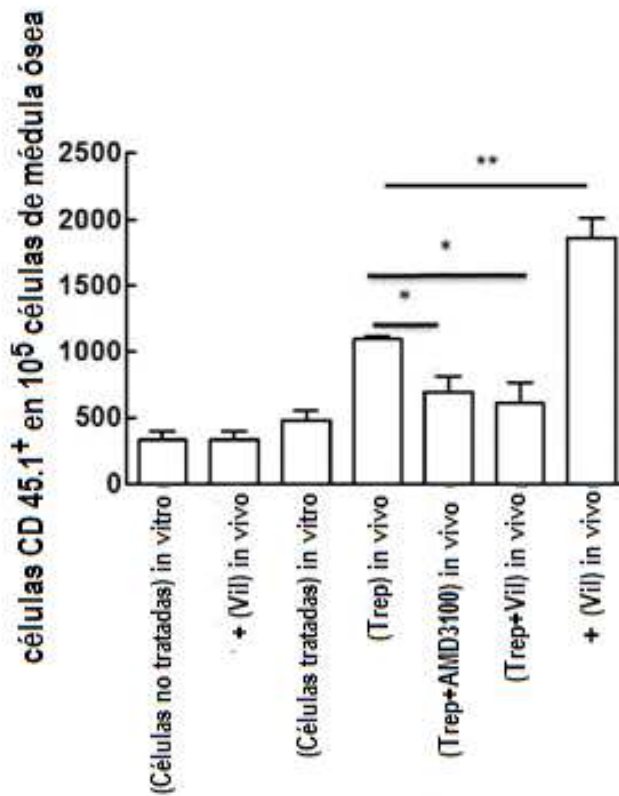


Figura 13

