

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039149**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.10

(21) Номер заявки
201791703

(22) Дата подачи заявки
2016.01.27

(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 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ВИЛДАГЛИПТИН, ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИЖИВЛЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И СПОСОБ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПОСОБНОСТИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК К ПРИЖИВЛЕНИЮ

(31) 15152664.7

(32) 2015.01.27

(33) EP

(43) 2017.11.30

(86) PCT/EP2016/051672

(87) WO 2016/120310 2016.08.04

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

(72) Изобретатель:
**Фрайсмут Михаэль, Цебедин-Брандль
Ева-Мария, Каземи Захра (AT)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) BROXMEYER HAL E. ET AL.: "Inhibition of DPP4/CD26 and dmpGE2treatment enhances engraftment of mouse bone marrow hematopoietic stem cells", BLOOD CELLS, MOLECULES AND DISEASES, vol. 53, no. 1, 3 March 2014 (2014-03-03), pages 34-38, XP028664990, ISSN: 1079-9796, DOI: 10.1016/J.BCMD.2014.02.002 the whole document

VELEZ DE MENDIZABAL NIEVES ET AL.: "Modelling the Sitagliptin Effect on Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Adults with Haematological Malignancies After Umbilical Cord Blood Haematopoietic Cell Transplantation", CLINICAL PHARMACOKINETICS, ADIS INTERNATIONAL LTD., AUCKLAND, NZ, vol. 53, no. 3, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 247-259, XP008176893, ISSN: 0312-5963 the whole document

US-A1-2014288010

WO-A1-2012095511

WO-A1-2009152186

WO-A2-2007041368

K. W. CHRISTOPHERSON: "Modulation of Hematopoietic Stem Cell Homing and Engraftment by CD26", SCIENCE, vol. 305, no. 5686, 13 August 2004 (2004-08-13), pages 1000-1003, XP055102738, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1097071 the whole document

(57) Изобретение обеспечивает новое применение композиции, включающей ингибитор дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) вилдаглиптин, после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, которые перед трансплантацией обработали in vitro аналогом простациклина. Указанное применение обеспечивает усиление миграции и хоуминга стволовых клеток. Также в соответствии с настоящим изобретением предлагается способ для повышения способности гемопоэтических клеток к приживлению.

039149 B1

039149 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение обеспечивает новое применение композиции, включающей по меньшей мере один ингибитор дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) для усиления миграции и хоуминга гемопоэтических клеток-предшественников у реципиентов, которым были трансплантированы стволовые клетки, в которой указанные гемопоэтические клетки-предшественники были обработаны *in vitro* перед трансплантацией клеток аналогом простагличина для повышения приживления клеток-предшественников. Более конкретно, предварительную обработку перед трансплантацией выполняли с аналогом простагличина и средством, повышающим уровень cAMP.

Предшествующий уровень техники

Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) представляют собой первичные примитивные клетки, способные регенерировать все продукты крови на протяжении всей жизни индивидуума, уравнивая их самообновление с дифференциацией в клетки потомства. HSC претерпевают перемещение в место расположения во время развития и циркулируют в организме млекопитающих в течение всей жизни, входя в кровоток и выходя из него для занятия ниш костного мозга на последовательных этапах хоуминга и приживания. Хоуминг представляет собой процесс, с помощью которого донорские стволовые клетки находят свой путь в костный мозг, приживание стволовых клеток означает их рост в костном мозге.

HSC обладают терапевтическим потенциалом в результате их способности восстанавливать клетки крови и иммунные клетки у реципиентов трансплантата. Кроме того, HSC обладают способностью генерировать клетки для других тканей, таких как мозг, мышцы и печень. Способы трансплантации аутологичного и аллогенного костного мозга человека в настоящее время применяют в качестве терапии таких заболеваний, как лейкоз, лимфома и другие опасные для жизни заболевания. Аутологичная трансплантация костного мозга представляет собой стандартную процедуру, которую применяют для увеличения терапевтического окна цитотоксических препаратов и, таким образом, для обеспечения интенсивной химиотерапии с высокой дозой (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). Однако для этих процедур должно быть изолировано большое количество донорского костного мозга, чтобы обеспечить достаточное количество HSC для приживания.

Направленная миграция клеток, более конкретно, хоуминг HSC, регулируется несколькими различными внутриклеточными механизмами. Во-первых, описана потребность в Gas-передаваемом сигнале *in vivo* для заполнения ниши костного мозга клетками HSC (Adams GB et al, (2009) Haematopoietic stem cells depend on Gas-mediated signaling to engraft bone marrow. *Nature* 459:103-107). Эти результаты подтверждают ранее проведенные *in vitro* эксперименты, которые показали, что активация $G\alpha_s$ способствует выживанию и дифференциации гемопоэтических стволовых клеток (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). $G\alpha_s$ представляет собой связывающую гуаниннуклеотид а-субъединицу гетеротримерного G-белка, который стимулирует все 9 изоформ связанной с мембраной аденилилциклазы млекопитающих. $G\alpha_s$ может быть постоянно активирован *ex vivo/in vitro* обработкой клеток холерным токсином. Это происходит потому, что холерный токсин APD-рибозилирует каталитический аргининовый остаток (R^{186/187/201/202}, точный номер аргинина зависит от варианта сплайсинга $G\alpha_s$); интактный остаток аргинина необходим для GTP-гидролиза и, в результате, деактивации $G\alpha_s$ (Freissmuth M, Gilman AG (1989) Mutations of Gsa 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). Повышенное приживание действительно можно наблюдать после предварительной обработки гемопоэтических стволовых клеток холерным токсином: в костном мозге было примерно в два раза больше (Lin⁺) клеток-предшественников, если препарат стволовых клеток был предварительно обработан холерным токсином (Adams, 2009). Во-вторых, HSC экспрессируют все четыре рецептора простагличина E (EP 1-4). Предварительная обработка гемопоэтических стволовых клеток (диметилированным) простагличидом E2 усиливает их приживание engraftment (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). Этот эффект опосредуется канонической Gas-зависимой передачей сигналов, потому что индуцированная cAMP активация протеинкиназы A (PKA) действует синергически с Wnt-зависимыми сигналами для стабилизации β -катенина (Goessling W et al. (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136:1136-1147).

Кроме того, PGE2 также увеличивает мРНК и экспрессию на поверхности клеток HSC CXCR4, усиливает их миграцию к фактору-1 стромальной клетки (SDF-1) *in vitro* и хоуминг к костному мозгу *in vivo* и стимулирует вход HSC в клеточный цикл и продвижение через него.

Способ усиления приживания HSC с применением аналога простагличина, необязательно, в ком-

бинации с форсколином, описан в WO2012/095511.

Также известно, что ось SDF-1-CXCR4 вовлечена в хоуминг клеток. SDF-1 играет решающую роль в регулировании направленной миграции нормальных HSC и их хоуминга и удержания в костном мозге (Kucia et al., Stem Cells, 2005).

В соответствии с WO 2009/152186 A1, ингибирование CD26 пептидазной (DPPIV, дипептидилпептидазы IV) активности может усиливать миграционную активность, и описано применение ингибиторов CD26 пептидазы для усиления хоуминга и приживления клеток.

WO 2012/074676 описывает композицию для консервации печени, содержащую антагонист GLP-1 и DPPIV-ингибитор.

Hussain Filza et al. сообщают о влиянии трепростинила на трансплантацию стволовых клеток (BMC Pharmacology, vol 11, no. Suppl 2, 2011, p A6).

US 2008/085264 раскрывает применение ингибитора DPP-IV/ингибитора CD26 пептидазы в предварительной обработке для увеличения эффективности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Broxmeyer H. et al. обеспечивают исследование трансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками. (STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2013, vol. 22, suppl. 1, pp. 103-110) и дальнейшее обсуждение применения dmPGE2 в комбинации с ситаглиптином (Broxmeyer H. and Pelus, L. 2014, Blood Cells, Molecules and Diseases 53, 34-38).

Schwaiger E. et al. раскрывают применение ингибиторов DPP-IV и раскрывают, что присутствие данных ингибиторов не приводит к приживлению костного мозга (Experimental Hematology, 2011, vol. 40, no. 2, pp. 97-106).

Hoggatt J. et al. сообщили о применении PGE2 для стимулирования гемопоэтических стволовых клеток (BLOOD, 2009, vol. 113, no. 22, pp. 5444-5455).

WO 2012/095511 описывает обработку гемопоэтических стволовых клеток трепростинилом и форсколином.

Локализация стволовых клеток после трансплантации представляет собой критический фактор для успешной трансплантации. В настоящее время, для трансплантации необходимо большое число стволовых клеток, поскольку стволовые клетки трудно приживаются в костном мозге, и существует длительный период аплазии костного мозга, что приводит к снижению зрелых клеток крови.

Таким образом, по-прежнему существует необходимость в обеспечении способов и схем обработки, чтобы эффективно стимулировать HSC для увеличения хоуминга, приживления и удержания изолированных HSC в нишах костного мозга субъектов перенесших трансплантацию костного мозга и для уменьшения числа HSC, необходимых для трансплантации.

Сущность изобретения

Задача решается с помощью воплощений настоящего изобретения.

Неожиданно было показано, что хоуминг и приживление гемопоэтических стволовых клеток могут быть успешно усилены путем *ex vivo* предварительной обработки указанных стволовых клеток и/или клеток-предшественников аналогом простациклина, стимулирующим способность к приживлению указанных клеток, и последующим введением ингибитора дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) индивидууму, которому были трансплантированы указанные гемопоэтические стволовые клетки.

Более конкретно, авторами изобретения было показано, что хоуминг и приживление гемопоэтических стволовых клеток могут быть успешно усилены путем *ex vivo* предварительной обработки указанных клеток комбинацией, включающей, по меньшей мере, один аналог простациклина, и, по меньшей мере, одно средство, повышающее уровень cAMP, и с последующим введением ингибитора дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) индивидууму, которому были трансплантированы указанные гемопоэтические стволовые клетки.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предлагается применение композиции, включающей ингибитор дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) вилдаглиптин в лечении реципиентов, которым были трансплантированы гемопоэтические стволовые клетки, обработанные *in vitro* перед трансплантацией аналогом простациклина, выбранным из группы трепростинила, илопроста, цикапроста и берапроста или их фармацевтически приемлемых солей и средством, повышающим уровень cAMP, форсколином для усиления приживления, через по меньшей мере 1 день после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

В одном из воплощений изобретения указанный аналог простациклина может представлять собой трепростинил, предпочтительно, производное трепростинила, выбранное из группы кислых производных трепростинила, пролекарств трепростинила, полиморфных модификаций трепростинила или изомеров трепростинила.

Перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, предшествующей введению указанной композиции, реципиенту можно ввести вилдаглиптин по меньшей мере за 5, более конкретно по меньшей мере за 10, более конкретно по меньшей мере за 15, более конкретно по меньшей мере за 24 ч.

Указанное применение композиции может быть осуществлено через по меньшей мере 2, более конкретно по меньшей мере 3, более конкретно по меньшей мере 4 дня после трансплантации гемопоэтиче-

ских стволовых клеток.

Настоящее изобретение охватывает применение ингибитора DPP-IV в обработке выбранной группы индивидуумов, т.е. индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга или от заболевания, связанного с костным мозгом, более конкретно, заболевание костного мозга представляет собой лейкемию, миелодиспластический синдром, миелопролиферативные расстройства, апластическую анемию, серповидно-клеточную анемию, нарушение компартментализации клеток крови, заболевания костного мозга, индуцированные химиотерапией или облучением, которые перенесли трансплантацию стволовых клеток, с применением образцов гемопоэтических стволовых клеток, которые были предварительно обработаны *in vitro* аналогом простациклина и сAMP ингибитором перед трансплантацией.

Еще более конкретно нарушение компартментализации клеток крови может представлять собой, без ограничений, гемоглобинопатию или нарушение функции нейтрофильных гранулоцитов, нарушение в Т- и/или В-лимфоцитах (например, тяжелый комбинированный иммунодефицит, агаммаглобулинемию Брутона).

Соответственно, реципиенты, которым трансплантированы гемопоэтические клетки и в отношении которых предлагается осуществлять применение по изобретению, могут страдать от заболевания костного мозга. В этом случае указанное применение композиции предназначено для использования при лечении таких индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга.

Заболевание костного мозга, при лечении которого может быть полезно применение по изобретению, представляет собой лейкемию, нарушение компартментализации клеток крови или заболевание костного мозга, индуцированное химиотерапией или облучением.

Причем указанное нарушение компартментализации клеток крови может представлять собой гемоглобинопатию, нарушение функции нейтрофильных гранулоцитов или нарушение в Т- и/или В-лимфоцитах.

В соответствии с настоящим изобретением также предлагается способ повышения возможности приживления гемопоэтических клеток, включающий следующие последовательные стадии:

- a) обеспечение образца гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников,
- b) введение эффективного количества аналога простациклина, выбранного из группы трепростинила, илопроста, цикапроста и берапроста или их фармацевтически приемлемых солей и средства, повышающего уровень сAMP, форсколина в указанные клетки,
- c) инкубирование указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимулирования G альфа_s-зависимого сигнального пути в указанных клетках,
- d) выделение указанных клеток,
- e) трансплантация указанных клеток нуждающемуся в этом индивидууму,
- f) введение указанному индивидууму эффективного количества ингибитора DPP-IV видаглиптина.

Причем указанные стволовые клетки или клетки-предшественники можно получать из пуповинной крови, донорского костного мозга или плаценты.

Изобретение неожиданно показало, что инкубирование изолированных гемопоэтических стволовых клеток перед трансплантацией с аналогом простациклина, необязательно, вместе со средством, повышающим уровень сAMP, таким как форсколин, и введение ингибитора DPP-IV незадолго до и после трансплантации указанных клеток в нуждающегося в этом пациента сильно увеличивает эффективность хоуминга и приживления HSC. Это удивительно, потому что ингибирование DPP-IV (глиптином) самого по себе не достаточно для усиления трансплантации костного мозга в мышинных моделях (Schwaiger E, et al, *Epx Hematol.* 2012 Feb; 40(2):97-106. doi: 10.1016/j.exphem.2011.10.010).

В соответствии с предпочтительным воплощением, гемопоэтические стволовые клетки инкубировали с комбинацией аналога простациклина и соединения, способного дополнительно повышать уровень сAMP форсколином.

Далее, авторами изобретения неожиданно было показано в *in vivo* модели на животных, что введение ингибитора DPP-IV видаглиптина после трансплантации указанных клеток значительно увеличивает коэффициент выживаемости реципиентов указанных гемопоэтических клеток по сравнению с введением аналога простациклина.

Кроме того, авторы изобретения показали, что комбинированное введение аналога простациклина, более конкретно, трепростинила, и ингибитора DPP-IV видаглиптина после трансплантации предварительно обработанных трепростинилом и форсколином гемопоэтических стволовых клеток взаимно антагонистично.

В соответствии с воплощением изобретения применяемая композиция содержит ингибитор DPP-IV видаглиптин.

В соответствии с конкретным воплощением изобретения, гемопоэтические стволовые клетки инкубировали *in vitro* с аналогом простациклина, который выбирают из группы трепростинила, илопроста, цикапроста и берапроста или их фармацевтически приемлемых солей, более конкретно, указанный аналог простациклина представляет собой производное трепростинила, выбранное из группы кислых производных трепростинила, пролекарства трепростинила, полиморфных модификаций трепростинила или изомеров трепростинила и безводных полиморфных модификаций трепростинила.

В соответствии с воплощением, предварительную обработку гемопоэтических стволовых клеток в дальнейшем проводят в присутствии форсколина, средства, повышающего уровень cAMP.

В соответствии с конкретным воплощением изобретения, индивидуумов, которым после трансплантации вводили аналоги простациклина, не включали в группу индивидуумов для лечения ингибитором DPP-IV.

В соответствии с воплощением изобретения, ингибитор DPP-IV представлял собой вилдаглиптин, и гемопоэтические стволовые клетки перед трансплантацией были обработаны *in vitro* трепростинилом и форсколином.

Введение ингибитора DPP-IV может осуществляться в течение периода, необходимого для достаточного приживления стволовых клеток в костном мозге.

Воплощение настоящего изобретения также охватывает введение ингибитора DPP-IV в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 10 дней, предпочтительно в течение по меньшей мере 14 дней после трансплантации костного мозга.

В соответствии с изобретением композиция может быть введена с помощью внутривенного или подкожного введения, или в доступной пероральной форме, выбранной из группы, включающей формы с замедленным высвобождением, таблетки и капсулы.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - преинкубация гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников мышей и человека в присутствии трепростинила и форсколина усиливает их миграцию в направлении к SDF-1/CXCL12.

Фиг. 2 - ингибирование CXCR4-антагонистом AMD3100 SDF-1/CXCL12-индуцированной миграции мышинных гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, которые были стимулированы в присутствии с трепростинилом и форсколином.

Фиг. 3 - вилдаглиптин усиливает миграцию гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином, в направлении к SDF-1/CXCL12.

Фиг. 4 - вилдаглиптин и трепростинил усиливает хоуминг гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином, но взаимно антагонистичны при комбинировании *in vivo*.

Фиг. 5 - комбинированное введение трепростинила и вилдаглиптина летально облученным мышам-реципиентам BALB/c, которым были введены с помощью инъекции гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники, предварительно обработанные *in vitro* комбинацией трепростинила и форсколина, было менее эффективно в повышении выживаемости этих мышей по сравнению *in vivo* введением или вилдаглиптина, или трепростинила по отдельности.

Фиг. 6 - экспрессия простаноидного рецептора (A, B) в мышинных и человеческих гемопоэтических стволовых клетках и клетках-предшественниках (HSPCs). РНК изолировали из мышинных (A) и человеческих HSPCs (B) и подвергали обратной транскрипции. РНК, полученная из мышинных мозговых клеток (смешанная культура нейронов и глиальных клеток) и клеточных линий человека PC3 и HCT116, служила в качестве положительного контроля. ПНР-зависимую амплификацию проводили, применяя праймеры, перечисленные в табл.1. Ампликон для всех E-простаноидных рецепторов (от EP1 до EP4), I-простаноидный рецептор (IP) и D-простаноидный рецептор-1 (DPI) электрофоретически разделяли на агарозном геле и визуализировали путем окрашивания бромистым этидием. Полоса, помеченная H₂O обозначает контроль, в котором амплификация была проведена без предшествующей обратной транскрипции. мРНК, кодирующую GAPDH, амплифицировали в качестве внутреннего эталона.

Фиг. 7 - сравнение трепростинил- и dmPGE2-индуцированного накопления cAMP в человеческих HSPCs.

Фиг. 8 - предварительная обработка мышинных и человеческих HSPCs трепростинилом и форсколином не индуцирует апоптоз и не изменяет прогрессию клеточного цикла или способность клеток к дифференциации. Человеческие HSPCs инкубировали с 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином в течение 1-го часа. В дальнейшем, (A, B) индукцию апоптоза и (C, D) прогрессию клеточного цикла оценивали с помощью проточного цитометрического анализа. Никакой разницы в апоптотических клетках или в распределении клеток в соответствии с фазами G0/1, S и G2 не было обнаружено между необработанными и обработанными клетками (однофакторный ANOVA). (E, F). Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n = 3).

Фиг. 9 - *in vitro* предварительная обработка трепростинилом и форсколином усиливает экспрессию CXCR4 (A и B) и CD26/DPPIV (B).

Фиг. 10 - *in vitro* предварительная обработка трепростинилом и форсколином усиливает действие SDF-1 через CXCR4.

Фиг. 11 - *in vivo* введение CXCR-4-антагониста (AMD3100) отменяет положительный эффект трепростинила на выживаемость мышей-реципиентов. Мышине HPSCs предварительно обрабатывали *in*

vitro трепростинилом и форсколином как указано в легенде к фиг. 4 и вводили с помощью инъекции (2×10^5 на мышь) летально облученным мышам-реципиентам. В дальнейшем их разделяли на две группы. Мышей, выделенных в группу 1 ($n = 10$), дополнительно подвергали *in vivo* обработке трепростинилом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 ч}^{-1}$), в то время как мыши в группе 2 ($n = 10$) получали как трепростинил ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 ч}^{-1}$), так и AMD3100 ($3,3 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 ч}^{-1}$) путем подкожной инъекции каждые 8 часов в течение 10-ти дней. Разница между двумя кривыми выживаемости была статистически значимой ($P = 0,007$, лог-ранговый критерий).

Фиг. 12 - *in vivo* обработка мышей-реципиентов вилдаглиптином и трепростинилом по одиночке, но не их комбинацией, усиливает хоуминг HSPCs, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином.

Фиг. 13 - *in vivo* введение ингибитора DPP-IV вилдаглиптина по одиночке, усиливает положительный эффект *in vitro* обработки HSPCs трепростинилом и форсколином на выживаемость мышей-реципиентов.

Подробное описание изобретения

Обеспечение способы и средства для усиления хоуминга и приживание HSC в окружении костного мозга имеет серьезные биологические и медицинские последствия. Локализация стволовых клеток с последующей трансплантацией имеет большое значение для клинических процедур, поскольку в настоящее время огромное число стволовых клеток требуются для клинической трансплантации, что приводит к необходимости больших количеств донорских клеток. Такие способы также очень полезны, поскольку значительное число аутологичных донорских трансплантатов содержат недостаточное количество стволовых клеток, или HSC. Аналогично, пациенты часто не могут найти гистосовместимых доноров, подчеркивая необходимость в способах и композициях для уменьшения числа HSC, необходимых для успешной трансплантации. Возможность улучшать способность к хоумингу и приживлению HSC *in vitro* или *ex vivo* позволяет собирать меньше клеток от доноров, тем самым уменьшая время и дискомфорт, связанный со сбором стволовых клеток костного мозга/ периферических стволовых клеток, и увеличение количества доноров, желающих дать HSC.

Настоящее изобретение обеспечивает новое применение ингибиторов дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) в лечении пациентов, которые были подвергнуты трансплантации гемопоэтических клеток-предшественников при условии, что указанные стволовые клетки, примененные для трансплантации, инкубировали, по меньшей мере, с одним аналогом простагличина для повышения приживания клеток, более конкретно, со средством, повышающим уровень cAMP, перед введением или возвращением указанных клеток в организм индивидуума.

Гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники, более конкретно, мышинные и человеческие гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPCs) экспрессируют несколько простагличидных рецепторов (т.е., EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, IP и DP₁, фиг. 6). Известно, что трепростинил специфически активирует все G_s-сопряженные рецепторы, т.е. рецепторы EP₂, EP₄, IP и DP₁, в то время как dmPGE₂ также стимулирует рецепторы EP₃. Авторы изобретения показали, что трепростинил стимулирует cAMP в гемопоэтических клетках-предшественниках. В человеческих гемопоэтических стволовых клетках и клетках-предшественниках, кривая концентрация-ответ для трепростинила была более чем на два порядка между 10 и 90% от ответа. Это согласуется с активацией нескольких стимулирующих рецепторов. Трепростинил-индуцированное cAMP-накопление может быть повышено при комбинировании с форсколином, прямым активатором аденилатциклазы.

Гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники могут быть обработаны комбинацией трепростинила и форсколина без какого-либо заметного воздействия на их жизнеспособность и их способность в дальнейшем пройти асимметричное деление клеток и дифференциацию в эритроидную и гранулоцитарную/моноцитарную линию дифференцировки. Таким образом, число клеток, необходимых для трансплантации будет значительно ниже по сравнению с клетками, необходимыми для трансплантации без предварительной обработки аналогом простагличина и форсколином.

Предварительная обработка гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников комбинацией трепростинила и форсколина усиливает приживание костного мозга в облученных организмах.

Дополнительная обработка реципиента трепростинилом *in vivo* дополнительно усиливает приживание костного мозга.

Указанные ингибиторы DPP-IV более конкретно выбирают из группы глиптинов.

Как применено в настоящем документе и в формуле изобретения, форма единственного числа включает форму единственного числа, если только контекст явно не указывает иное.

Более конкретно, аналог простагличина выбирают из группы трепростинила, илопроста, берапроста и цикапроста или их фармацевтически приемлемых солей. Трепростинил представляет собой синтетический аналог простагличина и метаболически стабилен. Трепростинил представлен на рынке как Remodulin™. Трепростинил представляет собой (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[f]инден-5-ил] окси]уксусной кислоты моносодиевую соль.

Илопрост представлен на рынке как "Ilomedine" и представляет собой 5-{{(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-гидрокси-6[(E)-(3S,4RS)-3-гидрокси-4-метил-1-октен-6-инил]-би-цикло[3,3,0]октан-3-илиден} пентановую кислоту.

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

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

В соответствии с настоящим изобретением термин "аналоги простаглицина" включает функциональные производные и функциональные аналоги указанных веществ.

Термины "аналог" или "производное" относятся к химической молекуле, которая подобна другим химическим веществам по структуре и функции, часто отличаясь по структуре на один элемент или группу, которые могут отличаться путем изменения более чем одной группы (например, 2, 3, или 4 групп), если она сохраняет ту же функцию, что и родительское химическое соединение. Такие модификации являются обычными для квалифицированных специалистов, и включают, например, дополнительные или замещенные химические группировки, такие как сложные эфиры или амиды кислоты, защитные группы, таких как бензильная группа для спирта или тиола, и трет-бутоксикарбонильные группы для амина. Также включены модификации алкильных боковых цепей, таких как алкильные замещения (например, метальные, диметальные, этильные и т.п.), модификации на уровне насыщенности или ненасыщенности боковых цепей и добавления модифицированных групп, таких как замещенные фенильные и феноксильные группы. Производные также могут включать конъюгаты, такие как биотиновые или авидиновые группировки, ферменты, такие как пероксидаза хрена и им подобные, и радио-меченые, биолюминесцентные, хемилюминесцентные или флуоресцентные группировки. Кроме того, группировки могут быть добавлены к средствам, описанным в настоящем документе, для изменения их фармакокинетических свойств, таких как для усиления полураспада *ex vivo*, или для усиления их способности проникать в клетки, среди других желательных свойств. Пролекарства, о которых известно, что они усиливают многочисленные желательные качества фармацевтических препаратов (например, растворимость, биодоступность, производство и т.п.), также включены.

Термин "производное" также включает в своем объеме изменения, внесенные в родительскую молекулу, включая дополнения, удаления и/или замещения, которые обеспечивают для функционально эквивалентных или функционально улучшенных молекул.

В соответствии с конкретным воплощением изобретения, производное трепростинила выбирают из группы кислых производных трепростинила, пролекарств трепростинила, полиморфных модификаций трепростинила, безводных полиморфных модификаций трепростинила или изомеров трепростинила.

Аналогично, илопрост, цикапрост или берапрост могут представлять собой производные из группы кислых производных, полученных из них пролекарств, полиморфных модификаций или изомеров.

В соответствии с конкретным воплощением изобретения, два, более конкретно, три или более различных аналогов простаглицина могут быть применены в способе изобретения. Альтернативно, четыре, пять или шесть или еще больше различных аналогов простаглицина могут быть применены.

Более конкретно, в дополнение к аналогу простаглицина, может быть применен (диметилированный) простаглицин E2.

16,16-диметил PGE₂ представляет собой конкурентный ингибитор 15-гидрокси-PGDH, но он не представляет собой субстрат для фермента. Из-за его устойчивости к метаболизму под действием 15-гидрокси-PGDH, он имеет продленное время полураспада *in vivo*. 16,16-диметил-PGE₂ действует как агонист на большинство подтипов рецепторов EP. K_d активации изолированных EP₂ рецепторов равно примерно 1 нМ.³ 16,16-диметил-PGE₂ применяют для сохранения свойств самообновления, предотвращая дифференциацию гемопоэтических стволовых клеток при экспансии в культуре.^{4,5} DPP-IV представляет собой неклассическую сериновую, мембраносвязанную аминодипептидазу, которая удаляет дипептиды Хаа-Pro с amino-конца полипептидов и белков. Внутри костного мозга, DPP-IV локализована в специализированных микродоменах на мембранах стромы соединительной ткани.

Глиптины представляют собой класс селективных гипогликемических средств, которые ингибируют DPP-IV, применяемую, в основном, при лечении сахарного диабета. Глиптины помогают снизить постпрандиальную глюкозу путем ингибирования расщепления глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1), усиливающего секрецию инсулина, синтезируемого клетками стенки кишечника в ответ на прием пищи.

Глиптины, воплощенные в настоящем изобретении, более конкретно выбирают из группы, состоящей из ситаглиптина, вилдаглиптина, алоглиптина, саксаглиптина, линаглиптина, анаглиптина, тенелиглиптина, гемиглиптина или дутоглиптина и любых других глиптинов, которые, как было показано, представляют собой мощные ингибиторы очищенной, растворимой дипептидилпептидазы или дипептидилпептидазы клеточной поверхности.

Более конкретно, введение ингибитора DPP-IV индивидууму может быть осуществлено до, во время или после введения HSC, которые были предварительно обработаны в соответствии с изобретением.

В соответствии с изобретением, термины "обработка", "предварительная обработка" или "инкубация" могут быть применены взаимозаменяемо. Термины применяют в отношении к изолированным ге-

мезенхимным стволовым клеткам, которые приведены в контакт с аналогом простаглицина и средством, повышающим уровень cAMP.

Еще более конкретно, это означает, что образец, содержащий гемопоэтические стволовые клетки, смешивают, по меньшей мере, с одним аналогом простаглицина и по меньшей мере с одним средством, повышающим уровень cAMP, с получением смеси, инкубирование указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимулирования G альфа₂-сигнального пути в указанных клетках.

В соответствии с конкретным воплощением, композиция для применения может содержать трепростинил вместе с одним из следующего: илопрост, берапрост или цикапрост, и средством, повышающим уровень cAMP, более конкретно, форсколином. Альтернативно, трепростинил может быть смешан в комбинации с больше, чем одним, например, с двумя, тремя, четырьмя или пятью другими аналогами простаглицина, например, без ограничений, с илопростом, берапростом или цикапростом или их физиологически приемлемыми солями в комбинации со средством, повышающим уровень cAMP, более конкретно, с форсколином.

В соответствии с применением изобретения, ингибитор DPP-IV представляет собой вилдаглиптин и гемопоэтические стволовые клетки перед трансплантацией обрабатывают *in vitro* трепростинилом и форсколином.

В соответствии с альтернативным способом, ингибитор DPP-IV выбирают из ситаглиптина, алоглиптина, саксаглиптина и линаглиптина, анаглиптина, тенелиглиптина, гемиглиптина и дутоглиптина и гемопоэтические стволовые клетки перед трансплантацией обрабатывают *in vitro* трепростинилом и форсколином.

В соответствии с дополнительным альтернативным способом ингибитор DPP-IV выбирают из ситаглиптина, вилдаглиптина, алоглиптина, саксаглиптина и линаглиптина, анаглиптина, тенелиглиптина, гемиглиптина и дутоглиптина и гемопоэтические стволовые клетки перед трансплантацией обрабатывают *in vitro* илопростом и форсколином.

В соответствии с дополнительным альтернативным способом ингибитор DPP-IV выбирают из ситаглиптина, вилдаглиптина, алоглиптина, саксаглиптина и линаглиптина, анаглиптина, тенелиглиптина, гемиглиптина и дутоглиптина и гемопоэтические стволовые клетки перед трансплантацией обрабатывают *in vitro* берапростом и/или цикапростом и форсколином.

В соответствии с конкретным воплощением для предварительной обработки стволовых клеток могут быть применены средство, повышающее уровень циклического AMP (сAMP), или, в качестве альтернативы, лиганд к рецептору простаглицина EP. Примеры средств, повышающих уровень cAMP, включают, без ограничений, дибутирил-сAMP (DBcAMP), форболовый эфир, форсколин, скларелин, 8-бром-сAMP, холерный токсин (СТ), аминофиллин, 2,4-динитрофенол (DNP), норадреналин, эпинефрин, изопротеренол, изобутилметил-ксантин (IBMX), кофеин, теофиллин (диметилксантин), допамин, ролипрам, простаглицин E₁, простаглицин E₂, гипофизарный аденилатциклаза-активирующий полипептид (РА-САР) и вазоактивный кишечный полипептид (VIP), среди других, известных в данной области техники, могут быть добавлены до инкубации к стволовым клеткам или к смеси стволовые клетки/трепростинил или стволовые клетки/трепростинил, илопрост, цикапрост и/или берапрост. Примеры средств, повышающих уровень cAMP, также включают сAMP и аналоги сAMP, такие как sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS), среди прочего.

Форсколин особенно предпочтителен для включения в композицию.

Количество аналога простаглицина зависит от способа получения стимулированных HSC.

Очень конкретно, для применения по изобретению, эффективная концентрация трепростинила находится в диапазоне от 0,1 до 100 мкМ, более конкретно от 1 до 50 мкМ, более конкретно от 5 до 25 мкМ, более конкретно, примерно 10 мкМ.

В соответствии с изобретением термин "примерно" включает отклонение численного значения не более чем на 10%, более конкретно не более чем на 5%, еще более конкретно не более чем на 1%. В качестве примера термин "примерно 10 мкМ", таким образом, определяет диапазон от 9 до 11 мкМ, более конкретно от 9,5 до 10,5 мкМ, более конкретно от 9,9 до 1,1 мкМ.

В соответствии с дополнительным конкретным воплощением изобретения, оптимальный диапазон концентраций для аналога простаглицина соответствует от 10- до 30-кратному превышению его EC₅₀ для стимуляции накопления сAMP в указанных клетках.

В соответствии с конкретным воплощением изобретения, отношение аналога простаглицина и форсколина может быть примерно 1:3. HSC, обработанные форсколином и аналогами простаглицина, могут быть очищены перед повторной имплантацией, однако, данные HSC также могут быть реимплантированы без дальнейших этапов очистки, поскольку небольшие количества форсколина могут присутствовать, но не могут вызвать никаких отрицательных побочных эффектов.

В соответствии с конкретным аспектом, концентрация средства, повышающего уровень cAMP, более конкретно, форсколина, примененного для инкубирования стволовых клеток, может быть между 1 и 100 мкМ, более конкретно между 10 и 50 мкМ, примерно 30 мкМ.

Ингибитор DPP-IV вводят по меньшей мере за 5, более конкретно по меньшей мере за 10, более конкретно по меньшей мере за 15, более конкретно по меньшей мере за 24 ч до трансплантации гемопо-

этических стволовых клеток.

Альтернативно, ингибитор DDP-IV может быть введен пациенту предоперационно, т.е. за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней до проведения трансплантации, и/или после операции, т.е., по меньшей мере через 5, более конкретно по меньшей мере через 10, более конкретно по меньшей мере через 15, более конкретно по меньшей мере через 24 ч после трансплантации, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более дней.

Более конкретно вилдаглиптин может быть введен индивидууму в количестве от 50 до 200 мг/день, более конкретно от 75 до 150 мг/день, более конкретно примерно 100 мг/день.

Более конкретно, ситаглиптин может быть введен индивидууму в количестве от 50 до 200 мг/день, более конкретно от 75 до 150 мг/день, более конкретно примерно 100 мг/день.

Более конкретно саксаглиптин может быть введен индивидууму в количестве примерно от 2,5 до 10 мг/день, более конкретно примерно 5 мг/день.

Более конкретно линаглиптин может быть введен индивидууму в количестве примерно от 2,5 до 10 мг/день, более конкретно примерно 5 мг/день.

Более конкретно алоглиптин может быть введен индивидууму в количестве примерно от 12,5 до 50 мг/день, более конкретно примерно 25 мг/день.

Способ изобретения преимущественно обеспечивает стимулированные стволовые клетки, которые можно непосредственно вводить индивидуумам и которые в дальнейшем стимулируют хоуминг и приживание указанных клеток.

"Индивидуум" в широком смысле означает включение любого животного, более конкретно, млекопитающих, более конкретно, людей, которым трансплантируют стволовые клетки, предварительно обработанные в соответствии с изобретением.

HSC, обработанные глиптином и аналогом простациклина, могут быть очищены до повторной трансплантации, однако, данные HSC также могут быть повторно трансплантированы без дальнейших этапов очистки.

Период времени, необходимый для стимулирования G-альфа_s-сигнального пути в указанных клетках, могут быть измерены в соответствии с известными способами, например, путем применения измерений cAMP, среди которых есть много вариантов: RIA, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) с EPAC (epac1) (Ponsiouen B. et al, EMBO reports, 5, 12, 1176-1180 (2004)), радиохимические способы и т.п. Стимулированные клетки, в которых протекает G-альфа_s-сигнальный путь, могут быть выбраны или дискриминированы или изолированы из нестимулированных клеток способами, известными в данной области техники, таким как cAMP-репортер на основе FRET.

Период времени, который необходим для ингибирования пептидазной активности CD26 и эффективен для усиления миграционного ответа на SDF-1 в указанных клетках, может быть измерен в соответствии с известными способами, например, путем флуорометрического определения расщепления Ала-Про-7-амидо-трифторметилкумарина. Альтернативно, ингибирование расщепления природных субстратов, таких как CXCL12 или GLP-1 можно контролировать с помощью HPLC или ELISA.

В соответствии с воплощением изобретения, время инкубации для соответствующих клеток равно примерно от 30 мин до 24 ч, предпочтительно примерно от 1 ч до 12 ч, предпочтительно примерно от 1 часа до 4 ч.

В соответствии с дополнительным воплощением, *in vitro* время инкубации для предварительной обработки HSC аналогом простациклина и средством, повышающим уровень cAMP, равно по меньшей мере, 10 мин, более конкретно по меньшей мере 20 мин, по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 40 мин, по меньшей мере 50 мин, по меньшей мере 60 мин.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения, по меньшей мере 1×10^5 донорских клеток/мл инкубировали с аналогом простациклина и средством, повышающим уровень cAMP, при примерно 37°C.

cAMP-зависимый путь представляет собой существенный путь для содействия приживлению гемопоэтических стволовых клеток. Авторами изобретения было показано, что аналог простациклина может запускать повышение cAMP в гемопоэтических стволовых клетках. Это достигается путем активации нескольких рецепторов, т.е. IP- и EP-рецепторов, таким образом, приводя к усилению G альфа_s-сигнального пути. Соответственно, такие аналоги простациклинов как трепростинил, илопрост, цикапрост или берапрост, более эффективно повышают уровни cAMP.

Термин "гемопоэтические стволовые клетки" (HSC) или более общий термин "стволовые клетки" понимают как эквивалентные термины в описании настоящего изобретения, и, в общем, относятся или к плюрипотентным, или к мультипотентным "стволовым клеткам", которые приводят к появлению типов клеток крови, включающих миелоидную (например, моноциты и макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакарициты/тромбоциты, древовидные клетки) и лимфоидную линии дифференцировки (например, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки), и другие, известные в данной области техники.

"Стволовые клетки" обычно характеризуются по их способности к формированию нескольких ти-

пов клеток (т.е. мультипотентные) и по их способности к самообновлению. Однако олигопотентные и унипотентные клетки-предшественники также могут быть включены.

Термин "клетка-предшественник" включает такую биологическую клетку, которая, как стволовая клетка, имеет тенденцию к дифференциации в конкретный тип клеток, но уже более специфический, чем у стволовых клеток и подталкивается к дифференциации в свою клетку-"мишень". Клетки-предшественники представляют собой ранних потомков стволовых клеток, которые могут дифференцироваться с формированием одного или более типов клеток. Самое важное различие между стволовыми клетками и клетками-предшественниками заключается в том, что стволовые клетки могут реплицироваться бесконечно, в то время как клетки-предшественники могут делиться только ограниченное число раз. Большинство клеток-предшественников описывают как олигопотентные, их можно сравнить с взрослыми стволовыми клетками. Говорится, что клетки-предшественники находятся на следующей стадии клеточной дифференциации. Они находятся в "центре" между стволовыми клетками и полностью дифференцированными клетками. Тип потенциала, которым они обладают, зависит от типа их "родительских" стволовых клеток, а также от их ниши. Клетки-предшественники могут перемещаться по организму и мигрировать в направлении к ткани, где они необходимы. Многие свойства являются общими для взрослых стволовых клеток и клеток-предшественников.

Клеток-предшественников обнаруживают во взрослых организмах, и они действуют как система репарации организма. Они пополняют специальные клетки, но также поддерживают кровь, кожу и кишечные ткани. Их также можно обнаружить в развивающейся эмбриональной ткани поджелудочной железы.

Термин "гемопозз", в общем, относится к процессу клеточной дифференциации или формированию специализированных клеток крови из HSC. Во время развития, гемопозз транслицируется из печени эмбриона в костный мозг, который затем остается местом гемопозза в течение взрослой жизни. После обоснования в костном мозге, HSC не распределяются случайным образом по всей полости кости. Скорее, HSC обычно находятся в непосредственной близости от эндостальных поверхностей. Более зрелые стволовые клетки увеличиваются в числе по мере увеличения расстояния от поверхности кости.

Гемопозгические ткани содержат клетки с возможностью долговременной и кратковременной регенерации, а также коммитированные мультипотентные, олигопотентные и унипотентные клетки-предшественники.

Образец, содержащий HSC, более конкретно, может представлять собой костный мозг.

HSC могут быть получены с помощью известных методик из любого источника, о котором известно, что он содержит HSC, более конкретно, из периферической крови, пуповины или пуповинной крови, плаценты и костного мозга. Альтернативно, возможны также такие источники, как фетальная печень, фетальная селезенка и аорта-гонада-мезонефрос животных. HSC, происходящие из человека, предпочтительны для способов и композиций изобретения.

Например, HSC могут быть найдены в костном мозге взрослых, включая бедренную кость, тазобедренный сустав, ребра, грудину и другие кости. HSC могут быть получены непосредственно путем извлечения из тазобедренного сустава, с применением иглы и шприца, или из крови, часто с последующей предварительной обработкой цитокинами, такими как G-CSF (гранулоцитарные колониестимулирующие факторы), которые побуждают клетки к высвобождению из компартмента костного мозга.

HSC могут быть идентифицированы в соответствии с определенными фенотипическими или генотипическими маркерами. Например, HSC могут быть идентифицированы по их малым размерам, отсутствию маркеров линии дифференцировки (лин), слабому окрашиванию (боковая популяция) витальными красителями, такими как родамин 123 (ρ^{10}) или Хехст 33342, и наличию различных антигенных маркеров на их поверхности, многие из которых принадлежат к сериям кластеров дифференцировки (например, CD5, CD11b, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4, Ter-119 и c-kit). HSC в основном отрицательны для маркеров, которые обычно применяют для обнаружения коммитирования линии дифференцировки, и, таким образом, их часто обозначают как lin(-) клетки. Большинство человеческих HSC могут быть охарактеризованы как CD5⁺, CD45R (B220)⁺, CD11⁺, GR-1⁺, CD34⁺, CD59⁺, Thyl/CD90⁺, CD38^{low}, C-kit/CD117⁺ и lin(-). Однако, не все стволовые клетки охвачены этими комбинациями, поскольку некоторые HSC представляют собой CD347⁺ и CD38⁺. Также некоторые исследования показывают, что ранним стволовым клеткам может не хватать c-kit на клеточной поверхности.

Для очистки lin(-) HSC с помощью проточной цитометрии, или FACS, может быть применена панель антител к маркерам линии дифференцировки зрелой крови для истощения Нп(+) клеток или поздних мультипотентных клеток-предшественников (MPP), включая, например, антитела к CD3ε, CD5, CD45R, CD11b, CD16, GR-1, 7-4 и Ter-119, CD 13, CD32 и CD33, CD71, CD 19, CD61, Mac-1 (CD11b/CD18), Gr-I, 117Ra, CD3, CD4, CD5 и CD8 среди прочих, известные в данной области техники. Дополнительные способы очистки известны в данной области техники, например, способы, в которых применяют конкретную подпись 'молекул активации сигнального пути лимфоцитов' (SLAM), семейства молекул клеточной поверхности.

HSC, будь то из пуповинной крови, костного мозга, периферической крови или из других источников, можно растить или размножать в любой подходящей, коммерчески доступной или сделанной по

заказу среде, с сывороткой или без нее. HSC из человеческого источника представляют собой предпочтительное воплощение изобретения. Например, в определенных воплощениях, в свободной от сыворотки среде может быть применен альбумин и/или трансферрин. Кроме того, могут быть включены цитокины, такие как лиганд Flt-3, фактор стволовых клеток (SCF) и тромбопоэтин (TPO), среди прочего. HSC также можно растить в сосудах, таких как биореакторы. Подходящие для *ex vivo* размножения HSC могут также включать HSC-поддерживающие клетки, такие как стромальные клетки (например, лимфоретикулярные стромальные клетки), которые могут быть получены, например, при дезагрегации лимфоидной ткани, и которые, как было показано, способствуют *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* поддержанию, росту и дифференциации HSC, а также их потомства.

Термин "пуповинная кровь" или "пупочная пуповинной крови", в общем, относится к относительно небольшому количеству крови (вплоть до примерно 180 мл) От новорожденного младенца, который возвращается к неонатальному кровообращению. Пуповинная кровь богата HSC, и ее можно получать и хранить для последующего применения в соответствии с известными в данной области техники методами.

Термины "*ex vivo*" или "*in vitro*" относятся к действиям, которые происходят вне организма, таким как экспериментирование или измерения, выполненные в или на живой ткани в искусственной среде вне организма, предпочтительно, с минимальным изменением естественных условий. В определенных воплощениях, такие ткани или могут быть собраны и заморожены, и позже разморожены для *ex vivo* обработки. Эксперименты или процедуры с тканевой культурой, длящиеся дольше нескольких дней, с применением живых клеток или ткани, как правило, рассматриваются как "*in vitro*", хотя этот термин

может быть применен взаимозаменяемо с *ex vivo*. Отсылки к "*ex vivo* введение", "*ex vivo* обработка" или "*ex vivo* терапевтическое применение", в общем, относятся к медицинским процедурам, в которых один или несколько органов, клеток или тканей, полученных из живого или недавно умершего субъекта, необязательно, очищенных/обогащенных, подвергают обработке или процедуре для обработки стволовых клеток или клеток-предшественников (например, *ex vivo* стадия введения, которая включает инкубирование клеток с композицией настоящего изобретения для усиления потенциала приживления HSC), и затем введению тому же или другому индивидууму после данной необязательной обработки или процедуры.

Количество ингибитора DPP-IV, введенное индивидууму, зависит от характеристик данного субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и переносимость лекарственных препаратов, а также степень, тяжесть и тип реакции на трепростинил и/или клеточный трансплантат.

Индивидуумы, которым трансплантируют стволовые клетки, могут страдать от любого заболевания костного мозга, т.е. заболевания, в которых нормальная архитектура костного мозга вытесняется злокачественными новообразованиями, серповидноклеточной анемии, миелодиспластического синдрома, миелопролиферативных расстройств, апластической анемии или инфекций, приводящих к снижению производства клеток крови и тромбоцитов крови. Указанные заболевания костного мозга могут представлять собой, например, лейкемию, нарушение компартментализации клеток крови или необходимость в трансплантации костного мозга после химиотерапии или лечения облучением.

Еще более конкретно, нарушение компартментализации клеток крови может представлять собой гемоглобинопатию, такую как талассемия, нарушения функции нейтрофилов-гранулоцитов, нарушение функции нейтрофилов-гранулоцитов, нарушение в Т- и/или В-лимфоцитах, например, тяжелый комбинированный иммунодефицит, агаммаглобулинемию Брутона.

Применение для лечения индивидуумов, страдающих от заболеваний костного мозга, например, из-за химиотерапии или облучения и, следовательно, проходящих трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток путем введения одного или более ингибиторов DPP-IV в течение ограниченного периода времени после трансплантации костного мозга охватывается настоящим изобретением.

По меньшей мере, один аналог простациклина вместе с одним или более средствами, повышающими уровень cAMP, для предварительной обработки изолированных стволовых клеток, и один или более ингибиторов DPP-IV пациентам с трансплантатами, могут быть применены для повышения приживления человеческих HSC во время трансплантаций костного мозга или при восстановлении костного мозга путем применения HSC. Ускоренное приживление сокращает период, в течение которого субъекты подвержены потенциально смертельным инфекциям, кровотечениям и другим серьезным осложнениям. Поэтому, аналог простациклина в комбинации с глиптином должен быть полезным терапевтическим вариантом для предварительной обработки донорского костного мозга для усиления приживления костного мозга (т.е. за счет уменьшения числа необходимых клеток и сокращения продолжительности аплазии костного мозга).

Непрерывная обработка (лечение) субъектов в течение нескольких дней после трансплантации костного мозга ингибитором DPP-IV приводила к улучшенному клиническому результату путем улучшения приживления (т.е., за счет уменьшения числа необходимых клеток и сокращения продолжительности аплазии костного мозга).

Таким образом, в соответствии с конкретным воплощением, обработку проводят, по меньшей мере, в течение одного дня, более конкретно пяти дней после трансплантации, еще более конкретно в течение

по меньшей мере 10 дней, еще более конкретно в течение по меньшей мере 14 дней после трансплантации.

Ингибитор DPP-IV может быть введен субъекту с помощью любого применимого и известного в данной области техники режима. Еще более конкретно, обеспечивают энтеральное, внутривенное или подкожное введение.

Внутривенное введение представляет собой предпочтительный способ введения.

Однако ингибитор DPP-IV может находиться в доступной пероральной форме, выбираемой из группы форм с пролонгированным высвобождением, таблеток или капсул.

Изобретение также обеспечивает составной комплект, включающий количество по меньшей мере одного аналога простациклина и форсколин в первой стандартной лекарственной форме, и количество по меньшей мере одного ингибитора DPP-IV, выбираемого из глиптина, в форме двух, трех, четырех или более отдельных единиц компонентов а) и б), более конкретно, для применения в лечении заболевания костного мозга, более конкретно, заболевание костного мозга представляет собой лейкемию, нарушение компартиментализации клеток крови, заболевания костного мозга, индуцированные химиотерапией или облучением.

Изобретение кроме того охватывает упаковку, включающую набор в соответствии с изобретением вместе с инструкцией по применению.

Вышеприведенное описание будет более полно понято с отсылкой к следующим примерам. Такие примеры, однако, просто представляют собой репрезентативные способы осуществления на практике одного или более воплощений настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

Примеры

Пример 1. Анализ *in vitro* миграции.

Мышечные гемопоэтические клетки-предшественники предварительно обрабатывали *in vitro* комбинацией 10 мкМ трепростинила (Trep) и 30 мкМ форсколина (Fsk) ("Sigma Aldrich", Вена, Австрия) или растворителем в течение 1-го часа при 37°C в содержащей фактор роста среде для стволовых клеток [(StemSpan™ (SFEM) (Stemcell technologies, США) (50 нг/мл фактора мышечных стволовых клеток (SCF), 50 нг/мл лиганда fms-подобной тирозинкиназы-3 (Flt3), 50 нг/мл интерлейкина 11 (IL11) и 150 нг/мл мышечного интерлейкина 3 (mIL3)], приобретенного у компании "ReproTech" (Лондон, Великобритания)). После этого клетки промывали и ресуспендировали при 2×10^6 клетки/мл в среде.

Суспензию клеток (0,1 мл, содержащий 2×10^5 клеток) добавляли в верхнюю камеру вставки Transwell™ (диаметр пор - 5 мкМ). Нижнюю камеру заполняли средой или средой, содержащей 100 нг/мл мышечного стромального фактора-1 (SDF-1 = CXCL12). Клеткам позволяли мигрировать в течение 4-х ч при 37°C. В дальнейшем, число клеток, извлеченных из нижней камеры, определяли с помощью счетчика клеток. Число мигрировавших клеток выражали в процентах от общего числа клеток, добавленных в верхнюю камеру.

Клетки CD34+ пуповинной крови человека поддерживали в среде для стволовых клеток [X-VIVO™ 15 ("Lonza", Швейцария), дополненной 50 нг/мл человеческих Flt3, 50 нг/мл человеческого тромбопоэтина и 50 нг/мл человеческих (SCF), приобретенных у компании "ReproTech" (Лондон, Великобритания)]. Анализ миграции проводили, как описано для мышечных клеток, за исключением того, что рекомбинантный человеческий SDF-1 добавляли в нижнюю камеру. Приведенные данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 3 независимых экспериментов, выполненных в трех повторностях. Статистически значимые различия были оценены с помощью одностороннего анализа ANOVA, а затем с помощью множественных сравнений Даннетта (*, $p < 0,05$).

Данные приведены на фиг. 1.

Пример 2. Ингибирование CXCR4 антагонистом AMD3100 SDF-1/CXCL12-индуцированной миграции мышечных гемопоэтических клеток-предшественников, которые были стимулированы в присутствии трепростинила и форсколина.

Гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники преинкубировали с трепростинилом (10 мкМ; T) и форсколином (30 мкМ; F) в течение 1 ч при 37°C, промывали и ресуспендировали при плотности клеток, равной 2×10^6 клеток/мл. Суспензию клеток (2×10^5 клеток в 0,1 мл) добавляли в верхнюю камеру вставки Transwell™, которая содержала среду с 10 мкМ CXCR4 антагониста AMD3100 (10 мкМ) и без него. Среда в нижней камере содержала 100 нг/мл мышечных SDF-1. Инкубацию продолжали в течение 4 ч при 37°C; после этого клетки, извлеченные из нижней камеры, подсчитывали, как указано в легенде к фиг. 1. Приведенные данные представляют собой среднее $\pm$ SEM их трех независимых экспериментов, выполненных в трех повторностях. Статистически значимые различия оценивали с помощью однофакторного ANOVA, а затем с помощью множественных сравнений Даннетта (***, $p < 0,001$).

CXCR4 антагонист AMD3100 ингибирует SDF-1/CXCL12-индуцированную миграцию мышечных гемопоэтических клеток-предшественников, которые были стимулированы в присутствии трепростинила и форсколина.

Данные приведены на фиг. 2.

Пример 3. Вилдаглиптин усиливает SDF-1/CXCL12-индуцированную миграцию гемопоэтических клеток-предшественников, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином.

Мышьиные гемопоэтические клетки-предшественники (mHPC; левая панель) и человеческие CD34+ клетки, полученные из пуповинной крови (правая панель) преинкубировали в отсутствие или в присутствии трепростинила (10 мкМ; T) и форсколина (30 мкМ; F) в течение 1-го часа. После этого, суспензию клеток (2×10^5 клетки в 0,1 мл) добавляли в верхние камеры вставок Transwell™, которые содержали среду с 30 М вилдаглиптина или без него (Vil). Среда в нижней камере при необходимости содержала 100 нг/мл мышьиных или человеческих SDF-1. Инкубацию продолжали в течение 4-х часов при 37°C; после этого клетки, извлеченные из нижней камеры, подсчитывали, как указано в легенде к фиг. 1. Приведенные данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из трех независимых экспериментов, выполненных в трёх повторностях. Статистически значимые различия были оценены с помощью одностороннего анализа ANOVA, а затем с помощью множественных сравнений Даннетта (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Данные приведены на фиг. 3.

Пример 4. Анализ *in vivo* хоуминга.

Вилдаглиптин и трепростинил усиливали хоуминг гемопоэтических клеток-предшественников, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином, но были взаимно антагонистичны при комбинировании *in vivo*.

Мышьиные гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники изолировали из 6-8-недельных BALB/c мышей-доноров (15 мышей) с помощью магнитной сортировки клеток, применяя антители, специфические к линии дифференцировки, которые сохраняют клетки миелоидной, эритроидной, мегакариоцитарной и лимфоидной линии дифференцировки, и микробусин MACS ("Milteny Biotec", Бергш-Гладбах, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. *scat*+, *c-Kit*+, клетки негативной линии дифференцировки (*Lin*-) преинкубировали в отсутствие (контроль растворителем = необработанные клетки) и в присутствии комбинации трепростинила (10 мкМ) и форсколина (30 мкМ) (= обработанные клетки) в течение 1-го часа.

(Необработанные и обработанные) гемопоэтические стволовые клетки-предшественники (1×10^6 клеток) в дальнейшем вводили с помощью инъекции через хвостовую вену летально (9 Гр) облученным мышам-реципиентам BALB/c. Мыши-реципиенты не получали никакой дополнительно обработки (столбики, помеченные как необработанные клетки и обработанные клетки) или мышам вводили с помощью инъекции трепростинил (3 мкг/8 ч; столбики, помеченные как "*in vivo* trep"), вилдаглиптин (10 мг/кг/24 ч; столбики, помеченные как "*in vivo* vil") или комбинацию трепростинила и вилдаглиптина (столбики, помеченные как "*in vivo* trep+vil"), начиная за 24 ч перед трансплантацией костного мозга.

Способность клеток к хоумингу в костный мозг оценивали через 20 ч с помощью анализа колониеобразования. Бедрa и большие берцовые кости промывали PBS для сбора клеток костного мозга. Эритроциты удаляли буфером для лизиса эритроцитов ("Stemcell technologies", США). Оставшиеся клетки ресуспендировали в полужидкой среде на основе метилцеллюлозы (MethoCult, "stemcell technologies", США). Каждое условие оценивали в тройном повторе. Специфические факторы роста добавляли для поддержки формирования обеих колониеобразующих единиц, грануло-моноцитов (CFU-GM) и колониеобразующих единиц эритроцитов (CFU-E), т.е., эритропоэтин 3 Ед./мл, IL3 10 нг/мл, IL7 10 нг/мл, GM-CSF 10 нг/мл. Культуры поддерживали в течение 6-ти дней при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После этого, число колоний подсчитывали под микроскопом. По определению эти колонии возникали из тех клеток, которые вводили с помощью инъекции и которые мигрировали в костный мозг, потому что эндогенный костный мозг мышей-реципиентов был разрушен облучением. Соответственно, никаких колоний не получают, если высевали костный мозг облученных мышей, которым не вводили с помощью инъекции гемопоэтические клетки-предшественники, (отрицательный контроль).

Очевидно, что

(i) *in vitro* преинкубация с трепростинилом и форсколином усиливала хоуминг (ср. столбики, помеченные как необработанные и обработанные),

(ii) обработка мышей-реципиентов только трепростинилом и/или только вилдаглиптином не способствует хоумингу (ср. второй столбик "необработанные" со столбиками 3-5, помеченными как "+ *in vivo* trep", "+*in vivo* vil", "+*in vivo* trep+vil"),

(iii) обработка мышей-реципиентов, которым вводили с помощью инъекции обработанные клетки или с трепростинилом, или с вилдаглиптином, способствовала хоумингу (ср. шестой столбик "необработанные" со столбиками 7 и 8, помеченными как "+ *in vivo* trep", "+*in vivo* vil"), но

(iv) данная комбинация (последний правый столбик, помеченный как "+*in vivo* trep+vil") был менее эффективен, чем введенный отдельно (столбики 7 и 8, помеченные как "+ *in vivo* trep", "+ *in vivo* vil"). Таким образом, при комбинировании *in vivo*, трепростинил и вилдаглиптин ведут себя взаимно антагонистически.

Вилдаглиптин и трепростинил усиливают хоуминг гемопоэтических клеток-предшественников, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином, но ведут себя взаимно антагонистически при комбинировании *in vivo*. Данные приведены на фиг. 4.

Пример 5. Анализ *in vivo* приживления.

Комбинированное введение трепростинила и вилдаглиптина летально облученным мышам-реципиентам BALB/c, которым вводили с помощью инъекции гемопоэтические клетки-предшественники, предварительно обработанные *in vitro* комбинацией трепростинила и форсколина, были менее эффективны в повышении выживаемости этих мышей, по сравнению с *in vivo* введением по отдельности или вилдаглиптина, или трепростинила.

Гемопоэтические клетки-предшественники изолировали из костного мозга мышей-доноров (BALB/c), как указано в легенде к фиг. 4. Клетки обрабатывали *in vitro* 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином или растворителем в течение 1-го часа при 37°C. После промывания, $0,2 \times 10^6$ гемопоэтических клеток-предшественников негативной линии дифференцировкой вводили с помощью инъекции через хвостовую вену летально облученным (9 Gy) мышам-реципиентам BALB/c (10/группу). Если не было предварительной обработки *in vitro* комбинацией трепростинила и форсколина, то данное число гемопоэтических клеток-предшественников было слишком мало, чтобы спасти животных-реципиентов. Соответственно, группа мышей, получавших клетки, которые не были предварительно обработаны, умерла в течение первой недели (черная линия, CTRL). Ограниченное число гемопоэтических стволовых клеток, было достаточно для того, чтобы спасти 50% мышей, которые получали предварительно обработанные клетки, а затем были обработаны трепростинилом (3 мкг/8 ч s.c. в течение 10-ти дней; красная кривая, помеченная как *in vitro*, предварительно обработанные клетки + *in vivo* обработка мышей-реципиентов трепростинилом). Наиболее эффективный режим представлял собой инъекцию предварительно обработанных гемопоэтических клеток-предшественников с последующим введением вилдаглиптина (10 мг/24 ч s.c.): все мыши (т.е., 10 из 10) выжили (кривая, помеченная как *in vitro*, предварительно обработанные клетки + *in vivo* обработка мышей-реципиентов вилдаглиптином). Наоборот, мыши, получавшие комбинацию трепростинила (3 мкг/8 ч) и вилдаглиптина (10 мг/кг/24 ч) имели худший результат из всех мышей-реципиентов, которые получали предварительно обработанные клетки: только 2 из десяти мышей выжили (серая линия, помеченная как *in vitro*, предварительно обработанные клетки + *in vivo* обработка мышей-реципиентов комбинацией трепростинила и вилдаглиптина). Инъекции лекарственных препаратов (т.е., введение трепростинила и/или вилдаглиптина путем подкожных инъекций) начинали немедленно после трансплантации гемопоэтических клеток-предшественников и продолжали в течение 10-ти дней. Все кривые значительно отличались друг от друга (лог-ранговый критерий).

Комбинированное введение трепростинила и вилдаглиптина летально облученным мышам-реципиентам BALB/c, которым вводили с помощью инъекции гемопоэтические клетки-предшественники, предварительно обработанные *in vitro* комбинацией трепростинила и форсколина, были менее эффективны в повышении выживаемости данных мышей, по сравнению с *in vivo* введением по отдельности или вилдаглиптина, или трепростинила. Данные приведены на фиг. 5.

Пример 6.

Мы исследовали условия, при которых действие трепростинила и форсколина было дополнительно повышено. Эти условия были основаны на наблюдении того, что действие комбинации трепростинила и форсколина было опосредовано, по меньшей мере, частично за счет индукции CXCR-4-рецептора (т.е., рецептора для хемокина, стромального фактора-1 = SDF1 = CXCL12). Кроме того, мы сравнили эффект диметил-PGE2 и трепростинила на накопление cAMP человеческими HSPCs.

Материалы и способы

Выделение гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников мышей и человека.

Десять мышей (C57BL/6 или Balb/C) умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Длинные кости задних конечностей (т.е., бедренную кость и большую берцовую кость) освобождали от мышц и соединительной ткани и промывали средой RPMI, применяя шприц и 27/4 G иглу. Суспензию клеток освобождали от видимой соединительной ткани, собирали и переносили в центрифужные пробирки. Клетки собирали центрифугированием (1,200 rpm/~100 g в течение 5 мин) и ресуспендировали в 3 мл буфера для лизиса эритроцитов (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH доводят до 7,2-7,4). Суспензию клеток инкубировали в течение 2-х мин при 20°C с последующим охлаждением в течение 4-х мин на льду. После этого, RPMI (10 мл) добавляли и клетки собирали центрифугированием и подсчитывали. Типичный выход клеток был равен 3×10^7 /мышь.

Клетки ресуспендировали в ледяном PBS (фосфатный буферный солевой раствор), содержащем 2% FCS (фетальную телячью сыворотку) при плотности клеток, равной $2,5 \times 10^8$ клетки/мл, к которым добавляли коктейль биотинилированных антител ("Lineage Cell Depletion Kit" от компании "Miltenty Biotec"), содержащий специфические к линиям дифференцировки антитела, направленные против CD5, CD45R (B220), CD11b, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4 и Ter-119 в отношении 0,1 мл раствора антител на 10^8 клеток. Клетки инкубировали в течение 20 мин на льду с антителами и осаждали центрифугированием. После ресуспендирования ($3,3 \times 10^8$ клеток/мл), вторые покрытые антибиотином микробусины MicroBeads (0,2 мл/ 10^8 клеток, обеспеченные набором ("Lineage Cell Depletion Kit" от компании "Miltenty Biotec"), добавляли к суспензии клеток, и смесь инкубировали в течение 15-ти мин на льду. После этого, образец разводили в MACS-буфере (30 мл), клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 6 мл

MACS-буфера. Данную суспензию наносили на предварительно упакованные колонки LS, которые содержали ферромагнитные бусины, покрытые совместимым с клетками пластиковым материалом. Как правило, применяли три колонки (2 мл клеточной суспензии/колонка). Элюат содержал клетки, негативные по маркерам линии дифференцировки (Lin⁻ клетки), в то же время клетки с коммитированной линией дифференцировки, оставались на колонке. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 2 мл PBS. Типичный выход был равен 7×10^5 Lin⁻ клеток/мышь.

Человеческие гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPCs) собирали из пуповины здоровых доноров: образцы пуповинной крови (≈ 50 мл) собирали во время здоровых доношенных родоразрешений. CD34⁺ клетки изолировали, применяя магнитно-активированный сортировщик клеток (S) из прямого CD34 набора для выделения клеток-предшественников (Direct CD34 ProgeMACnitor Cell Isolation Kit) ("Miltenyi Biotech") и размножали, как описано (3). Кратко, пуповинную кровь разбавляли равным объемом фосфатного буферного солевого раствора (PBS); данную суспензию (25 мл) наносили на LymphoPrepTM (плотность среды получают с помощью Nyscomed, который содержит смесь триаотоата натрия и полисахаридов). Пробирки центрифугировали в бакет-ротаторе в течение 30 мин при 355 g. Слой, содержащий мононуклеарные клетки, собирали, разводили в PBS (до 50 мл) и центрифугировали при 400 g в течение 8 мин для удаления остаточного LymphoPrepTM. Эритроциты удаляли путем лизиса в буфере, содержащем 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ и 0,1 mM EDTA (pH доводили до 7,2-7,4 с помощью HCl) в течение 10 мин при 4°C. Число мононуклеарных клеток определяли и доводили до 2×10^8 клетки/мл в MACS-буфере, обеспеченном набором для выделения. Добавляли коктейль для положительной селекции EasySep[®] (0,1 мл/мл суспензии клеток), суспензию инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и добавляли магнитные наночастицы EasySep[®] (50 мкл/мл). После дополнительной инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре, суспензию клеток разводили до 2,5 мл добавлением среды. Пробирку помещали в магнит на 5 мин и затем клетки собирали. Эту стадию повторяли 5 раз. Обогащенные клетки размножали в течение 6-ти дней (т.е. два удвоения популяции) в суспензионных культурах, содержащих свободную от сыворотки среду X-VIVO15 ("BioWhittaker"), дополненную GlutaMAX (2,5 mM; "Gibco/Invitrogen") и пенициллином/стрептомицином (P/S; 125 Ед./мл каждого) и Flt3L, SCF и TPO (каждый в концентрации 50 нг/мл). Типичные выходы были равны 9×10^5 CD34⁺ клеток/образец пуповинной крови, которые были разморожены с получением $3,5 \times 10^6$ клеток. Все процедуры проводили в соответствии с руководящими принципами институционального наблюдательного совета Медицинского университета Вены для данных исследований.

Информированное согласие обеспечивали в соответствии с Декларацией Хельсинских принципов.

Проточная цитометрия.

Чистоту препаратов мышинных и человеческих гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC) оценивали с помощью проточной цитометрии. Антитела, примененные для окрашивания маркеров клеточной поверхности, были из следующих источников: панели антител мышинных линий дифференцировки были от "Becton Dickinson Biosciences" (BD 559971, содержащий в биотинилированной форме анти-CD3 ϵ , анти-CD11b, анти-CD45R, анти-Ly-6G/Ly-6c, анти-Ter-119), аффинно-очищенные крысиные анти-мышинные антитела к CD16/CD32 (мышинные Fc γ II/III блокированные, BD 553142) и флуоресцентный краситель стрептавидин-аллокоцианин-Cy7 (стрептавидин APC-Cy7, BD554063) были также от "Becton Dickinson Biosciences". Фикоэритрин (PE)-Cy7-меченые анти-мышинные антитела к Ly6A/E (=антиген-1 стволовых клеток = Seal) PE-Cy7 (номер по каталогу 25-5981-82) и PE-Cy5 анти-мышинные антитела к CD117 (c-Kit) (номер по каталогу 15-1171-81) были от "eBiosciences".

Непосредственно после MACS, 1×10^6 клеток положительных (Lin⁺) и отрицательных (Lin⁻) линий дифференцировки переносили в пробирки FACS (сортировщик клеток с активируемой флуоресценцией) и хранили на льду в 50 мкл PBS. В это время, следующие антитела, подходящие для FACS, разводили (1:50) и смешивали в PBS: очищенных анти-CD16/CD32 (для блокировки Fc-рецепторов), биотинилированные анти-CD3 ϵ , биотинилированные анти-CD11b, биотинилированные анти-CD45R, биотинилированные анти-Ly-6G/Ly-6c и биотинилированные анти-Ter-119, стрептавидин-меченые APC-Cy7, PE-Cy7-меченые анти-Sca-1, PE-Cy5-меченые анти-c-kit. Данный мастер-микс (50 мкл) добавляли к каждому образцу, которые затем перешивали с помощью мягкого встряхивания на вортексе и инкубировали при 4°C в темноте в течение 15 мин. После этого, клетки собирали центрифугированием, промывали в 2 мл PBS и ресуспендировали в PBS. Образцы анализировали в FACS Canto II ("Becton Dickinson"). Процедуру стробирования выполняли следующим образом: каналы для живых клеток устанавливали путем записи прямого и бокового разброса. Живые клетки дополнительно различали на основе экспрессии маркеров линии дифференцировки (т.е., CD11b, CD45R, Ly-6G/Ly-6c, Ter-119). Это позволило определить каналы для Lin⁻ клетки, которые были дополнительно проанализированы на экспрессию Sca-1 и c-Kit.

Проточную цитометрию также применяли для слежения за экспрессией CXCR4 и CD26/DPPIV (ди-пептидилпептидазы-IV) человеческими HSPCs. Экспрессию CXCR4 и CD26/DPPIV измеряли после обработки 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином в течение 2 ч, 4 ч и 6 ч. После инкубации, человеческие CD34⁺ клетки промывали и окрашивали антителами ("eBioscience") к CXCR4 и CD26 в соответ-

ствии с инструкциями производителя и количественно оценивали с помощью анализа FACS. Три независимых эксперимента выполняли по отдельности, и затем данные усредняли для статистического анализа. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM, и сравнения проводили с применением однофакторного анализа ANOVA.

Анализ [^3H] накопления cAMP.

Человеческие гемопоэтические CD34⁺ стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPCs, $4 \times 10^5/\text{мл}$) сначала преинкубировали в течение 16 ч в отсутствии и присутствии 100 нг/мл коклюшного токсина ("Sigma-Aldrich") в среде X-VIVO15, дополненной факторами роста с последующим метаболическим мечением аденин-нуклеотидного пула в течение дополнительного 4-часового инкубационного периода в [^3H]аденине ("Perkin Elmer", 1 мКи/мл) в среде X-VIVO15, дополненной факторами роста и 10 мкг/мл аденозиндезаминазы ("Roche"). После этого, клетки обрабатывали 1 или 10 мкМ трепростинилом, 1 или 10 мкМ диметил-PGE2 (dmPGE2), форсколином (30 мкМ) или комбинацией форсколина и простагландин в течение 30 мин. Клетки затем осаждали (5 мин при 100 g), среду отбрасывали и осадок лизировали в ледяной 2,5% перхлорной кислоте (0,9 мл), содержащей 0,1 мМ cAMP, держали на льду в течение 1-го часа и нейтрализовали 4,2 М КОН (0,1 мл). АТР и cAMP разделяли с помощью последовательной хроматографии на колонках, содержащих Dowex AG50-X8 и нейтральный оксид алюминия (3).

Жизнеспособность клеток, распределение по клеточному циклу и образование колоний.

Человеческие или мышинные HSPCs инкубировали в присутствии носителя или комбинации 10 мкМ трепростинила и 30 мкМ форсколина при 37°C в течение 1-го часа и 24-х часов. После промывания PBS при 4°C, клетки окрашивали на внешний фосфатидилсерин с помощью набора "PE Annexin-V Apoptosis Detection Kit I®" в соответствии с протоколом изготовителя или на содержание ДНК с помощью PI (50 мкг-мл⁻¹ в PBS) в течение 40 мин при 37°C. Данные, полученные с помощью проточной цитометрии, анализировали с помощью программного обеспечения FACS Diva software®. Образование колоний мышинных HSPCs определяли следующим образом: после инкубации в течение 1-го часа в присутствии 10 мкМ трепростинила и 30 мкМ форсколина, клетки ресуспендировали в среде MethoCult®, содержащей GM-CSF и IL-3 (10 нг·мл⁻¹ каждый) для образования CFU-GM и 3 Ед. ·мл⁻¹ EPO и IL-3 для CFU-E, и культивировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 7-10 дней. Число колоний подсчитывали под световым микроскопом.

Анализ миграции.

Мышинные гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPCs) негативной линии дифференцировки из костного мозга мышей-доноров BALB/c и человеческие CD34⁺ HSPCs, изолированные из пуповинной крови, стимулировали комбинацией 10 мкМ трепростинила и 30 мкМ форсколина в течение 1 часа или в среде для мышинных стволовых клеток (SFEM™; 50 нг·мл⁻¹ каждого фактора роста; SCF, Flt3, IL11 и 150 нг·мл⁻¹ IL3) или в среде для человеческих стволовых клеток (X-VIVO™ 15, 50 нг·мл⁻¹ каждого из TPO, FL3 и SCF). После промывания, суспензию клеток (2×10^6 клеток в 0,1 мл) помещали в верхнюю камеру Transwell™ (диаметр - 6,5 мм, размер пор - 3 мкм). Нижнюю камеру заполняли 300 мкл среды, содержащей факторы роста и 100 нг·мл⁻¹ SDF-1. Там, где указано, как верхняя, так и нижняя камеры были дополнены 30 нМ вилдаглиптином. Хемотаксис к SDF-1 определяли после 4 ч инкубации при 37°C. HSPCs, которые мигрировали в нижнюю камеру, подсчитывали в счетчике клеток. Анализы выполняли в тройном повторе.

Анализ хоуминга.

HSPCs негативной линии дифференцировки изолировали из целых клеток костного мозга мышей-доноров B6.SJL-PtcrAPep3B/Boyl (CD45.1⁺), применяя микробусины MACS (смотри выше). Клетки *in vitro* обрабатывали 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином или контрольным растворителем в течение 1-го часа при 37°C. После промывания, $0,2 \times 10^6$ клеток CD 45.1⁺ негативной линии дифференцировки вводили с помощью инъекции летально облученным (10 Gy) мышам-реципиентам C57BL/6 (CD45.2⁺). Мыши-реципиенты также были подкожно обработаны *in vivo* или трепростинилом (0,15 мг кг⁻¹ 8 час⁻¹), вилдаглиптином (10 мг·кг⁻¹) или комбинацией обоих лекарственных препаратов. Контрольным мышам вводили с помощью инъекции такой же объем носителя. Целые клетки костного мозга изолировали из мышей-реципиентов через 16 ч после трансплантации. После лизиса эритроцитов, клетки окрашивали на маркеры CD45.1 и CD45.2. Пропорцию клеток CD45.1⁺ и CD45.2⁺ в костном мозге определяли с помощью проточной цитометрии.

Трансплантация костного мозга.

Изогенных мышей-реципиентов (C57BL/6 или BALB/c) подвергали летальному облучению. Если их не лечили с помощью внутривенного введения гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPCs), то данные мыши умирали в течение первых двух недель. HSPCs клетки Lin⁻ (Sca1⁺ и c-Kit⁺) получали, как указано выше, и предварительно обрабатывали *ex vivo* в отсутствии и в присутствии комбинации 10 мкМ трепростинила + 30 мкМ форсколина (FSK) в течение 1 ч при 37°C. После этого, клетки ($1-5 \times 10^5/\text{мышь}$) вводили с помощью инъекции через хвостовую вену. Количество лейкоцитов определяли с помощью FACS, образцы крови собирали каждые 3-5 дней, начиная со дня 9

(где количество клеток крови было равно ~1 г/л. В некоторых случаях, мышей (25-30 г) также обрабатывали (i) трепростинилом (0,15 мг кг⁻¹ 8 ч⁻¹) и вилдаглиптином (10 мг кг⁻¹ 12 h⁻¹) или комбинацией обоих препаратов, вводимых подкожно каждые 8 ч в течение 10-ти дней.

Выделение РНК из гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников и полимеразная цепная реакция.

РНК изолировали из мышинных и человеческих гемопоэтических стволовые клеток и клеток-предшественников (3×10⁶ клеток), из смешанной (т.е. нейрональной и глиальной) культур, полученных из коры головного мозга мышей, из клеточной линии рака предстательной железы человека РС3 и клеточной линии карциномы толстой кишки человека НСТ116 (в качестве положительных контролей), применяя 2 мл Trizol® ("Invitrogen"). Гомогенизированные образцы инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов. Хлороформ (0,4 мл) добавляли к лизату клеток и пробирку энергично встряхивали вручную в течение 15 с. После инкубации в течение 3-х мин при комнатной температуре, образец центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. После центрифугирования, смесь разделяется на нижнюю красную, фенол-хлороформную фазу, интерфазу и бесцветную верхнюю водную фазу. Водную фазу (РНК) переносили в свежую пробирку, и РНК осаждали путем смешивания с 1 мл изопропиловым спиртом. После инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин, образец центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант удаляли и геле-подобный осадок РНК промывали один раз 2 мл 75% этанола. Образец перемешивали на вортексе и центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин при 4°C. Осадок РНК сушили на воздухе в течение 10 мин и растворяли в 80 мкл (высокоочищенной) воды, пропуская раствор несколько раз через наконечник пипетки, и инкубирование в течение 10 мин при 55°C (хранили при -20°C).

РНК (1 мкг) подвергали обратной транскрипции до к ДНК с помощью набора "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" ("Fermentas") в присутствии 1 мкл олиго (dT)18 праймера, 4 мкл 5x реакционного буфера, 1 мкл ингибитора РНКазы "RiboLock™" (20 Ед./мкл), 2 мкл 10 mM dNTP Mix, 1 мкл обратной транскриптазы RevertAid™ H Minus M-MuLV (200 Ед./мкл) и очищенной воды до общего объема, равного 12 мкл, в течение 60 мин при 42°C с последующей инкубацией в течение 5 мин при 70°C.

Амплификацию фрагментов рецепторов человеческих простагландин и CXCR4 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполняли с 1 мкл кДНК, 1 мкл 10 mM dNTPs, 1 мкл прямого праймера [10 мкМ], 1 мкл обратного праймера [10 мкМ], 4 мкл буфера GoTaq® Buffer [5x], 0,2 мкл полимеразы GoTaq® и очищенной воды до конечного объема, равного 20 мкл (11,8 мкл). Смесь сначала инкубировали при 95°C в течение 5 мин с последующими 40 циклами (45 с денатурации при 95°C, 30 с отжига при 57°C, 45 с удлинения при 72°C) и конечным удлинением в течение 5 мин при 72°C. ПЦР-продукты разделяли на 2%-ных агарозных гелях.

Таблица 1. Примененные праймеры (прямые и обратные)

hEP1 f	GAGAGCCAGGGCGCAGT (SEQ ID NO 1)	mEP4 f	TCTCTGGTGGTGCTCATCTG (SEQ ID NO 15)
hEP1 r	GCAAGGGCTCATGTCAGG (SEQ ID NO 2)	mEP4 r	TGCAATCTGGGTTTCTGCT (SEQ ID NO 16)
mEP1 f	AGCAGGAGCCAAGTTCCAG (SEQ ID NO 3)	hCXCR4 f	AGGAAGCTGTTGGCTGAAAA (SEQ ID NO 17)
mEP1 r	CATCCGCTAGGCTCAGGTTA (SEQ ID NO 4)	hCXCR4 r	CTCACTGACGTTGGCAAAGA (SEQ ID NO 18)
hEP2 f	CCACCTCATTCTCCTGGCTA (SEQ ID NO 5)	mCXCR4 f	AGGTGCAGGTAGCAGTGACC (SEQ ID NO 19)
hEP2 r	TTTCCTTTTCGGGAAGAGGTT (SEQ ID NO 6)	mCXCR4 r	ACTCACACTGATCGGTTCCA (SEQ ID NO 20)
mEP2 f	TTATGACCATCACCTTCGCC (SEQ ID NO 7)	mPI f	GGGCACGAGAGGATGAAGT (SEQ ID NO 21)
mEP2 r	TAAAAACCGAAGAGCTCGG A (SEQ ID NO 8)	mPI r	GATGGCCTGAGTGAAGCCT (SEQ ID NO 22)
hEP3 f	AGCGACCATTGGAAGAT G (SEQ ID NO 9)	hPI f	GTGTGCTCCCTGCCTCTC (SEQ ID NO 23)
hEP3 r	TGATGTGATCCTGGCAGAA A (SEQ ID NO 10)	hPI r	GGGTTGAAGGCGTAGAAG (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	CTCAGACTACAGGCACGGGT (SEQ ID NO 26)
hEP4 f	TTACTCATTGCCACCTCCCT (SEQ ID NO 13)	h PGRD f	CGGAGGTCTTCTGCTTCTTC (SEQ ID NO 27)
hEP4 r	CGCTCCAACTTGGCTGATA (SEQ ID NO 14)	h PGRD r	CACATATGTGTTCTCTGCCCG (SEQ ID NO 28)

Результаты

Трепростинил- и dmPGE2-индуцированное накопление циклического AMP человеческими гемоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками.

После метаболического мечения $[^3\text{H}]$ аденином, человеческие HSPCs стимулировали трепростинилом (Треп, 10 мкМ), dmPGE2 (10 мкМ) или форсколином (Fsk, 30 мкМ), комбинацией трепростинила (10 мкМ) или dmPGE2 (10 мкМ) с форсколином (30 мкМ) как указано в разделе Материалы и способы. Где указано, HSPCs были предварительно обработаны коклюшным токсином (PTX) в течение 16-ти ч перед стимуляцией. Данные представляют собой три независимых эксперимента, выполненные в трёх повторностях, планки погрешностей указывают s.e.m. В присутствии 30 мкМ форсколина, 10 мкМ трепростинил был более эффективен, чем 10 мкМ dmPGE2 ($P = 0,03$; критерий Уилкоксона). Эта разница отменялась путем предварительной обработки коклюшным токсином (ns, незначимый). Данные приведены на фиг. 7.

Пул адениновых нуклеотидов в человеческих CD34+ гемопоэтических стволовых клетках и клетках-предшественниках (HSPCs) был метаболически помечен $[^3\text{H}]$ аденином, и их ответ на трепростинил и на диметил-PGE2 (dmPGE2) исследовали в присутствии и в отсутствии 30 мкМ форсколина. Как видно из фиг. 7, трепростинил был значительно более эффективным, чем dmPGE2, независимо от того, стимулировали ли клетки в отсутствии или в присутствии форсколина. Этот diterпен связывается в расщеплении псевдосубстрата между каталитическими доменами C1 и C2 аденилилциклазы и делает различные изоформы фермента более чувствительными к стимулирующему G-белку $G\alpha_s$ (5-7). Сниженную эффективность dmPGE2 можно рационализировать, принимая во внимание то, что dmPGE2 также представляет собой полного агониста на G_i -сопряженном рецепторе EP3 (8,9) и, следовательно, вызывает как G_s -зависимую стимуляцию аденилилциклазы через рецепторы EP2 и EP4, так и сопутствующее ингибирование через G_i -сопряженные EP3-рецепторы. Коклюшный токсин отменяет взаимодействие G_i -сопряженных рецепторов с G_i (и родственными G-белками, такими как G_o и G_i) путем ADP-рибозилирования остатка цистеина четырех аминокислот, удаленных с C-конца $G\alpha_i$ -субъединицы. Соответственно, HSPCs преинкубировали в течение 16 ч в присутствии коклюшного токсина. Данная предварительная обработка усиливала ответ на dmPGE2 (сравни 6^{ой} и 9^{ый} столбик на фиг. 7), так что не было существенной разницы между ответом cAMP, вызванным трепростинилом + форсколином, и ответом cAMP, вызванным dmPGE2 + форсколин (сравни 8^{ой} и 9^{ый} столбик на фиг. 7). Это подтверждает, что существует основное различие в действии dmPGE2 и трепростинила на человеческих HSPCs: dmPGE2 привлекает G_i -сопряженный рецептор, а трепростинил - нет.

Предварительная обработка HSPCs трепростинилом и форсколином не меняет жизнеспособность клеток, прогрессию клеточного цикла или способность клеток к дифференциации.

Постоянное повышение cAMP может вызвать апоптоз в гемопоэтических клетках (10). Повышенное приживание dmPGE2-обработанных HSC связано с воздействием на выживаемость, пролиферацию и хоуминг клеток (11). Трепростинил и dmPGE2 отличаются по своей способности привлекать к участию G-белки: dmPE2-индуцированной рекрутинг G_i может иметь особое значение, поскольку передача сигналов через G_i может привести к активации липидкиназы PI3-киназы и расположенной далее по пути передачи сигнала киназы АКТ, которая стимулирует пролиферацию и выживаемость клеток (12,13). Таким образом, мы исследовали, обеспечивает ли *in vitro* обработка человеческих HSPCs комбинацией 30 мкМ форсколина и 10 мкМ

Предварительная обработка мышиных и человеческих HSPCs трепростинилом и форсколином не индуцирует апоптоз и не изменяет прогрессию клеточного цикла или способность к дифференциации. Человеческие HSPCs инкубировали с 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином в течение 1-го часа. В дальнейшем, (A, B) индукцию апоптоза и (C, D) прогрессию клеточного цикла оценивали с помощью проточного цитометрического анализа. Приведены типичные оригинальные изображения (A, C, левая панель), и данные, полученные в трех независимых экспериментах, были суммированы (B, D, правая панель). Никакой разницы в апоптотических клетках или в распределении клеток в соответствии с фазами G0/1, S и G2 не было обнаружено между необработанными и обработанными клетками (однофакторный ANOVA). (E, F). Мышиные HSPCs изолировали из костного мозга, предварительно обрабатывали и ресуспендировали в метилцеллюлозной среде, содержащей факторы роста, необходимые для поддержания дифференциации и роста колониеобразующих единиц грануло-моноцитарной (CFU-GM) и эритроцитарной линии дифференцировки (BFU-E). После 10 дней число колоний подсчитывали под световым микроскопом и наблюдали за формой и морфологией колоний. Показаны репрезентативные микрофотографии и количественная оценка по трем независимым экспериментам. Данные представляют собой $\pm$ SEM ($n = 3$) (данные приведены на фиг. 8).

Трепростинил делает клетки более восприимчивыми к апоптозу (фиг. 8, A и B) или препятствует их вступлению в клеточный цикл и прогрессированию через клеточный цикл (фигура 8, C и D) или изменяет способность мышиных HSPCs давать начало специфическим линиям дифференцировки (фиг. 8, E и F). Как проиллюстрировано исходными гистограммами (фиг. 8A) и суммировано на фиг. 8B, наличие жизнеспособных, ранних апоптотических и мертвых клеток было сопоставимо, и число аннексии-V-

положительных клеток не увеличивалось при *in vitro* обработке 30 мкМ форсколином и 10 мкМ трепростинилом. Аналогично, распределение в клеточном цикле асинхронного растущих необработанных человеческих HSPCs и HSPCs, поддерживаемых в присутствии трепростинила и форсколина, было сопоставимо, независимо от того, экспонировали HSPCs в течение 1-го часа или 24 ч (сравни фиг. 8C для типичных оригинальных гистограмм и фиг. 8D для усредненных данных). Важно отметить, что нам также не удалось обнаружить какого-либо эффекта трепростинила и форсколина на формирование миелоидных и эритроидных колоний: мышинные HSPCs изолировали из костного мозга, инкубировали в течение 1-го часа в присутствии трепростинила и форсколина и ресуспендировали в метилцеллюлозе, содержащей среду с факторами роста, необходимыми для поддержания дифференциации и роста колониеобразующих единиц CFU-GM и BFU-E. После 10 дней, морфология (фиг. 8E) и число колоний были сопоставимы (фиг. 8F).

Трепростинил стимулирует миграцию человеческих и мышинных HSPCs в направлении к SDF-1/CXCL-12.

Как уже упоминалось выше, повышенное приживание dmPGE2-обработанных HSC было связано с воздействием на выживаемость, пролиферацию и хоуминг клеток (10). В наших экспериментальных условиях, *in vitro* обработка мышинных и человеческих HSPCs трепростинилом и форсколином повышала восстановление костного мозга (смотри ниже и фиг. 13), но не изменяла жизнеспособность клеток или прогрессию клеточного цикла *in vitro* (сравни с фиг. 8).

SDF-1/CXCR4 ось играет важную роль в хоуминге HSCPs в нишу костного мозга. Таким образом, мы предположили, что полезное действие трепростинила возникает в результате повышенного приживания HSPCs через SDF-1/CXCR4-опосредованные эффекты.

Следующие данные приведены на фиг. 9: *In vitro* предварительная обработка трепростинилом и форсколином усиливает экспрессию CXCR4 (A & B) и CD26/DPPIV (B). (A) РНК изолировали из человеческих HSPCs, которые инкубировали в отсутствие (необработанные) или в присутствии комбинации 10 мкМ трепростинила и 30 мкМ форсколина (Треп + Fsk) в течение 1-го часа. РНК, полученная из клеточной линии человеческих PC3, служила в качестве положительного контроля. После обратной транскрипции, осуществляли PCR-зависимую амплификацию, применяя праймеры, приведенные в табл.1. Ампликоны для CXCR4 электрофоретически разделяли на агарозном геле и визуализировали окрашиванием этидиумбромидом. мРНК, кодирующую Р-актин, амплифицировали в качестве внутреннего контроля. Данные представляют собой типичные данные двух дополнительных экспериментов с аналогичными результатами. (B, C) человеческие CD34+ клетки (B) и mHSPCs инкубировали или с 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином, или с контрольными носителями (необработанными) в течение 2 ч, 4 ч и 6 ч. В дальнейшем, образцы анализировали на наличие экспрессии CXCR4 (B) и CD26 (Fic) с помощью FACS. Приведенные данные представляют собой процент положительных клеток в ≥ 3 независимых экспериментах (среднее $\pm$ SEM; *P < 0,05 против необработанного контроля, ANOVA).

Это предположение исследовали следующим образом: (i) предварительная стимуляция человеческих HSPCs трепростинилом и форсколином повышала уровни мРНК CXCR4 (фиг. 9A). Это также переводилось в повышенную экспрессию белка CXCR4 (фиг. 9B). Интересно, что это также сопровождалось повышением активности CD26/DPPIV (дипептидилпептидазы-IV), фермента, который разрушает лиганд CXCR4SDF-1/CXCL12 (показано для мышинных HSPCs на фиг. 9C). (ii) Активация CXCR4 приводит к повышенной миграции человеческих (фиг. 10A) и мышинных HSPCs в направлении к SDF-1 (фиг. 10B), соответственно. (iii) Эта направленная миграция была специфической, потому что она блокировалась селективным CXCR4-антагонистом плериксафор/AMD3100 (фиг. 10C). Аналогично, базальная миграция (т.е., случайная миграция в отсутствие SDF-1) не повышалась путем предварительной обработки HSPCs трепростинилом и форсколином (сравни первый и третий столбик на фиг. 10 A и B).

Фиг. 10 показывает следующие данные: *In vitro* предварительная обработка трепростинилом и форсколином усиливает действие SDF-1 через CXCR4. Свежеизолированные мышинные и человеческие HPSCs предварительно обработанные *in vitro* или носителем (пустые столбики), или 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином (Треп+Fsk, окрашенные столбики) в течение 1 ч при 37°C с последующими стадиями промывки. Суспензию (2×10^5 клеток в 0,1 мл среды, содержащей факторы роста) человеческих (A) или мышинных HSPCs (B, C) добавляли в верхнюю камеру Transwell™ и позволяли мигрировать в направлении к SDF-1 (100 нг/мл в нижней камере) в течение 4 ч. Клетки, которые мигрировали через 5-мкм фильтр, подсчитывали. HSPCs также инкубировали в отсутствие и в присутствии 10 мкМ AMD3100 (C). Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM их трех независимых экспериментов, выполненных в трёх повторностях. Статистическое сравнение осуществляли с помощью ANOVA, с последующим сравнением с помощью множественных сравнений Тьюки. (*, P < 0,05; **, P < 0,01; ***P < 0,001).

Блокировка CXCR4 ослабляет положительный эффект трепростинила на трансплантацию костного мозга

Антагонизм AMD3100 воспроизводили *in vivo*: костный мозг летально облученных мышей-реципиентов восстанавливали с помощью предварительно обработанных трепростинилом и форсколином мышинных HSPCs, и мышам в дальнейшем вводили подкожно оптимальную дозу трепростинила в

течение 10-ти дней. Сопутствующее введение AMD3100 ($3,3 \text{ мг кг}^{-1} 8 \text{ ч}^{-1}$) притупляло полезное действие трепростинила, так что все мыши-реципиенты, в конце концов, умирали от недостаточности костного мозга (фиг. 11). Таким образом, вместе взятые, наблюдения указывают на механическую связь между трепростинил-индуцированным накоплением cAMP, повышенной экспрессией CXCR4 и усиленной передачей сигналов CXCR4 в трепростинил-обработанных HSPCs. Кроме того, они также документируют тот факт, что действие трепростинила зависит от CXCR4: если передача сигналов с помощью CXCR4 блокирована, то костный мозг не приживается, и все животные умирают.

Ингибирование CD26/DPPIV вилдаглиптином усиливает хоуминг и восстановление костного мозга под действием HPSCs только при последовательном, но не при сопутствующем введении трепростинила.

Известно, что некоторые хемокины разрушаются под действием CD26/DPPIV (дипептидилпептидазы-IV). Это также справедливо для SDF-1/CXCL12. Учитывая данные о том, что действие трепростинила опосредуется, по меньшей мере частично, индукцией CXCR4 и зависит от CXCR4. Соответственно, усиленное действие SDF-1/CXCL12, как ожидается, будет полезным. В этом контексте стоит учесть, что обработка трепростинилом и форсколином также индуцировала экспрессию CD26, который существенным образом не обнаруживается в нестимулированных HSPCs, но был обнаружен в более чем 10% HSPCs, стимулированных трепростинилом и форсколином (фиг. 9C). Некоторые ингибиторы DPP-IV доступны, их фармакология у человека хорошо понята, их вводили миллионам пациентов на протяжении многих лет при лечении диабета типа II. Фактически подавляющее большинство пациентов переносит ингибиторы DPP-IV без опасных побочных эффектов.

Учитывая, что ингибиторы DPP-IV могут представлять собой подходящего партнера в комбинации с трепростинилом, мы исследовали, усиливает ли ингибитор DPP-IV вилдаглиптин действие трепростинила. Это впервые было испытано в подходе, в котором измеряли способность введенных путем инъекции HSPCs к хоумингу в костном мозге: HSPCs, полученные из костного мозга мышей-доноров CD 45.1⁺, вводили с помощью инъекции изогенным CD45.2 реципиентам. Животных умерщвляли через 16 ч и количество CD45.1+ клеток, извлеченных из их костного мозга, определяли количественно с помощью FACS.

Данные эксперименты показали, что (i) только предварительная обработка HSPCs комбинацией трепростинил+форсколин *in vitro* не достаточна для получения статистически значимого повышения хоуминга (сравни третий столбик и первый столбик на фиг. 12).

Фиг. 12 показывает, что *in vivo* обработка мышей-реципиентов вилдаглиптином и трепростинилом по отдельности, но не их комбинацией, усиливает хоуминг HSPCs, которые были преинкубированы с трепростинилом и форсколином. Мышиные HSPCs, изолированные из костного мозга CD 45.1+ мышей-доноров, предварительно обрабатывали или носителем ("необработанные клетки"), или трепростинилом и форсколином ("обработанные клетки") и трансплантировали (2×10^5 клетки на мышь) летально облученным мышам-реципиентам C57B1/6 (CD45.2+) путем инъекции в хвостовую вену. Затем мышей-реципиентов разделяли на 7 групп. Мыши в группах 1 и 2 имели только необработанные контрольные клетки, кроме того мышей в группе 2 обрабатывали *in vivo* вилдаглиптином (Vil, $10 \text{ мг кг}^{-1}/\text{день}$). Мыши, выделенные в группу 3, получали только *in vitro* обработанные клетки, мышей в группе 4, кроме того, подвергали *in vivo* обработке трепростинилом (Trep, $0,15 \text{ мг кг}^{-1} 8 \text{ ч}^{-1}$). Мышам, отнесенным к группе 5, вводили комбинированную *in vivo* обработку трепростинилом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} 8 \text{ ч}^{-1}$) и AMD3100 ($3,3 \text{ мг кг}^{-1} 8 \text{ ч}^{-1}$). Мыши в группе 5 получали *in vivo* как трепростинил ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} 8 \text{ ч}^{-1}$), так и вилдаглиптин ($10 \text{ мг кг}^{-1}/\text{день}$), и, наконец, мыши в группе 6 получали *in vivo* вилдаглиптин. Способность CD45.1+ клеток к хоумингу в костный мозг оценивали через 16 ч, анализируя костный мозг реципиентов с помощью FACS. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (n=3). Статистические сравнения проводили с помощью теста ANOVA с последующим многократным сравнением Тьюки. Комбинация *in vitro* предварительная обработка + *in vivo* вилдаглиптин (последний столбик, "+ *in vivo* (Vil)") статистически значимо отличалась от всех других обработок (**, $p < 0,01$). 4-ый столбик ("+ *in vivo* Trep") отличался статистически значимым образом от первых трех столбиков, 5-ого ("+ *in vivo* (Trep+AMD 3100)") и 6-ого столбика ("+ *in vivo* (Trep+Vil)") (*, $p < 0,05$).

Предыдущие наблюдения показали, что *in vitro* предварительная обработка с помощью dmPE2 повышала хоуминг HSPCs (11). Таким образом, данные результаты снова подчеркивают разницу между преинкубацией HSPCs в dmPGE2 (11) и в комбинации трепростинил и форсколин.

(ii) Предварительная обработка HSPCs комбинацией трепростинил+форсколин *in vitro* усиливала их хоуминг в костный мозг мышей-реципиентов, при условии, что данные мыши-реципиенты также были обработаны трепростинилом *in vivo* (сравни четвертый столбик и третий столбик, фиг. 12).

(iii) Повышенный хоуминг, возникший в результате последовательной *in vitro* предварительной обработки (трепростинил+форсколин) с последующим *in vivo* введением трепростинила был отменен, если мышам-реципиентам вводили CXCR4 антагонист AMD3100/плериксафор (сравни четвертый столбик и пятый столбик, фиг. 12). Это наблюдение согласуется с выводами, изложенными выше и на фиг. 9, 10 и 11, на которых показано, что действие трепростинила зависело от индукции CXCR4.

(iv) *in vivo* введение одного вилдаглиптина мышам-реципиентам, которые получали необработан-

ные HSPCs, не повышает хоуминга (сравни второй столбик и первый столбик, фиг. 12).

(v) *In vivo* введение вилдаглиптина мышам-реципиентам, которые получали предварительно обработанные трепростинилом+форсколином HSPCs, и которым в дальнейшем вводили трепростинил *in vivo*, отменяло эффект трепростинила на хоуминг (сравни четвертый столбик и шестой столбик, фиг. 12).

(vi) Наиболее выраженное усиление хоуминга наблюдали, если HSPCs предварительно обрабатывали *in vitro* комбинацией трепростинила и форсколина и мышам-реципиентам вводили вилдаглиптин; хоуминг после данного режима превышал все остальные, включая инъекцию предварительно обработанных трепростинилом+форсколином HSPCs с последующим введением трепростинила *in vivo* (сравни седьмой столбик и четвертый столбик, фиг. 12) или с последующим введением трепростинила и вилдаглиптина *in vivo* (сравни седьмой столбик и шестой столбик, фиг. 12).

Ингибирование CD26/DPPIV вилдаглиптином усиливает восстановление костного мозга под действием трепростинил+форсколин HPSCs только при последовательном введении.

Летально облученных BALB/c мышей лечили путем введения внутривенной инъекции 2×10^5 Lin⁺, c-Kit⁺, Scal⁺ HSPCs. В этих условиях, число HSPCs ограничивали так, что все животные, которым вводили с помощью инъекции необработанные HSPCs, умерли (сплошная линия на фиг. 13). Наоборот, 60% животных выживали, если HSPCs были предварительно обработаны комбинацией трепростинила и форсколина *in vitro* и животным-реципиентам вводили трепростинил в течение 10-ти дней (треугольники/точечные пунктирные линии на фиг. 13). Выживаемость мышей-реципиентов была увеличена до 100%, если HSPCs предварительно обрабатывали комбинацией трепростинила и форсколина *in vitro* и животным-реципиентам вводили вилдаглиптин в течение 10-ти дней (кружки/пунктирные линии на фиг. 13). Однако, комбинированное введение трепростинила и вилдаглиптина приводило к выраженному взаимному антагонизму: подавляющее большинство реципиентов умирало, если им вводили с помощью инъекции HSPCs, предварительно обработанные комбинацией трепростинила и форсколина *in vitro*, и затем вводили трепростинил и вилдаглиптин (квадраты/точечные пунктирные линии на фиг. 13). Эти наблюдения согласуются с результатами анализа хоуминга, суммированными на фиг. 13; другими словами, два независимых подхода задокументировали взаимный антагонизм трепростинила и вилдаглиптина при введении одновременно *in vivo*, но синергизм при применении в правильной временной последовательности, т.е. *in vitro* предварительная обработка HSPCs трепростинилом + форсколином с последующим *in vivo* введением вилдаглиптина мышам-реципиентам.

Блокада CXCR4 с помощью антагонистов AMD3100/плериксафора ослабляет благоприятные эффекты вилдаглиптина на выживаемость мышей-реципиентов, но AMD3100/плериксафор как таковые также усиливают выживаемость.

Рабочая гипотеза, лежащая в основе этого проекта, утверждает, что введение вилдаглиптина мышам-реципиентам, получавшим HSPCs, предварительно обработанные комбинацией форсколина+трепростинила, из-за разрушения SDF-1/CXCL12, ингибируется и, таким образом, передача сигналов через активированный CXCR4 повышается. Если это имеет место, то действие вилдаглиптина должно быть ослаблено одновременным введением AMD3100/плериксафора. Эксперимент выполняли с семью группами мышей-реципиентов BALB/c (5/группа). Несколько таких групп служили внутренними контролями, которые были включены для проверки того, что предыдущие результаты воспроизводятся. Все мыши получали HSPCs, которые были предварительно обработаны комбинацией трепростинила и форсколина *in vitro* перед их инъекцией через хвостовую вену. Число HSPCs было ограниченным (2×10^5 /мышь в BALB/c), так чтобы единственной инъекции предварительно обработанных HSPCs не было достаточно для спасения реципиентов. У мышей-реципиентов, которым вводили инъекции вилдаглиптина, дела обстояли лучше; их выживаемость была выше, чем в группе, которой вводили трепростинил (данные с фиг. 11, смотри ниже). Кроме того, животным, которым вводили комбинацию трепростинила и вилдаглиптина, становилось хуже; таким образом, эти наблюдения воспроизводят результаты, показанные на фиг. 13. Выживаемость реципиентов, которые получали комбинацию вилдаглиптина и AMD3100/плериксафор, была ниже, чем у животных, обработанных только вилдаглиптином. Таким образом, действие вилдаглиптина может, по меньшей мере, частично, может быть объяснено усилением передачи сигналов SDF-1/CXCL12 через CXCR4. Следует подчеркнуть, что все условия тестирования были параллельными, следовательно, сравнение правомерно.

Заключение

Основные результаты можно резюмировать следующим образом.

(i) Трепростинил отличается от dmPGE2, поскольку трепростинил активирует G_s-сопряженные простаноидные рецепторы в (мышинных и человеческих) HSPCs, dmPGE2 также активирует G_i-сопряженные EP3 рецепторы, которые также присутствуют на HSPCs. Соответственно, *in vitro* обработка одним трепростинилом (в комбинации с форсколином) не усиливает ни пролиферацию и выживаемость HSPCs *in vitro* (фиг. 8), ни их хоуминг в костный мозг *in vivo* (фиг. 11). Это противоречит опубликованным данным для dmPGE2 (11). Хоуминг повышается только в том случае, если животных-реципиентов непрерывно обрабатывают трепростинилом *in vivo* (фиг. 12).

(ii) Действие трепростинила, по меньшей мере, частично, зависит от индукции CXCR4 (фиг. 9) и

приводит к усиленной передаче сигналов SDF-1/CXCL12 через CXCR4. Это было зафиксировано *in vitro*, путем демонстрации повышенной миграции (хемотаксиса) HSPCs, предварительно обработанных трепростинилом + форсколин, в направлении к SDF1 (фиг. 10A,B), путем блокировки этого эффекта с помощью антагонист CXCR4 AMD3100/плериксафора (фиг. 10C), и *in vivo* демонстрацией ингибирования AMD3100/ плериксафора для трепростинил-индуцированного повышенного хоуминга (фиг. 12) и приживления костного мозга/выживаемости мышей-реципиентов (фиг. 11).

(iii) Ингибирование CD26/DPP-IV само по себе не влияет на хоуминг HSPCs в костный мозг, но синергируется трепростинилом, при условии, что HSOPCs сначала подвергают воздействию трепростинила и форсколина *in vitro*, и затем вилдаглиптина *in vivo* (фиг. 12). Если эти два соединения вводят одновременно *in vivo*, имеет место взаимный антагонизм. Этот синергизм и взаимный антагонизм был воспроизведен в независимых экспериментах, в которых тестировали приживление HSPCs, а не их хоуминг, т.е. способность HSPCs восстанавливать костный мозг в летально облученных мышцах-реципиентах и, таким образом, чтобы поддерживать их выживаемость (фиг. 13).

Фиг. 13 показывает, что *in vivo* введение одного ингибитора DPP-IV вилдаглиптина усиливает положительный эффект *in vitro* обработки HSPCs трепростинилом и форсколином на коэффициент выживаемости у мышей-реципиентов. Мышьиные HSPCs, изолированных из мышей-доноров BALB/c, обрабатывали *in vitro* 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином или носителем (сплошная линия) в течение 1 ч при 37°C. После промывания, 2×10^5 клеток вводили с помощью инъекции летально облученным (10 Gy) мышам-реципиентам BALB/c. Группа мышей, получавшая обработанные носителем HSPCs, не получала какой-либо дополнительной обработки *in vivo* и служила в качестве контроля на облучение (сплошная линия, $n=19$): все они умерли из-за недостаточности костного мозга. Другая группа мышей (точечные пунктирные линии/треугольники; $n=20$) получала HSPCs, предварительно обработанные 10 мкМ трепростинилом и 30 мкМ форсколином, а также они были обработаны *in vivo* трепростинилом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 ч}^{-1}$). Следующая группа мышей (точечные пунктирные линии/квадраты; $n=20$) снова получала *in vitro* HSPCs, предварительно обработанные форсколином + трепростинилом, и была дополнительно обработана *in vivo* трепростинилом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 ч}^{-1}$), и вилдаглиптином (10 мг/кг/24 ч). Наконец, группа мышей (пунктирные линии/кружки; $n=20$) получала *in vitro* HSPCs, предварительно обработанные форсколином + трепростинилом и была обработана *in vivo* вилдаглиптином (10 мг кг⁻¹ в день). *In vivo* обработку осуществляли путем подкожных инъекций, их инициировали непосредственно после трансплантации и продолжали в течение 10-ти дней. Кривые выживаемости сравнивали с помощью лог-рангового критерия; разница между тремя условиями обработки была статистически значимой ($p < 0,01$).

Это неожиданное открытие трудно понять, но оно подчеркивает важность последовательности сигналов: трепростинил-обеспеченный Gs-зависимым сигнал должен предшествовать G_i/G_q -зависимому сигналу, генерируемому SDF-1/CXCL12 через CXCR4.

(iv) *In vivo* AMD3100/плериксафор противодействуют положительному эффекту как введения трепростинила, так и вилдаглиптина. Этот антагонизм должен быть предсказан, потому что трепростинил индуцирует CXCR4 и вилдаглиптин блокирует фермент, который разрушает SDF-1/CXCL12. Таким образом, обе манипуляции приводят к усиленной передаче сигналов через CXCR4, который блокируется AMD3100/плериксафором. Это наблюдение подчеркивает важность обеспечения правильных сигналов для трансплантированных HSPCs в последовательном порядке (смотри выше point (iii)). Кроме того, мы отмечали ранее, что *in vivo* кривая доза-ответ для трепростинила была колоколообразной, т.е. более высокие дозы были менее полезны в содействии приживлению костного мозга, чем стандартная доза, примененная в настоящих экспериментах. Это может быть связано с наличием рецепторов EP4 на клетках, выстилающих внутрикостную нишу, стимулирование которых может противодействовать действиям простагландин на приживление HSPCs (15). Аналогично, можно предположить, что SDF1/CXCL12 также оказывает комплексное воздействие на внутрикостную нишу, которое может как способствовать, так и препятствовать восстановлению костного мозга в зависимости от контекста передачи сигналов.

На основании этих данных, можно сделать вывод, что

(i) *in vitro* предварительная обработка HSPCs комбинацией трепростинила и форсколина может быть скомбинирована с *in vivo* введением или трепростинила, или вилдаглиптина для усиления восстановления костного мозга;

(ii) одновременное применение комбинации обоих соединений (т.е. трепростинила и вилдаглиптина) приводит к взаимному антагонизму и, таким образом, имеет меньшее значение. Однако можно предположить, что последовательный режим, при котором вилдаглиптин и трепростинил вводят в чередующейся схеме, может быть полезен.

Ссылки

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, Treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostinil 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 α 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 Gs α .GTP γ 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.
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.
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 and Zamboni AC (2012) Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* 204:277-287.
11. Hoggatt J, Singh P, Sampath J and 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.
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.
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 and Pelus LM (2013) Differential stem- and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E₂. *Nature* 495:365-369.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, включающей ингибитор дипептидилпептидазы IV (DPP-IV) видаглиптин в лечении реципиентов, которым были трансплантированы гемопоэтические стволовые клетки, обработанные *in vitro* перед трансплантацией аналогом простациклина, выбранным из группы трепростинила, илопроста, цикапроста и берапроста или их фармацевтически приемлемых солей и средством, повышающим уровень сАМР, форсколином для усиления приживления, через по меньшей мере 1 день после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

2. Применение композиции по п.1, при котором указанный аналог простациклина представляет собой трепростинил, предпочтительно производное трепростинила, выбранное из группы кислых производных трепростинила, пролекарств трепростинила, полиморфных модификаций трепростинила или изомеров трепростинила.

3. Применение композиции по п.1 или 2, в котором перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, предшествующей применению указанной композиции, реципиентам вводят видаглиптин по меньшей мере за 5, более конкретно по меньшей мере за 10, более конкретно по меньшей мере за 15, более конкретно по меньшей мере за 24 ч.

4. Применение композиции по любому из пп.1-3 через по меньшей мере 2, более конкретно по меньшей мере 3, более конкретно по меньшей мере 4 дня после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

5. Применение композиции по любому из пп.1-4, в котором реципиенты, которым трансплантированы гемопоэтические клетки, страдают от заболевания костного мозга, и указанное применение композиции предназначено для использования при лечении индивидуумов, страдающих от заболевания костного мозга.

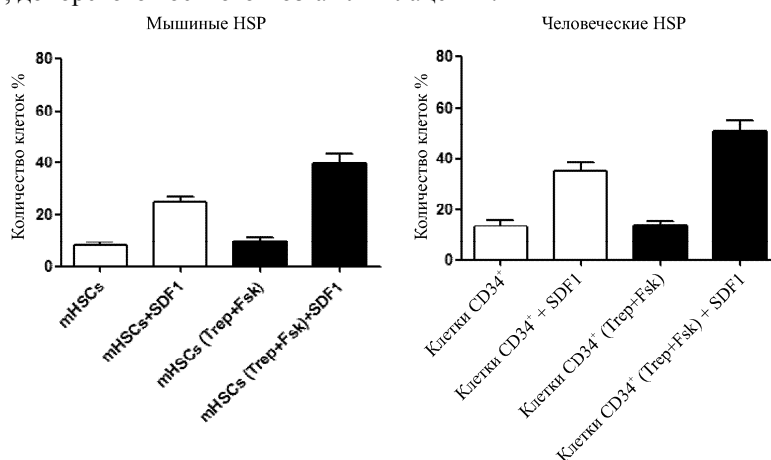
6. Применение композиции по любому из пп.1-5, при котором заболевание костного мозга представляет собой лейкемию, нарушение компартментализации клеток крови, заболевание костного мозга, индуцированное химиотерапией или облучением.

7. Применение композиции по п.6, при котором указанное нарушение компартментализации клеток крови представляет собой гемоглобинопатию, нарушение функции нейтрофильных гранулоцитов или нарушение в Т- и/или В-лимфоцитах.

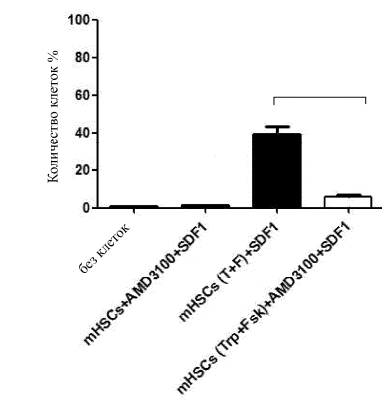
8. Способ повышения способности гемопоэтических клеток к приживлению, включающий следующие последовательные стадии:

- обеспечение образца гемопоэтических стволовых клеток или клеток-предшественников,
- введение эффективного количества аналога простациклина, выбранного из группы трепростинила, илопроста, цикапроста и берапроста или их фармацевтически приемлемых солей и средства, повышающего уровень сАМР, форсколина в указанные клетки,
- инкубирование указанной смеси в течение периода времени, достаточного для стимулирования G альфа_s-зависимого сигнального пути в указанных клетках,
- выделение указанных клеток,
- трансплантация указанных клеток нуждающемуся в этом индивидууму,
- введение указанному индивидууму эффективного количества ингибитора DPP-IV видаглиптина.

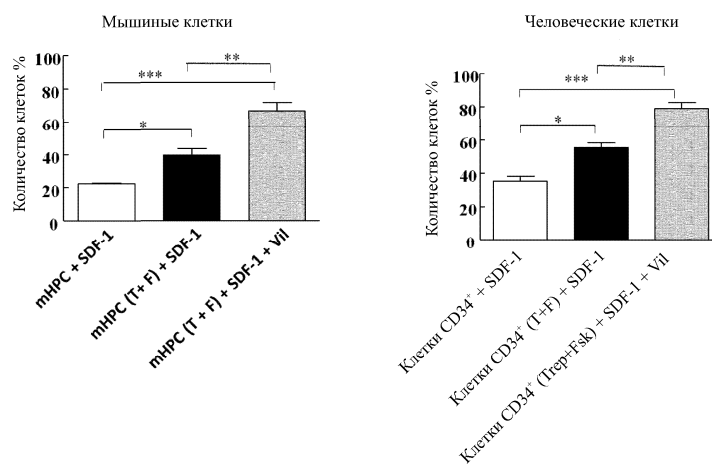
9. Способ по п.8, в котором указанные стволовые клетки или клетки-предшественники получают из пуповинной крови, донорского костного мозга или плаценты.



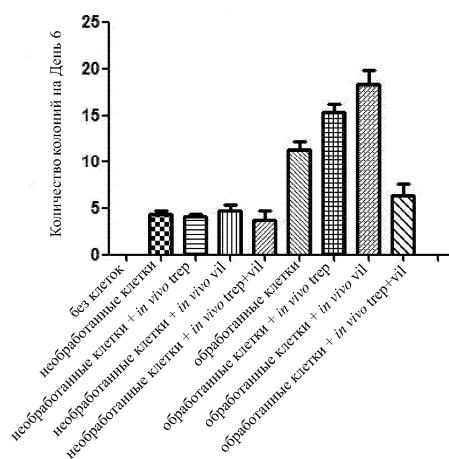
Фиг. 1



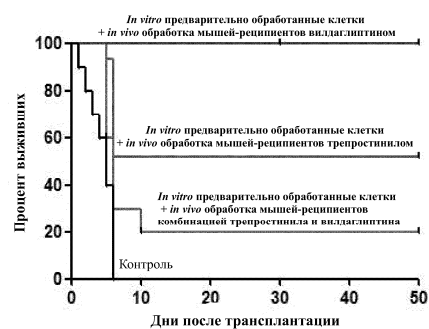
Фиг. 2



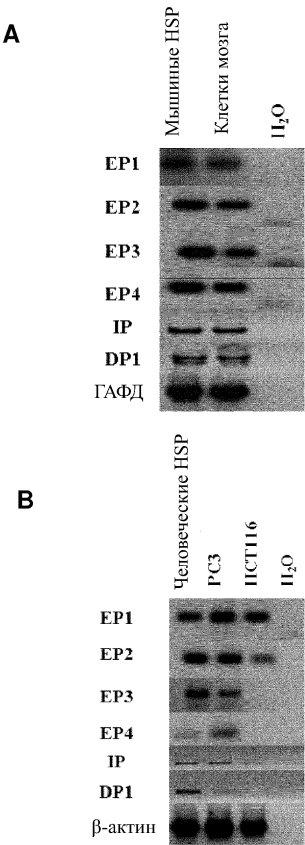
Фиг. 3



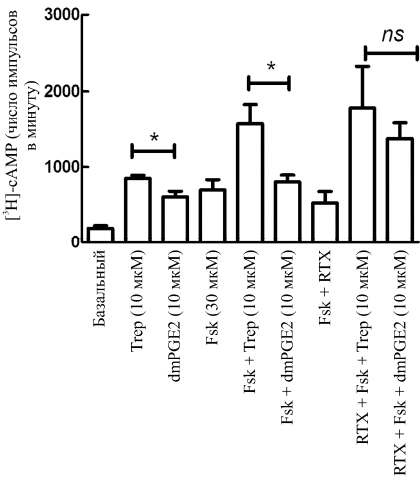
Фиг. 4



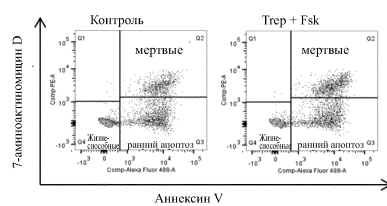
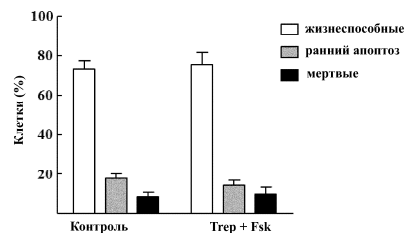
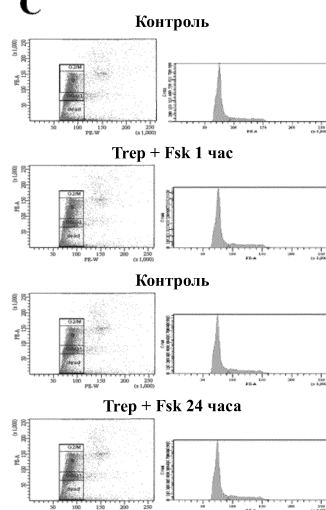
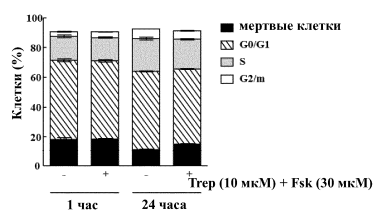
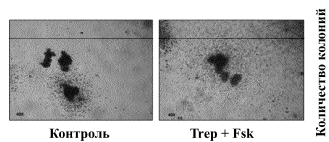
Фиг. 5



Фиг. 6



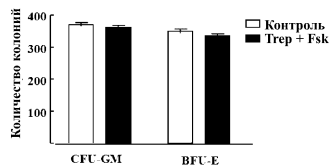
Фиг. 7

A**B****C****D****E**

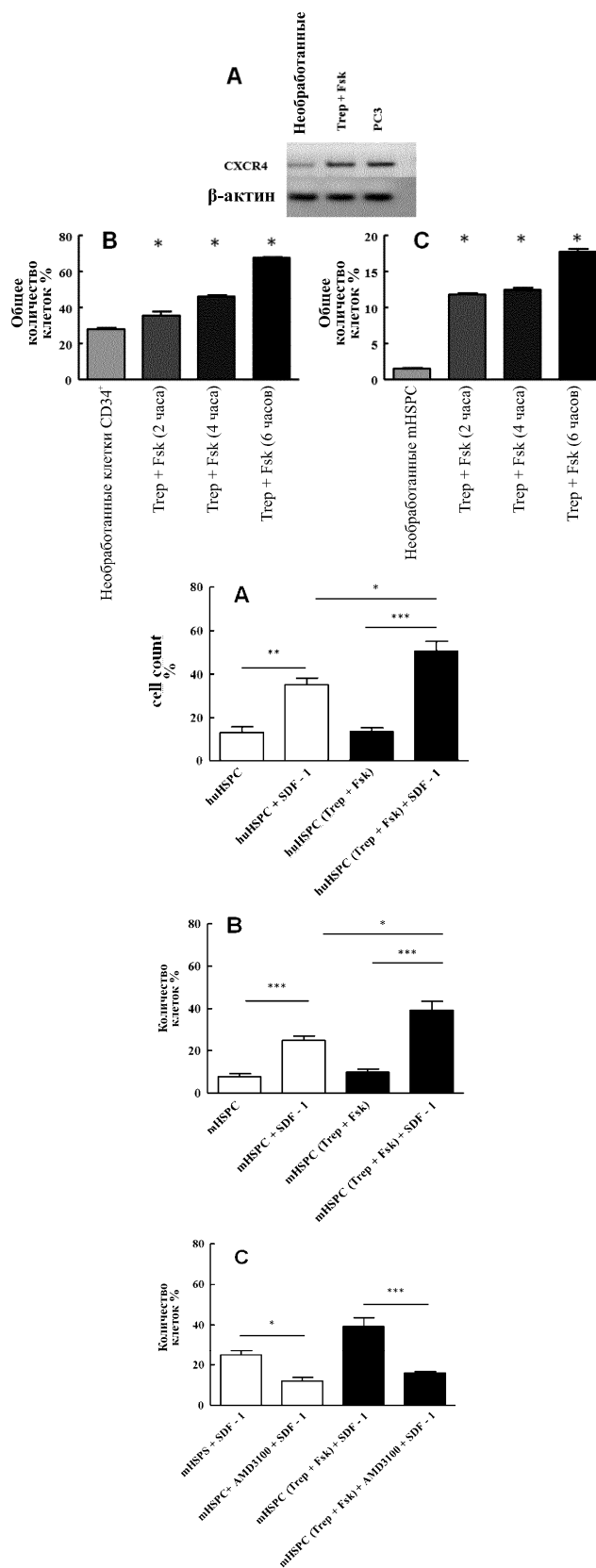
Контроль

Trep + Fsk

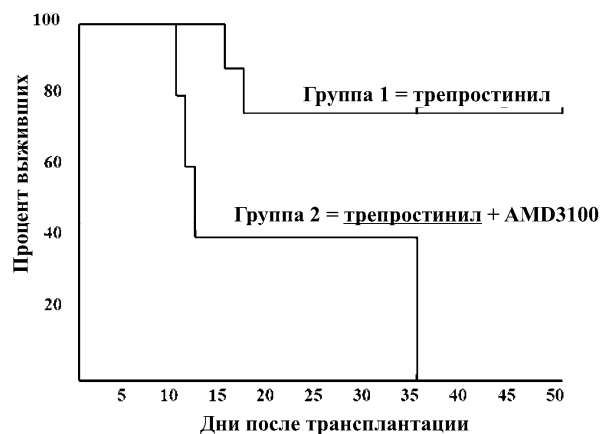
Количество колоний

F

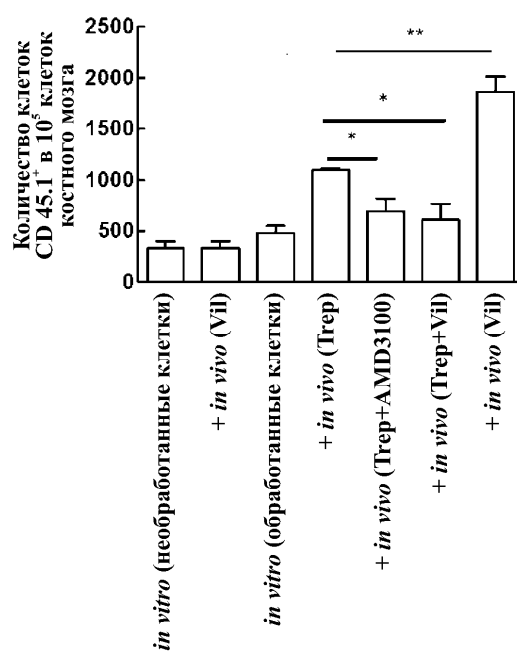
Фиг. 8



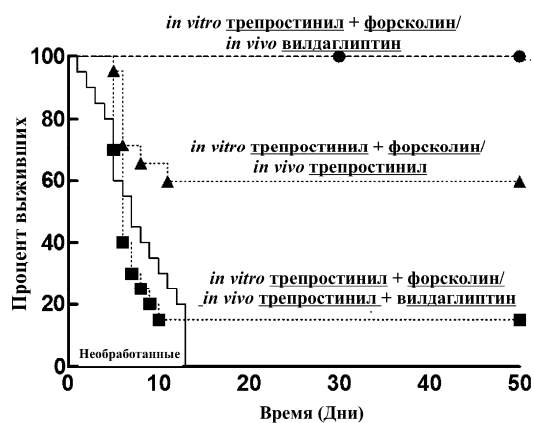
Фиг. 9 (А, В, С) и 10 (А, В, С)



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

