

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291760 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.18

(51) Int. Cl. C12N 5/0789 (2010.01)
C07D 519/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.16

(54) НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ

(31) PCT/CN2019/125687

(32) 2019.12.16

(33) CN

(86) PCT/CN2020/136790

(87) WO 2021/121266 2021.06.24

(71) Заявитель:
ЭДИДЖЕН (ГУАНЧЖОУ) ИНК. (CN)

(72) Изобретатель:

Фан Жиго, Ян Хуэйхуэй, Ши Чжунъюй,
Юань Пэнфэй, Юй Линлин (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Предложены низкомолекулярные ингибиторы для размножения гемопоэтических стволовых клеток (HSC) и их комбинации. Низкомолекулярные ингибиторы и их комбинации могут поддерживать стволовость гемопоэтических стволовых клеток, одновременно способствуя размножению гемопоэтических стволовых клеток (HSC) in vitro.

202291760

A1

A1

202291760

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к области биомедицины, в частности к низкомолекулярному соединению для размножения гемопоэтических стволовых клеток (HSC), более конкретно к низкомолекулярному ингибитору клеточного сигнального пути, его композиции и применению низкомолекулярного ингибитора и его композиции для размножения гемопоэтических стволовых клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) представляют собой группу гетерогенных примитивных гемопоэтических клеток в системе крови, с двумя важными характеристиками самообновления и мультилинейной дифференциации. Когда организм находится в здоровом состоянии, HSC в организме в течение длительного времени находятся в состоянии покоя. Когда организм находится в состоянии заболевания или тяжелой кровопотери, HSC активируются и вступают в состояние самообновления и многолинейной дифференциации для поддержания стабильности кровеносной системы и гомеостаза организма. Свойство самообновления HSC полезно для поддержания стволовости потомства HSC, в то время как свойство многолинейной дифференцировки HSC позволяет им дифференцироваться в различные зрелые клетки крови, такие как миелоидные клетки (гранулоциты, моноциты, эритроциты и тромбоциты), лимфоидные клетки (Т-клетки и В-клетки). Свойства HSC облегчают дифференцировку HSC, когда они необходимы организму.

Эти свойства HSC позволяют лечить гематологические заболевания путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). HSC включают долгосрочные гемопоэтические стволовые клетки (LT-HSC) и краткосрочные гемопоэтические стволовые клетки (ST-HSC). Первые обладают высокой способностью к самообновлению и может осуществлять гемопоэтическую реконструкцию на протяжении всего жизненного цикла организма; в то время как вторые могут поддерживать функцию гемопоэтической реконструкции только в течение ограниченного времени. В 1959 году Томас и др.

использовали гемопоэтические стволовые клетки костного мозга для первой трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в истории человека, клинически леча лейкоз для восстановления нормальной гемопоэтической функции у пациента. В последующие десятилетия благодаря постоянным усилиям научных исследователей трансплантация гемопоэтических стволовых клеток не только использовалась для лечения различных заболеваний кровеносной системы, но и для лечения заболеваний иммунодефицита и нейродегенеративных заболеваний.

В настоящее время существует три основных источника HSC, т.е. костный мозг (BM), мобилизованная периферическая кровь (mPB) и пуповинная кровь (CB). Сбор гемопоэтических стволовых клеток костного мозга является инвазивным и недостаточным, поэтому этот метод в основном исключен. Доля HSC в периферической крови человека очень низкая (менее 0,1 %), и необходимо использовать гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток для миграции из костного мозга в периферическую кровь для трансплантации. В клинических применениях мобилизационный эффект часто неэффективен, а количество HSC, содержащихся в периферической крови, является недостаточным, что приводит к повторной мобилизации или неудачной трансплантации. Кроме того, HSC, собранные этими двумя способами, требуют соответствия лейкоцитарного антигена человека (HLA) между донором и пациентом. Совпадение HLA затруднено, и как только происходит несоответствие, это приводит к реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), и пациент с GVHD умрет от нарушений иммунной системы.

В качестве нового источника HSC имеет много преимуществ кровь пуповины. Во-первых, HSC пуповинной крови имеют низкие требования к совпадению HLA, что позволяет частичное несовпадение HLA, и частота GVHD после трансплантации низкая, что облегчает трудность традиционного HSCT-согласования; во-вторых, сбор крови пуповины удобен, безвреден для донора и не имеет этических проблем, и HSC имеют сильную гемопоэтическую способность. Эти преимущества делают кровь пуповины предпочтительным источником HSC для лечения заболеваний в будущем.

Однако из-за небольшого количества клеток в одном сборе крови пуповины общее количество HSC небольшое, поэтому трансплантация HSC ограничена детьми или

легковесными взрослыми и не может удовлетворить потребности в трансплантации взрослых с большим весом. При недостаточном количестве трансплантированных HSC у пациента происходит задержка восстановления нейтрофилов, что приводит к повышенному риску РТПХ. Это стало узким местом, ограничивающим клиническое применение пуповинной крови.

В заключение, безопасность и эффективность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток зависят от содержания трансплантированных HSC. Если количество HSC может быть увеличено *in vitro*, можно улучшить показатель успеха трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Исследователи продолжают усердно работать и пытаются исследовать различные методы для размножения гемопоэтических стволовых клеток *in vitro*. Одна из стратегий размножения HSC *in vitro* заключается в использовании низкомолекулярных соединений (SMC), нацеленных на HSC. SMC легко доступны в источнике, их легко массово производить, они стабильны по своей природе, имеют четкую структуру и легко контролируются по концентрации, и широко используются в медицинских исследованиях. В текущей технологии размножения HSC *in vitro* SMC могут значительно увеличивать кратности экспансии HSC. Например, AhR (ингибитор арил-углеводородного рецептора) StemRegenin1 (SR1) представляет собой первую исследованную SMC, которая может размножать HSC *in vitro*. Производное пиримидина индола UM171 также позволяет размножать HSC *in vitro*, но оно не действует через клеточный сигнальный путь AhR. Анализ транскриптома показывает, что UM171 не подавляет клеточный сигнальный путь AhR, но ингибирует гены, связанные с дифференцировкой эритроцитов и мегакариоцитов. Комбинация этих двух веществ может кратно увеличить размножение HSC.

Деацетилазы гистонов (HDAC) являются известными клеточными сигнальными путями. Гистоны могут регулировать процесс транскрипции специфических генов, пролиферацию и дифференцировку клеток посредством ацетилирования или деацетилирования. Существующие результаты исследований показывают, что ацетилирование гистонов играет роль в самообновлении и пролиферации HSC. Ингибиторы HDAC TSA, трапоксин и хламидоцин, могут регулировать ацетилирование гистонов *in vitro* для содействия самообновлению и пролиферации HSC.

Src кодируется протоонкогеном Src и представляет собой нерецепторную протеинкиназу с тирозинкиназной активностью. Он находится в цитоплазме и может быть активирован различными рецепторами клеточной поверхности для участия в опосредовании множества путей передачи сигналов клеток, тем самым регулируя клеточную пролиферацию, дифференцировку и другие процессы, и он является ключевой молекулой в множестве путей передачи сигналов клеток. Например, после активации Src, он взаимодействует с p52Shc для активации сигнального пути митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) и участвует в последующей работе MAPK для регуляции роста и дифференцировки клеток; Src также может активировать клеточный сигнальный путь STAT и способствовать транскрипции родственных генов. До сих пор не сообщалось о каких-либо исследованиях, в которых ингибиторы Src помогали бы поддерживать стволовость HSC во время экспансии *in vitro*, но в исследовании настоящего изобретения мы обнаружили, что ингибиторы Src могут способствовать пролиферации HSC и поддерживать стволовость HSC.

Хотя было обнаружено, что низкомолекулярные ингибиторы некоторых клеточных сигнальных путей могут способствовать пролиферации HSC, в этой области по-прежнему необходимо продолжать поиск низкомолекулярных соединений, которые могут способствовать пролиферации HSC более эффективно и могут поддерживать стволовость пролиферируемых HSC, и всеобъемлющую стратегию для достижения этой цели, чтобы удовлетворить клинические потребности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Проблема, которую необходимо решить с помощью данной заявки, заключается в отборе лучших низкомолекулярных соединений и их композиций, которые могут способствовать размножению HSC *in vitro* при сохранении высокой доли стволовости HSC путем изучения ключевых факторов, которые регулируют клеточные сигнальные пути, чтобы решить проблему в предшествующем уровне техники, что количество HSC, расширенных *in vitro*, все еще недостаточно.

Во-первых, исследование авторов показало, что множество низкомолекулярных ингибиторов, нацеленных на Src в клеточном сигнальном пути STAT, могут хорошо поддерживать стволовость HSC в культуре *in vitro*. Мишени Src играют важную роль в

размножении гемопоэтических стволовых клеток в клеточном сигнальном пути STAT, сохраняя при этом стволовость гемопоэтических стволовых клеток, о чем не сообщалось в предыдущих исследованиях.

Кроме того, авторы обнаружили, что во время культивирования HSC *in vitro* комбинации ингибиторов HDAC, таких как SAHA (субероиланилид гидроксамовой кислоты) и вальпроевая кислота (VPA), с низкомолекулярными ингибиторами, нацеленными на Src, могут хорошо поддерживать стволовость HSC, и его эффект намного лучше, чем у SR1 и UM171, которые были обнаружены в предшествующем уровне техники.

Следовательно, в одном аспекте настоящего изобретения обнаружено, что низкомолекулярные ингибиторы клеточного сигнального пути преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT), такие как низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на мишень Src, могут способствовать пролиферации HSC и поддерживать характеристики стволовости HSC. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложен способ стимулирования пролиферации HSC и поддержания стволовости HSC, включающий: *in vitro* приведение HSC в контакт с культуральной средой, содержащей низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT или низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути, отличного от клеточного сигнального пути STAT. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT представляет собой низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, кверцетина, UM-164, KX2-391 и KX1-004. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, UM-164 и KX1-004.

В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором другого клеточного сигнального пути. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор другого клеточного сигнального пути представляет собой один или два или более из группы, состоящей из: низкомолекулярного ингибитора, нацеленного на HDAC, низкомолекулярного ингибитора, нацеленного на PKC

(протеинкиназа C), и низкомолекулярного ингибитора, нацеленного на JNK (Jun-N-терминальная киназа). В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором, нацеленным на HDAC, низкомолекулярным ингибитором, нацеленным на PKC, или низкомолекулярным ингибитором, нацеленным на JNK. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором VPA, нацеленным на HDAC, низкомолекулярным ингибитором SAHA, нацеленным на HDAC, низкомолекулярным ингибитором энзастаурином, нацеленным на PKC, или низкомолекулярным ингибитором JNK-IN-8, нацеленным на JNK. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор дазатиниб, нацеленный на Src, применяют в комбинации с VPA или SAHA. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT), например, низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, такой как дазатиниб, UM-164 или KX1-004, поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток; например, поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, составляющую 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 5-30, 10-30, 20-30, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 5-20, 10-20, 15-20 % всех клеток; поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложена композиция для поддержания стволовости HSC, содержащая низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT представляет собой низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, кверцетина, UM-164, KX2-391 и KX1-004. В некоторых вариантах реализации изобретения указанная композиция дополнительно содержит низкомолекулярный ингибитор другого клеточного сигнального пути. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор других путей передачи сигналов клетки содержит низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный

ингибитор, нацеленный на PKC, или низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на JNK. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор другого клеточного сигнального пути содержит низкомолекулярный ингибитор VPA, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный ингибитор SAHA, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный ингибитор энзастаурин, нацеленный на PKC, или низкомолекулярный ингибитор JNK-IN-8, нацеленный на JNK. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит среду SFEMII (бессывороточная среда для размножения II), фактор роста Flt-3L, фактор роста SCF (фактор стволовых клеток), фактор роста TPO (тиреопероксидаза) и фактор роста IL-6 (интерлейкин 6). В некоторых вариантах реализации изобретения композиция состоит из низкомолекулярного ингибитора клеточного сигнального пути STAT и/или низкомолекулярного ингибитора другого клеточного сигнального пути, среды SFEMII, фактора роста Flt-3L, фактора роста SCF, фактора роста TPO и фактора роста IL-6. В некоторых вариантах реализации композиция поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток, например, поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, составляющую 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 5-30, 10-30, 20-30, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 5-20, 10-20 или 15-20 % всех клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT), например, низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, такой как дазатиниб, UM-164 или KX1-004, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором другого клеточного сигнального пути, такого как VPA или SAHA, для поддержания доли HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток; например, для поддержания доли HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, составляющей 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 5-30, 10-30, 20-30, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 5-20, 10-20 или 15-20% всех клеток; для поддержания доли CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация каждого ингибитора в культуральной среде составляет:

дазатиниб: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

SAHA: 10 нМ - 20 мкМ, предпочтительно 20 нМ - 15 мкМ, более предпочтительно 30 нМ - 10 мкМ, наиболее предпочтительно 0,1-10 мкМ;

VPA: 10-2000 мкМ, предпочтительно 10-1500 мкМ, более предпочтительно 10-1000 мкМ, наиболее предпочтительно 100-1000 мкМ;

JNK-IN-8: 0,1-20 мкМ, предпочтительно 0,5-15 мкМ, более предпочтительно 0,5-10 мкМ, наиболее предпочтительно 1-10 мкМ;

EPZ004777: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

DZNeP: 1-500 нМ, предпочтительно 5-400 нМ, более предпочтительно 10-300 нМ, наиболее предпочтительно 10-250 нМ;

UM-164: 0,1-1000 мкМ, предпочтительно 0,5-500 мкМ, более предпочтительно 1-100 мкМ, наиболее предпочтительно 1-10 мкМ;

KX2-391: 0,1-1000 нМ, предпочтительно 1-1000 нМ, более предпочтительно 10-500 нМ, наиболее предпочтительно 10-100 нМ;

KX1-004: 0,1-1000 мкМ, предпочтительно 1-1000 мкМ, более предпочтительно 10-500 мкМ, наиболее предпочтительно 10-100 мкМ.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ стимулирования пролиферации HSC и поддержания стволовости HSC, включающий: *in vitro* приведение HSC в контакт с культуральной средой, содержащей один или более низкомолекулярных ингибиторов, выбранных из группы, состоящей из: 1) низкомолекулярного ингибитора VPA, нацеленного на HDAC; 2) низкомолекулярного ингибитора SAHA, нацеленного на HDAC; 3) низкомолекулярного ингибитора энзастаурина, нацеленного на PKC; и 4) низкомолекулярного ингибитора JNK-IN-8, нацеленного на JNK.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция для поддержания стволовости HSC, которая содержит любую комбинацию, выбранную из группы, состоящей из: SAHA плюс EPZ004777, SAHA плюс DZNeP, SAHA плюс дазатиниб, VPA плюс дазатиниб, SAHA плюс JNK-IN-8 или SAHA плюс VPA. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит среду SFEMII, фактор роста Flt-3L,

фактор роста SCF, фактор роста TPO и фактор роста IL-6. В некоторых вариантах реализации композиция состоит из: любой комбинации, выбранной из среды SAHA плюс EPZ004777, SAHA плюс DZNeP, SAHA плюс дазатиниб, VPA плюс дазатиниб, SAHA плюс JNK-IN-8 или SAHA плюс VPA и среды SFEMII, фактора роста Flt-3L, фактора роста SCF, фактора роста TPO и фактора роста IL-6. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция для поддержания стволовости HSC также может способствовать поддержанию доли CD34+ клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток, например, поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, составляющую 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 5-30, 10-30, 20-30, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 5-20, 10-20 или 15-20 % всех клеток; поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация каждого ингибитора в культуральной среде составляет:

дазатиниб: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

SAHA: 10 нМ - 20 мкМ, предпочтительно 20 нМ - 15 мкМ, более предпочтительно 30 нМ - 10 мкМ, наиболее предпочтительно 0,1-10 мкМ;

VPA: 10-2000 мкМ, предпочтительно 10-1500 мкМ, более предпочтительно 10-1000 мкМ, наиболее предпочтительно 100-1000 мкМ;

JNK-IN-8: 0,1-20 мкМ, предпочтительно 0,5-15 мкМ, более предпочтительно 0,5-10 мкМ, наиболее предпочтительно 1-10 мкМ;

EPZ004777: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

DZNeP: 1-500 нМ, предпочтительно 5-400 нМ, более предпочтительно 10-300 нМ, наиболее предпочтительно 10-250 нМ.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция для поддержания стволовости HSC, где композиция содержит любую комбинацию, выбранную из: SAHA плюс EPZ004777 плюс DZNeP или SAHA плюс VPA плюс дазатиниб. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит среду SFEMII, фактор роста

Flt-3L, фактор роста SCF, фактор роста TPO и фактор роста IL-6. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция состоит из: SAHA плюс EPZ004777 плюс DZNeP или SAHA плюс VPA плюс дазатиниб и среды SFEMII, фактора роста Flt-3L, фактора роста SCF, фактора роста TPO и фактора роста IL-6. В некоторых вариантах осуществления композиция поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток, например, поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, составляющую 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 5-30, 10-30, 20-30, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 5-20, 10-20 или 15-20 % всех клеток; поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация каждого ингибитора в культуральной среде составляет:

дазатиниб: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

SAHA: 10 нМ - 20 мкМ, предпочтительно 20 нМ - 15 мкМ, более предпочтительно 30 нМ - 10 мкМ, наиболее предпочтительно 0,1-10 мкМ;

VPA: 10-2000 мкМ, предпочтительно 10-1500 мкМ, более предпочтительно 10-1000 мкМ, наиболее предпочтительно 100-1000 мкМ;

EPZ004777: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

DZNeP: 1-500 нМ, предпочтительно 5-400 нМ, более предпочтительно 10-300 нМ, наиболее предпочтительно 10-250 нМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT представляет собой низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, кверцетина, UM-164, KX2-391 и KX1-004. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, UM-164 и KX1-004. Согласно результатам исследований авторов, вышеуказанные низкомолекулярные ингибиторы клеточных сигнальных путей могут хорошо поддерживать стволовость HSC во время экспансии *in vitro*

и долю клеток CD34+, и эффект комбинаций этих низкомолекулярных ингибиторов превосходит комбинации низкомолекулярных ингибиторов, описанные в предшествующем уровне техники, при самообновлении и поддержании стволовости HSC.

В этой заявке авторы обнаружили, что ингибитор Src может хорошо поддерживать стволовость HSC при размножении *in vitro* и в культуре HSC; и было обнаружено, что действие комбинации ингибитора, нацеленного на HDAC, и ингибитора, нацеленного на Src, лучше, чем действие комбинации низкомолекулярных ингибиторов, описанных в предшествующем уровне техники, и действие этих низкомолекулярных ингибиторов, используемых отдельно при размножении *in vitro* и в культуре HSC. Результаты исследований авторов могут реализовать *in vitro* размножение HSC при сохранении высокой доли стволовости HSC, закладывая основу для клинического применения HSC.

Вышеупомянутая "стволовость" гемопоэтических стволовых клеток является аббревиатурой для характеристик гемопоэтических стволовых клеток. Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) демонстрируют две основные клеточные биологические характеристики: способность к самообновлению и плюрипотентность. Эти свойства гемопоэтических стволовых клеток сокращенно называют "стволовость". В некоторой степени молекулярные фенотипы, экспрессируемые на клеточной поверхности гемопоэтических стволовых клеток, могут отражать, сохраняют ли они "стволовость". Например, если фенотипом гемопоэтических стволовых клеток является CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, это означает, что они являются LT-HSC и сохраняют "стволовость". В настоящей заявке гемопоэтические стволовые клетки с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- определяются как LT-HSC; если гемопоэтические стволовые клетки имеют фенотип CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-, они определяются как поддерживающие или сохраняющие свойства гемопоэтических стволовых клеток, то есть "стволовость".

Общее количество клеток относится ко всем клеткам потомства после культивирования исходных клеток CD34+.

В настоящем изобретении гемопоэтические стволовые клетки контактируют *in vitro* с низкомолекулярным ингибитором клеточного сигнального пути STAT, таким как низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, или низкомолекулярный ингибитор

другого клеточного сигнального пути, таким как низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на PKC, и низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на JNK, тем самым хорошо поддерживая стволовость HSC во время размножения *in vitro* и долю клеток CD34⁺ во всех HSC, а также при самообновлении, поддержании стволовости и в других аспектах HSC, действие комбинаций этих низкомолекулярных ингибиторов превосходит действие низкомолекулярных комбинаций, описанных в предшествующем уровне техники, и эффективность трансплантации клеток, обработанных вышеупомянутыми низкомолекулярными ингибиторами, значительно выше, чем эффективность трансплантации клеток, обработанных низкомолекулярными ингибиторами, описанными в предшествующем уровне техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показано определение стратегии гейтирования и положения гейта популяции клеток-мишеней, т.е. популяции клеток CD34⁺CD45⁺CD45RA⁻CD90⁺CD38⁻.

На фиг. 2 показан первый раунд скрининга для определения оптимальных концентраций низкомолекулярных ингибиторов и способности поддерживать стволовость HSC на клетках CD34⁺, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁻CD38⁻), обнаруженных с помощью проточной цитометрии через 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами из Таблицы 4 (4 концентрации протестированы для каждого низкомолекулярного ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁻CD38⁻ (%) во всех клетках, и CD34⁺CD45⁺ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 3 показан второй этап скрининга для определения оптимальных концентраций низкомолекулярных ингибиторов и способности поддерживать стволовость HSC на клетках CD34⁺, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁻CD38⁻), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами из Таблицы 5, где на оси абсцисс показаны названия ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси

ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 4 показан третий раунд скрининга для определения оптимальных концентраций низкомолекулярных ингибиторов и способности поддерживать стволовость HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии через 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами из Таблицы 4 (за исключением SAHA - 1 мкМ, 3 концентрации протестированы для каждого низкомолекулярного ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, и CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 5 показан четвертый раунд скрининга для определения оптимальных концентраций низкомолекулярных ингибиторов и способности поддерживать стволовость HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии через 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами из Таблицы 7 (за исключением SAHA - 1мкМ, 3 концентрации протестированы для каждого низкомолекулярного ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, и CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 6 показан пятый раунд скрининга для определения оптимальных концентраций низкомолекулярных ингибиторов и способности поддерживать стволовость HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии через 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами из Таблицы 8 (за исключением SAHA - 1 мкМ, 3 концентрации протестированы для каждого низкомолекулярного ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC

CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, и CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 7 показан первый раунд скрининга лучшей бимолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC(CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинациями низкомолекулярных ингибиторов: SAHA плюс SR1, SAHA плюс VE821, SAHA плюс PFI3 и SAHA плюс S-4-A, где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 8 показан второй раунд скрининга лучшей бимолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинациями низкомолекулярных ингибиторов: SAHA плюс SR1, SAHA плюс UM171, SAHA плюс PGE2, SAHA плюс GW9662 и SAHA плюс FLU, где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 9 показан третий раунд скрининга лучшей бимолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинациями низкомолекулярных ингибиторов: SAHA плюс бутират, SAHA плюс EPZ004777, SAHA плюс DZNeP и SAHA плюс витамин С (за исключением SAHA, для каждого ингибитора тестировали 3 концентрации), где на оси абсцисс показано название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. S означает SAHA (1 мкМ).

На фиг. 10 показан четвертый раунд скрининга лучшей бимолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинациями низкомолекулярных ингибиторов: SAHA плюс дазатиниб, SAHA плюс SGC0496, SAHA плюс JNK-IN-8 и SAHA плюс энзастаурин (LY317615) (за исключением SAHA, 3 концентрации тестировали для каждого ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. S означает SAHA (1 мкМ).

На фиг. 11 показан пятый раунд скрининга лучшей бимолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинациями низкомолекулярных ингибиторов: SAHA плюс VPA, SAHA плюс Go6983, SAHA плюс DCA и SAHA плюс GSK2606414 (за исключением SAHA, 2-3 концентрации тестировали для каждого ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. S означает SAHA (1 мкМ).

На фиг. 12 показан первый раунд скрининга лучшей тримолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинацией низкомолекулярных ингибиторов SAHA плюс EPZ004777 плюс DZNeP, где на оси абсцисс показаны названия ингибиторов и соответствующие концентрации, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. 3 повтора в каждой группе, * означает значительную разницу.

На фиг. 13 показан второй раунд скрининга лучшей тримолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+ пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции низкомолекулярными комбинациями: SAHA плюс дазатиниб плюс EPZ004777, SAHA плюс JNK-IN-8 плюс EPZ004777, SAHA плюс JNK-IN-8 плюс DZNeP, SAHA плюс JNK-IN-8 плюс дазатиниб и SAHA плюс JNK-IN-8 плюс EPZ004777 плюс DZNeP, где на оси абсцисс показаны названия комбинаций ингибиторов и соответствующие концентрации, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45 (%) отражает чистоту HSC. 3 повтора в каждой группе, * означает значительную разницу.

На фиг. 14 показан третий раунд скрининга лучшей тримолекулярной комбинации низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции комбинацией низкомолекулярных ингибиторов SAHA плюс VPA плюс дазатиниб, где на оси абсцисс показаны названия комбинаций ингибиторов и соответствующие концентрации, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. 3 повтора в каждой группе, * означает значительную разницу.

На фиг. 15 показано сравнение между проверенными низкомолекулярными ингибиторами и низкомолекулярными ингибиторами SR1 и UM171, описанными в уровне техники, на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови. Диаграмма анализа экспрессии маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами, где на оси абсцисс показаны названия комбинаций ингибиторов и соответствующие концентрации, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. 3 повтора в каждой группе, * означает значительную разницу.

На фиг. 16 показана диаграмма анализа клоногенной способности *in vitro* исследованных низкомолекулярных ингибиторов и низкомолекулярных ингибиторов SR1 и UM171, описанных в уровне техники на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови. BFU-E, CFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM представляют собой клоны различных линий крови, такие как эритроидная, миелоидная и лимфоидная, где на оси абсцисс показаны названия комбинаций ингибиторов и соответствующие концентрации, на оси ординат (количество колоний) показано общее количество клонов, а количество колоний GEMM представляет собой количество клонов CFU-GEMM. 3 повтора в каждой группе, * означает значительную разницу. S означает SAHA (1 мкМ).

На фиг. 17 показан скрининг для определения оптимальных концентраций низкомолекулярных ингибиторов и способности поддерживать стволовость HSC на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, схема анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 6-7 дней индукции низкомолекулярными ингибиторами из Таблицы 9 (за исключением SAHA-1 мкМ, 3 концентрации тестируются для каждого ингибитора), где на оси абсцисс показаны название ингибитора и соответствующая концентрация, а на оси ординат показана доля LT-HSC CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC.

На фиг. 18, 18A и 18C показана диаграмма анализа экспрессии маркеров поверхности клеток LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-), обнаруженных с помощью проточной цитометрии после 8 дней обработки низкомолекулярными соединениями: Mock (ДМСО), SR1 (5 мкМ), UM171 (350 нМ) и дазатиниб (50 нМ) на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, где на оси абсцисс показано название ингибитора, а на оси ординат CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- (%) показан доля LT-HSC во всех клетках, CD34+CD45+ (%) отражает чистоту HSC. На фиг. 18B и 18D показано абсолютное количество LT-HSC и пролиферации клеток CD34+ после 8 дней обработки низкомолекулярными: Mock (ДМСО), SR1 (5 мкМ), UM171 (350 нМ) и дазатиниб (50 нМ), на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, где на оси абсцисс показано название ингибитора, а на оси ординат показано количество клеток.

На фиг. 19 показано определение стратегии гейтирования и положения гейтов для популяций клеток hCD45+ и mCD45+; где NC представляет собой контроль без добавления антитела, 33 представляет собой образец №33 с добавленным антителом, hCD45 представляет собой клетки CD45+ человеческого происхождения, и mCD45 представляет собой клетки CD45+ мышиноного происхождения.

На фиг. 20 показано определение стратегии гейтирования и положения гейтов для популяций клеток hCD45+, hCD3+, hCD33+, hCD56+, hCD19+ и mCD45+; где hCD3+ представляет собой клетки CD3+ человека и представляет собой поверхностный маркер Т-лимфоцитов; hCD33+ представляет собой клетки CD33+ человека и представляет собой поверхностный маркер миелоидных клеток; hCD56+ представляет собой клетки CD56+ человека и представляет собой поверхностный маркер естественных клеток-киллеров (NK-клеток); hCD19+ представляет собой клетки CD19+ человека и представляет собой поверхностный маркер В-лимфоцитов; и mCD45 представляет собой клетки CD45+ мыши.

На фиг. 21 показано, что после 7 дней обработки низкомолекулярными соединениями: Mock (ДМСО), SR1 (5 мкМ), дазатиниб (50 нМ), на клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, все клетки собирали и трансплантировали мышам, долю человеческих клеток CD45 в периферической крови мышей определяли с помощью проточной цитометрии на 4, 8, 12 и 16 неделе после трансплантации, а долю человеческих клеток CD45 в костном мозге и селезенке мышей определяли с помощью проточной цитометрии на 16 неделе после трансплантации. На фиг. 21А на оси абсцисс показано название ингибитора и время трансплантации, а на оси ординат hCD45-PB (%) показана доля человеческих клеток CD45+, обнаруженных в периферической крови мышей. PB обозначает периферическую кровь, а hCD45 обозначает клетки CD45+ человеческого происхождения. На фиг. 21В на оси абсцисс показано название ингибитора, а на оси ординат hCD45-BM (%) показана доля клеток CD45+ человеческого происхождения, обнаруженных в костном мозге мышей. BM обозначает костный мозг, а hCD45 обозначает клетки CD45+ человеческого происхождения. На фиг. 21С на оси абсцисс показано название ингибитора, а на оси ординат hCD45-SP (%) показана доля клеток CD45+ человеческого происхождения, обнаруженных в селезенке мыши. SP обозначает селезенку, а hCD45 обозначает клетки CD45+ человеческого происхождения.

На фиг. 22 показано, что после 7 дней обработки с помощью малых молекул Моск (DMSO), SR1 (5 мкМ), дазатиниб (50 нМ), клеток CD34+, полученных из пуповинной крови, все клетки собирали и трансплантировали мышам, доля клеток человека hCD3+, hCD33+, hCD56+ и hCD19+ в периферической крови, костном мозге и селезенке мышей обнаруживали с помощью проточной цитометрии на 16 неделе после трансплантации, Т, Му, NK и В соответственно представляют собой Т-лимфоциты человека (Т), миелоидные клетки (Му), естественные клетки-киллеры (NK) и В-лимфоциты (В); при этом на фиг. 22А на оси абсцисс показано название ингибитора, а на оси ординат показана доля клеток hCD45+ различных линий в периферической крови; на фиг. 22В на оси ординат показана доля клеток hCD45+ различных линий в костном мозге; и на фиг. 22С, на оси ординат показана доля клеток hCD45+ в селезенке.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Отбор CD34+ HSC из крови пуповины для последующего скрининга ингибитора малых молекул

Приготовление реагентов: Н-лизирующий буферный раствор (1×) и промывочный буферный раствор (1×). 5 мл исходного раствора Н-лизирующего буфера (10×) (R&D, кат. № WL1000), затем добавляли 45 мл деионизированной воды (Edigene, фильтровали с помощью мембранного фильтра 0,22 мкм), чтобы хорошо перемешать для приготовления раствора Н-лизирующего буфера (1×). 5 мл исходного раствора промывочного буфера (10×) (R&D, кат. № WL1000), затем добавляли 45 мл деионизированной воды, чтобы хорошо перемешать для приготовления промывочного буферного раствора (1×).

Физиологический раствор добавляли к 10 мл пуповинной крови (Edigene) до конечного объема 30 мл. Раствор для разделения лимфоцитов человека (Dakewe, кат. № DKW-KLSH-0100) добавляли в разбавленную кровь, затем центрифугировали при 400 g в течение 30 минут (задавали скорость ускорения 3, скорость замедления 0), отбирая лейкотромбоцитарный слой для центрифугирования при 500 g в течение 10 минут. Гранулы клеток собирали в 50 мл центрифужную пробирку, добавляли 10 мл Н-лизирующего буфера (1×) для лизиса эритроцитов при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем добавляли 10 мл промывочного буфера (1×) для остановки реакции лизиса, добавляли

физиологический раствор для получения конечного объема 50 мл. Вышеуказанную центрифужную пробирку объемом 50 мл переносили в высокоскоростную центрифугу для центрифугирования при 500 g в течение 10 мин, отбрасывали супернатант, ресуспендировали клетки 50 мл физиологического раствора (1 % ЧСА) для хорошего перемешивания и переносили 20 мкл клеточной суспензии в клеточный счетчик (Nexcelom, модель: Cellometer K2), затем переносили эту центрифужную пробирку в высокоскоростную центрифугу для центрифугирования при 500 g в течение 10 мин; отбрасывали супернатант и добавляли соответствующий объем магнитных частиц (100 мкл FcR/ 1×10^8 клеток и 100 мкл CD34 MicroBeads/ 1×10^8 клеток) в соответствии с результатом подсчета. Конкретные операции заключались в следующем: во-первых, блокирующий FcR реагент (Miltenyi biotec, кат. № 130-100-453, количество реагента определяли по результату подсчета клеток) добавляли для ресуспендирования клеток, затем добавляли предварительно смешанные CD34 MicroBeads (CD34 MicroBead Kit UltraPure, человека: MiltenyiBiotec, кат. № 130-100-453), для хорошего перемешивания и инкубировали в холодильнике при 4 °C в течение 30 мин. Физиологический раствор (1 % HSA (человеческий сывороточный альбумин)) добавляли в центрифужную пробирку до конечного объема 50 мл, переносили в высокоскоростную центрифугу для центрифугирования при 500 g в течение 10 мин. Использовали магнитный сепаратор (MiltenyiBiotec, модель: 130-042-102) и магнитную стойку (MiltenyiBiotec, модель: 130-042-303), которые регулируют магнитный сепаратор до подходящей высоты, и помещали его в колонку MS (MiltenyiBiotec, кат. № 130-042-201) или колонку LS (MiltenyiBiotec, кат. № 130-042-401) (тип колонки следует выбирать в соответствии с количеством ячеек, пожалуйста, обратитесь к соответствующей инструкции продукта для получения подробной информации), затем помещали 15 мл центрифужную пробирку (Corning, кат. № 430791), чтобы собрать суспензию нецелевых клеток, промывали колонку MS или LS 1 мл (колонка MS) или 3 мл (колонка LS) физиологического раствора (1 % HSA). После центрифугирования в центрифужной пробирке в вышеупомянутой высокоскоростной центрифуге (Thermo, модель: ST40) супернатант отбрасывали, а клетки ресуспендировали в 1 мл (колонка MS) или 3 мл (колонка LS) физиологического солевого раствора (1 % HSA), добавляли клеточную суспензию в каждую разделительную колонку (количество разделительной колонки определяли по количеству частей пуповинной крови и

количеству клеток); центрифужную пробирку промывали 1 мл (колонка MS) или 3 мл (колонка LS) физиологического солевого раствора (1 % HSA) и добавляли промывочный раствор в колонку.

Колонку MC или колонку LS промывали 1 мл (колонка MS) или 3 мл (колонка LS) физиологического раствора (1 % HSA); повторяли 3 раза. Сортировочную колонку переносили в верхнюю часть новой центрифужной пробирки емкостью 15 мл, добавляли 2 мл (колонка MS) или 3 мл (колонка LS) физиологического раствора (1 % HSA) для элюирования клеток-мишеней, а затем добавляли 1 мл (колонка MS) или 2 мл (колонка LS) физиологического раствора (1 % HSA) для повторного элюирования клеток-мишеней. 20 мкл клеточной суспензии отбирали для подсчета в счетчике клеток (Nexcelom, модель: Cellometer K2), а оставшуюся клеточную суспензию центрифугировали при 400 g в течение 5 мин, не полностью отбрасывали надосадочную жидкость для сохранения 1 мл надосадочной жидкости и ресуспендировали клетки. Отбирали новую колонку MC для добавления 1 мл физиологического раствора (1 % HSA) для его промывания, переносили клеточную суспензию ресуспендированных клеток в колонку MS, повторяли вышеуказанные этапы промывки и элюирования для получения 3 мл целевой клеточной суспензии. 20 мкл клеточной суспензии брали для подсчета в счетчике клеток (Nexcelom, модель: Cellometer K2), вычисляли общее количество клеток в соответствии с плотностью клеток и объемом клеточной суспензии; оставшуюся клеточную суспензию центрифугировали при 400 g в течение 5 мин, отбирали супернатант для последующего использования.

Пример 2: Тестирование концентрации и скрининг низкомолекулярного ингибитора

Маточный раствор низкомолекулярного ингибитора готовят в соответствии с растворимостью и требуемым растворителем, указанным в инструкции к продукту низкомолекулярного ингибитора (см. таблицу 1 для кат. № низкомолекулярного ингибитора). Затем готовили базальную среду: среду SFEMII (стволовая клетка, кат. № 09655) плюс 50 нг/мл фактора роста Flt-3L (PeProtech, кат. № 300-100UG) плюс 50 нг/мл фактора роста SCF (PeProtech, кат. № 300-07-100UG) плюс 50 нг/мл фактора роста TPO (PeProtech, кат. № 300-18-100UG) плюс 10 нг/мл фактора роста IL-6 (PeProtech, кат. № 200-06-20UG) плюс 1 % двойное антитело (HyClone, кат. № sv30010). Культуральные среды,

содержащие различные концентрации низкомолекулярного ингибитора, готовили в соответствии с заданным градиентом концентрации низкомолекулярного ингибитора с использованием маточного раствора и базальной среды.

Сначала полученную среду добавляли в 24-луночный планшет (Corning, кат. № 3473), 950 мкл на лунку, помещали его в инкубатор с диоксидом углерода (Thermo, модель: 3111) для предварительного нагревания; запасные HSC, полученные в Примере 1, ресуспендировали с SFEMII плюс 50 нг/мл Flt-3L плюс 50 нг/мл SCF плюс 50 нг/мл TPO плюс 10 нг/мл IL-6 плюс 1 % двойного антитела, объем добавляемой среды рассчитывали в соответствии с 50 мкл клеточной суспензии на лунку и 2×10^5 /мл клеточной плотности на лунку. Например, конечный объем клеточной культуральной среды на лунку составляет 1 мл, общее количество клеток на лунку составляет 2×10^5 клеток, рассчитанных в соответствии с плотностью клеток на лунку, и плотность 50 мкл клеточной суспензии, добавленной в каждую лунку, составляет 4×10^6 /мл, доводили плотность запасных HSC, полученных в Примере 1, до расчетной плотности клеточной суспензии для добавления ; предварительно нагретую среду извлекали из инкубатора, добавляли 50 мкл клеточной суспензии в каждую лунку, и после хорошего перемешивания наблюдали за состоянием клеток под микроскопом (OLYMPUS, модель: CKX53), а затем помещали их в инкубатор для культивирования.

Таблица 1: Низкомолекулярные ингибиторы

Кат. № (Следующее от Selleck)	Название низкомолекулярного ингибитора	Путь действия/цель
S1021	Дазатиниб (Dasa)	Src, c-kit, Abl
S2391	Кверцетин	Сиртуин, Src, PKC, PI3K
S8706	UM-164	Src, P38 α/β
S2700	KX2-391	Src
S6500	KX1-004	Src
S1047	SAHA	HDAC
S1999	Бутират натрия	HDAC

S3944	Вальпроевая кислота (VPA)	HDAC
S7595	Сантакрузамат A(SIS3 Hcl)	HDAC
S7085	IWP-2	Porcn в сигнальном пути Wnt
S7086	IWR-1-endo	Сигнальный путь Wnt
S8007	VE821	ATR
S7050	AZ-20	ATR
S7079	SGC 0946	метилтрансфераза DOT1L
S7353	EPZ004777	метилтрансфераза DOT1L
S7307	GSK2606414	EIF2AK3 (PERK, протеинкиназа R-подобная киназа эндоплазматического ретикулума)
S7400	ISRIB (транс-изомер)	PERK
S2924	CHIR-99021 (CT99021) HCl	GSK3 α/β (киназа гликогенсинтазы)
S2621	AZD5438	CDK1/2/9 (циклин-зависимые киназы1/2/9)
S4901	JNK-IN-8	Сигнальный путь JNK
S7508	Ингибитор JNK IX	Сигнальный путь JNK
s7483	DMOG	пролилгидроксилаза HIF
s1623	Ацетилцистеин	ROS (активные формы кислорода) TNF α (фактор некроза опухоли)
S3114	Витамин С	ROS
s5433	Сукцинат натрия	ROS
s2284	Колхицин	полимеризация микротрубочек
s2775	Нокодазол	полимеризация микротрубочек, Abl
S4505	Винбластина сульфат	образование микротрубочек,

		nAChR (субъединичный никотиновый ацетилхолиновый рецептор)
S3633	Пирролидиндитиокарбамат аммония	NF-κB
S4073	4-аминосалицилат(S-4-A) натрия	NF-κB
S1067	SB431542	TGFβRI/ALK5
S1459	Тиазовивин	ROCK (Rho-ассоциированная киназа)
S1049	Y27632	ROCK (Rho-ассоциированная киназа)
S1076	SB203580	P38 MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа)
S2449	Форсколин	Активатор цАМФ
S7858	Дибутирил-цАМФ (Букладезин)	РКА (цАМФ-зависимая протеинкиназа А)
s1907	Метронидазол	Синтез ДНК
S1992	Флутиказона пропионат (FLU)	Глюкокортикоидный рецептор
s2250	(-)-эпигаллокатехингаллат	теломераза, ДНК-метилтрансфераза
s2923	Салубринал	eIF2α
s3925	(-)-эпикатехингаллат	VEGFR2 (фактор роста эндотелия сосудов 2)
S4991	Вальпромид	Производное VPA, мишень неизвестна
S7120	3-деазанпаноцин А	S-аденозилгомоцистеингидролаза,

	(DZNeP) HCl	гистонметилтрансфераза
S7315	PFI-3	PB1(5) бромодомены, SMARCA4/2A/2B
S7608	UM171	неизвестно
S8287	CPI-455 HCl	KDM5 (гистондеметилаза)
s8615	Натрия дихлорацетат (DCA)	PK4/2 (киназа пируватдегидрогеназы)
S5742	Дефероксамина мезилат	неизвестно
S2858	SR1	AHR (рецептор арильных углеводородов)
S4757	Дигидротестостерон (DHT)	Рецептор андрогена
S8280	IMR-1	Сигнальный путь Notch
S2915	GW9662	PPAR γ (рецептор, активируемый пролифератором пероксисом)
S3003	PGE2	Сигнальный путь Wnt
S1055	Энзастаурин	PKC (протеинкиназа C)
S2911	Go 6983	PKC
s2776	CPI-613	PDH (пируватдегидрогеназа), α -кетоглутаратдегидрогеназа

Пример 3: Обнаружение стволовости HSC и поддержания CD34⁺ с помощью проточной цитометрии

Антитела, используемые в этом примере, и их источники показаны в таблице 2.

Таблица 2: Антитела

Название антитела	Производитель	Кат. №
APC/Cy7 к CD45 человека	Biolegend	304014
APC к CD38 человека	Biolegend	356606
Brilliant Violet 510™ к CD34 человека	Biolegend	343528

PE к CD90 человека (Thy1)	Biolegend	328110
FITC к CD45RA человека	Biolegend	304106
APC IgG2a мыши, к изотип Ctrl	Biolegend	400220
APC/Cyanine7 IgG1 мыши, к изотип Ctrl	Biolegend	400128
PE IgG2a мыши, к изотип Ctrl	Biolegend	400212
FITC IgG2b мыши, к изотип Ctrl	Biolegend	402208
Brilliant Violet 510™ IgG2a мыши, к Isotype Ctrl	Biolegend	400268

Для подсчета брали 20 мкл клеток, культивированных в течение 6-7 дней (D6-D7) в вышеприведенном примере 2, и суспензию 2×10^5 клеток добавляли в 1,5 мл центрифужную пробирку в соответствии с результатом подсчета; центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и отбрасывали супернатант. 100 мкл PBS (фосфатно-солевой буферный раствор, HyClone, кат. № SH30256.01), содержащий 1 % ЧСА (человеческий сывороточный альбумин, Guangdong Shuanglin, кат. № S10970069) брали для ресуспендирования клеток, хорошо перемешивали на вихревой мешалке для последующего использования. Затем собирали контрольный образец клеток, количество клеток и метод сбора такие же, как и у клеток испытуемого образца. Контрольные клетки устанавливали в качестве группы NC и группы ISO соответственно, а клетки выбирали из любого образца или образцов смешанных клеток, подлежащих испытанию в данной серии экспериментов, в зависимости от количества клеток. В одной и той же серии экспериментов каждая контрольная группа не имеет повторного обнаружения. Параметры группы см. в таблице 3.

Таблица 3: Параметры группы

Группа	Количество клеток	Название добавленного антитела	Количество антител
NC	2×10^5	--	--
ISO	2×10^5	APC IgG2a мыши, к изотип Ctrl	2 мкл
		APC/Cyanine7 IgG1 мыши, к изотип Ctrl	2 мкл
		PE IgG2a мыши, к изотип Ctrl	2 мкл
		FITC IgG2b мыши, к изотип Ctrl	2 мкл

		Brilliant Violet 510™ IgG2a мыши, к Isotype Ctrl	2 мкл
FMO38	2×10 ⁵	APC/Cy7 к CD45 человека	2 мкл
		Brilliant Violet 510™ к CD34 человека	2 мкл
		PE к CD90 человека (Thy1)	2 мкл
		FITC к CD45RA человека	2 мкл
FMO90	2×10 ⁵	APC/Cy7 к CD45 человека	2 мкл
		APC к CD38 человека	2 мкл
		Brilliant Violet 510™ к CD34 человека	2 мкл
		FITC к CD45RA человека	2 мкл
образец	2×10 ⁵	APC/Cy7 к CD45 человека	2 мкл
		APC к CD38 человека	2 мкл
		Brilliant Violet 510™ к CD34 человека	2 мкл
		PE к CD90 человека (Thy1)	2 мкл
		FITC к CD45RA человека	2 мкл

В соответствии с таблицей 3 выше, антитела соответственно добавляли по группам в клеточные суспензии вышеупомянутых образцов клеток для тестирования и контрольные образцы клеток перемешивали на вортексе для хорошего перемешивания и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте. После 15-минутной инкубации к каждому экспериментальному образцу добавляли 1 мл PBS, содержащего 1 % HSA для хорошего перемешивания, центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант отбрасывали, а клетки ресуспендировали в 100 мкл PBS, содержащего 1 % HSA для каждого экспериментального образца, хранили образцы при комнатной температуре вдали от света перед тестированием. Для детекции клеток использовали проточную цитометрию.

Результаты тестирования анализировали следующим образом: 1) популяция клеток-мишеней представляет собой популяцию клеток CD34+CD45+CD45RA-CD90+CD38-; 2) определение стратегии гейтирования и положения гейта показано на фиг. 1: во-первых, определение популяции клеток, гейт P1; удаление адгезивных клеток в популяции клеток, полученных из гейта P1 (гейт P2); определение популяции клеток, отрицательных по CD34,

CD45, CD45RA, в популяции клеток, полученных из гейта P2, с помощью NC или ISO (гейт Q3-LL (CD34-/CD45-)), гейт Q5-UL плюс Q5-LL (CD45RA-); определение популяции клеток, отрицательных по CD90 с помощью FMO90 (гейт Q5-LL плюс Q5-LR); определение популяции клеток, отрицательных по CD38, с помощью FMO38 (гейт Q6-LR); с использованием гейтов, отделенных с помощью NC, ISO и FMO, определяли, что клетки, отделенные гейтами Q3-UR—Q5-UL—Q6-LR, представляют собой клетки-мишени CD34+CD45RA-CD38+CD38-.

Пример 4: Скрининг одной молекулы

На клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, отсортированных в Примере 1, оптимальные концентрации низкомолекулярных ингибиторов и способность поддерживать стволовость HSC подвергали скринингу в соответствии с тем же способом, что и в Примере 2. Через 6-7 дней низкомолекулярной индукции экспрессию маркеров клеточной поверхности (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-) долгосрочных гемопоэтических стволовых клеток (LT-HSC) обнаруживали с помощью проточной цитометрии тем же способом, что и в примере 3.

В этом примере проведено в общей сложности пять раундов скрининга, и ингибиторы и тестовые концентрации для каждого раунда скрининга показаны в Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7 и Таблице 8, а результаты показаны на Фиг. 2-6, соответственно.

Результаты на Фиг. 2 показывают, что SAHA значительно лучше, чем другие ингибиторы из Таблицы 4, в увеличении доли LT-HSC, и он в 2-20 раз эффективнее, чем другие ингибиторы. Когда концентрация SAHA составляли 5 мкМ, под микроскопом наблюдали, что состояние клеток ухудшалось, и наблюдали слабую пролиферации при сравнении количества клеток, поэтому для последующего скрининга выбирали концентрацию 1 мкМ. SAHA (1 мкМ) немного лучше контрольной группы (Mock, 0,01 % DMSO) в поддержании доли CD34+ клеток.

Результаты на фиг. 3 показывают, что по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами UM171, PGE2, SR1, GW9662 и FLU, описанными в известных публикациях в таблице 5 (Fares I, et al. Science.2014; Evans T. Cell Stem Cell. 2009; Boitano A E, et al. Science.2010; Guo B, et al. Nature Medicine. 2018; Guo B, et al. Nature Medicine. 2017), SAHA в

2-20 раз эффективнее, чем заявленные малые молекулы, в поддержании стволовости HSC; и с точки зрения поддержания доли клеток CD34+ нет существенной разницы между SAHA и SR1, но SAHA значительно лучше, чем UM171, PGE2, GW9662 и FLU.

Результаты на фиг. 4 показывают, что уровень SAHA примерно в 2-15 раз выше, чем у других ингибиторов в таблице 6, при поддержании стволовости HSC. В то же время SAHA лучше других ингибиторов в поддержании доли CD34+ клеток.

Результаты на Фиг. 5 демонстрируют, что SAHA значительно лучше, чем другие ингибиторы из Таблицы 7, в поддержании стволовости HSC, и в 1-12 раз эффективнее, чем другие ингибиторы; затем следует энзастаурин, используемый в низких концентрациях, доля LT-HSC в 3-10 раз выше, чем другие ингибиторы (кроме SAHA). С точки зрения поддержания доли CD34+ клеток, JNK-IN-8 может поддерживать долю CD34+ клеток на уровне около 90 %; SAHA и дазатиниб немного лучше, чем другие ингибиторы, за исключением JNK-IN-8.

Результаты на фиг. 6 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости LT-HSC, действие вальпроевой кислоты (VPA) из Таблицы 8 значительно выше, чем у других малых молекул, примерно в 30 раз, и выше, чем у SAHA примерно в 1 раз; SAHA в 15 раз эффективнее, чем другие малые молекулы (за исключением VPA). SAHA и VPA превосходят другие малые молекулы в поддержании доли клеток CD34+.

Подводя итог: в этом примере оценивали в общей сложности 5 малых молекул, которые могут поддерживать стволовость LT-HSC и высокую долю клеток CD34+; и они, соответственно, являются VPA и SAHA, которые нацелены на HDAC, дазатиниб, нацеленный на Src, энзастаурин, нацеленный на PKC, и JNK-IN-8, нацеленный на JNK.

Таблица 4: Первый раунд скрининга

Название низкомолекулярного ингибитора	Тестируемая концентрация
VE821	0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
AZ20	0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
PFI-3	0,2 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
4-аминосалицилат(S-4-A) натрия	0,1 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM

PDTC	1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 50 нМ
SAHA	0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
Сантакрузамат А(SIS3 HCL)	0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
SR1	0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ

Таблица 5: Второй раунд скрининга

Название низкомолекулярного ингибитора	Тестируемая концентрация
SAHA	1 мкМ
SR1	5 мкМ
UM171	350 нМ
PGE2	10 мкМ
GW9662	1 мкМ
FLU	1 мкМ

Таблица 6: Третий раунд скрининга

Название низкомолекулярного ингибитора	Тестируемая концентрация
SAHA	1 мкМ
Витамин С	5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл
EPZ004777	0,5 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
Форсколин	5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ
CPI-455	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
DZNeP	10 нМ, 50 нМ, 250 нМ
CHIR-99021	1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ
Бутират	50 мкМ, 250 мкМ, 500 мкМ,
SB203580	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
IWP-2	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
IWR-1-endo	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ

Ингибитор JNK iX	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
Дибутирил-цАМФ	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
Тиазовивин	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
IMR-1	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
SB431542	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
Кверцетин	0,5 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ

Таблица 7: Четвертый раунд скрининга

Название низкомолекулярного ингибитора	Тестируемая концентрация
SAHA	1 мкМ
Дазатиниб	0,5 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
SGC0496	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
JNK-IN-8	1 мкМ 2 мкМ 10 мкМ
Энзастаурин (LY317615)	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ

Таблица 8: Пятый раунд скрининга

Название низкомолекулярного ингибитора	Тестируемая концентрация
SAHA	1 мкМ
Вальпроевая кислота	100 мкМ 500 мкМ 1000 мкМ
Вальпромид	100 мкМ 500 мкМ 1000 мкМ
AZD5438	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
Go 6983	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
Сукцинат натрия	5 мкМ 10 мкМ 50 мкМ
Натрия дихлорацетат (DCA)	0,1 мМ 1 мМ 5 мМ
Салубринал	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
CPI-613	5 мкМ 10 мкМ 50 мкМ
ISRIB (транс-изомер)	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ

Ацетилцистеин	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
GSK2606414	10 нМ 50 нМ 100 нМ
DMOG	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
Метронидазол	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
DHT	1 нМ 5 нМ 50 нМ
Нокодазол	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
Винбластин сульфат	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
Галлат эпигаллокатехина	1 мкМ 5 мкМ 10 мкМ
Дефероксамина мезилат:	10 нМ 50 нМ 500 нМ
Эпикатехин галлат	10 нМ 50 нМ 500 нМ
Колхицин	50 нМ 500 нМ 1000 нМ
Y27632	5 мкМ 10 мкМ 20 мкМ

Пример 5: Скрининг комбинации двух низкомолекулярных ингибиторов

На клетках CD34⁺, полученных из пуповинной крови, отсортированных в Примере 1, скрининг наилучшей комбинации двух низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC проводили в соответствии с тем же способом, что и в Примере 2. Через 6-7 дней индукции с помощью комбинации низкомолекулярных ингибиторов, экспрессию маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁻CD38⁻) обнаруживали с помощью проточной цитометрии по тому же способу, что и в примере 3.

Низкомолекулярный SAHA, который может значительно поддерживать стволовость HSC, подвергали скринингу в соответствии с вышеприведенным примером 4, соответственно, комбинировали с другими ингибиторами. Конкретная комбинация и ее концентрация показаны на соответствующих чертежах, а результаты показаны на фиг. 7-11, соответственно.

Результаты на фиг. 7 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC и доли клеток CD34⁺, комбинации SAHA и 4-х ингибиторов клеточных сигнальных путей из Таблицы 4, которые связаны с размножением гемопоэтических стволовых клеток, то есть SAHA с SR1, SAHA и VE821, SAHA и PFI-3, а также SAHA и S-4-A, не значительно лучше, чем только SAHA.

Результаты на фиг. 8 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC, каждый из ингибиторов, указанных в вышеупомянутых литературных источниках, а именно ингибиторы SR1, UM171, PGE2, GW9662 и FLU из Таблицы 5, является гораздо менее эффективным, чем SAHA при использовании отдельно, и комбинация каждого из них с SAHA также менее эффективна, чем отдельно SAHA. Также нет существенной разницы между SAHA отдельно и комбинацией каждого из этих ингибиторов с SAHA в поддержании доли клеток CD34+.

Результаты на фиг. 9 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC в комбинации SAHA с бутиратом из таблицы 6 эффект низкой концентрации бутирата не так хорош, как эффект только SAHA; и действие высокой концентрации бутирата лучше, чем действие только SAHA, но в условиях высокой концентрации бутират является высокотоксичным для клеток; и результаты, полученные в примере 4, показывают, что эффект только бутирата не так хорош, как эффект только SAHA, и бутират является тем же ингибитором мишени, что и SAHA, поэтому дальнейшие исследования бутирата не будут проводиться в будущем. SAHA соответственно комбинировали с EPZ004777 и DZNeP из таблицы 6, и указанные комбинации, то есть SAHA с EPZ004777, и SAHA с DZNeP, лучше, чем только SAHA. Эти комбинации двух низкомолекулярных ингибиторов незначительно отличаются от SAHA, взятого отдельно, в поддержании доли CD34+ клеток. Следовательно, результат скрининга показывает, что комбинации SAHA с EPZ004777 и SAHA с DZNeP хорошо поддерживают стволовость HSC и долю CD34+ клеток.

Результаты на фиг. 10 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC, как и для комбинаций SAHA с каждым из 4-х низкомолекулярных ингибиторов из Таблицы 7, комбинации SAHA с дазатинибом и SAHA с JNK-IN-8 являются в 3 раза более эффективными, чем только SAHA, в 30 раз более эффективными, чем группа Mock. С точки зрения поддержания доли клеток CD34+, эффективность комбинации SAHA с дазатинибом и SAHA с JNK-IN-8 не имеет существенной разницы с эффективностью SAHA отдельно, она 5-10 % выше, чем эффективность группы Mock. Комбинация низкомолекулярного энзастаурина (который может лучше поддерживать стволовость LT-HSC в одномолекулярном скрининге) с SAHA гораздо менее эффективна, чем только SAHA, поэтому дальнейшие исследования комбинации энзастаурина и SAHA не проводили. Таким

образом, результаты скрининга показывают, что комбинации SAHA с дазатинибом и SAHA с JNK-IN-8 более эффективны в поддержании стволовости HSC и доли CD34+ клеток.

Результаты на фиг. 11 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости, как для комбинации SAHA с VPA из Таблицы 8, эффективность комбинации SAHA с VPA выше, чем только SAHA в 2-4 раза, и выше, чем группы Mock в 20 раз. С точки зрения поддержания доли CD34+ клеток, комбинация SAHA с VPA не имеет существенной разницы с только SAHA, и ее эффективность выше, чем группы Mock на 10-20 %.

Таким образом, при скрининге комбинации двух низкомолекулярных ингибиторов комбинации, которые могут поддерживать стволовость LT-HSC и долю CD34+ клеток, оценивали следующим образом: SAHA с дазатинибом, SAHA с DZNeP, SAHA с EPZ004777, SAHA с JNK-IN-8 и SAHA с VPA.

Пример 6: Скрининг комбинации трех низкомолекулярных ингибиторов

На клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, отсортированных в Примере 1, скрининг наилучшей комбинации двух низкомолекулярных ингибиторов для поддержания стволовости HSC проводят в соответствии с тем же способом, что и в Примере 2. Через 6-7 дней индукции с помощью комбинации низкомолекулярных ингибиторов, экспрессию маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-) обнаруживали с помощью проточной цитометрии по тому же способу, что и в примере 3.

(1) Комбинации SAHA с EPZ004777 и SAHA с DZNeP, исследованные в примере 5 (которые могут поддерживать стволовость HSC), комбинировали в группу их трех низкомолекулярных ингибиторов, и результаты показаны на фиг. 12.

Результаты на фиг. 12 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC, комбинация трех низкомолекулярных ингибиторов, то есть SAHA плюс EPZ004777 плюс DZNeP, примерно в 20 раз более эффективна, чем группа Mock, примерно в 2 раза более эффективна, чем только SAHA и комбинация двух низкомолекулярных ингибиторов, то есть, SAHA плюс EPZ004777, и немного более эффективна, чем комбинация двух низкомолекулярных ингибиторов, то есть, SAHA плюс DZNeP. С точки зрения поддержания доли CD34+ клеток, комбинация трех низкомолекулярных ингибиторов и комбинация двух

низкомолекулярных ингибиторов имеют существенные различия с группой Mock, а доля CD34+ клеток составляет около 80 %.

(2) Комбинации SAHA плюс EPZ004777, SAHA плюс DZNeP, SAHA плюс JNK-IN-8 и SAHA плюс дазатиниб, исследованные в Примере 5 (которые могут поддерживать стволовость HSC), подвергали комбинации трех низкомолекулярных ингибиторов, и результаты показаны на фиг. 13 и фиг. 14, соответственно.

Результаты на фиг. 13 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC, комбинация SAHA плюс JNK-IN8 не так эффективна, как SAHA плюс дазатиниб, поэтому дальнейшие исследования SAHA плюс JNK-IN8 проводиться не будут. Между препаратами SAHA плюс дазатиниб плюс EPZ004777 и SAHA плюс дазатиниб нет существенных различий, а другие комбинации трех низкомолекулярных ингибиторов не столь эффективны, как SAHA плюс дазатиниб для поддержания стволовости LT-HSC. С точки зрения поддержания доли CD34+ клеток, SAHA плюс дазатиниб поддерживает долю CD34+ клеток на уровне около 80 %.

Результаты на фиг. 14 показывают, что комбинации двух низкомолекулярных ингибиторов, т.е., SAHA плюс дазатиниб и SAHA плюс VPA, исследованные в Примере 5 (которые могут поддерживать стволовость HSC), рекомбинированы. С точки зрения поддержания стволовости HSC, комбинация трех низкомолекулярных ингибиторов, то есть SAHA плюс VPA плюс дазатиниб, в 50 раз эффективнее, чем группа Mock и в 1,5-2 раза эффективнее, чем комбинация двух низкомолекулярных ингибиторов. С точки зрения поддержания доли CD34+ клеток, эффект комбинации трех низкомолекулярных ингибиторов, то есть, SAHA плюс VPA плюс дазатиниб, выше, чем у группы Mock на 20 %.

Подводя итог, с точки зрения поддержания стволовости LT-HSC, большинство комбинаций трех низкомолекулярных ингибиторов не так эффективны, как комбинация двух низкомолекулярных ингибиторов, то есть, SAHA плюс дазатиниб; в то время как среди комбинаций трех низкомолекулярных ингибиторов лучшими комбинациями являются SAHA плюс EPZ004777 плюс DZNeP и SAHA плюс дазатиниб плюс VPA.

Пример 7: Сравнение между ингибитором, используемым отдельно, и ингибиторами, используемыми в комбинации для скрининга ингибиторов SAHA, VPA и дазатиниба и ингибиторов UM171 и SR1, раскрытых в уровне техники

На клетках CD34⁺ пуповинной крови, отсортированных в примере 1, в соответствии с тем же способом, что и в примере 2, проводили сравнение между ингибитором, используемым отдельно, и ингибиторами, используемыми в комбинации для скрининга ингибиторов SAHA, VPA и дазатиниба, и ингибиторами UM171 и SR1, описанных в уровне техники (Fares I, et al. Science.2014; Boitano A E, et al. Science.2010). Через 6-7 дней индукции низкомолекулярным ингибитором (-ами) экспрессию маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁺CD38⁻) обнаруживали с помощью проточной цитометрии в соответствии с тем же способом, что и в примере 3; и результаты показаны на фиг. 15.

Результаты на фиг. 15 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости HSC, когда небольшие молекулы используются отдельно, эффект SAHA или VPA выше, чем у SR1 или UM171 в 2-5 раз. В комбинациях двух низкомолекулярных ингибиторов действие SAHA плюс дасатиниб или VPA плюс дасатиниб выше, чем у SAHA плюс SR1 или SAHA плюс UM171 в 1,5-2 раза. Эффективность комбинации трех низкомолекулярных ингибиторов, то есть, SAHA плюс DZNeP плюс EPZ004777, немного ниже, чем у SAHA плюс дазатиниба и VPA плюс дазатиниба. С точки зрения поддержания доли CD34⁺ клеток, нет существенной разницы между одним низкомолекулярным ингибитором SAHA или VPA и комбинацией двух низкомолекулярных ингибиторов, то есть SAHA плюс дазатиниб или VPA плюс дасатиниб, и доля CD34⁺ клеток составляет около 80 %.

Подводя итог, с точки зрения поддержания стволовости LT-HSC и доли клеток CD34⁺, комбинация двух низкомолекулярных ингибиторов, т.е. SAHA плюс дасатиниб или VPA плюс дасатиниб, является более эффективной, чем низкомолекулярный ингибитор, используемый отдельно, комбинация двух низкомолекулярных ингибиторов, т.е. SAHA плюс SR1 или SAHA плюс UM171, и комбинация трех низкомолекулярных ингибиторов, т.е. SAHA плюс DZNeP плюс EPZ004777.

Пример 8: Образование и культивирование колоний гемопоэтических стволовых клеток CD34+

В этом примере качественные и количественные определения выполняли с использованием колониеобразующей единицы (КОЕ) для детектирования *in vitro* функционирования гемопоэтических стволовых клеток, полученных из пуповинной крови, после индукции низкомолекулярным ингибитором, тем самым проверяя потенциал дифференцировки *in vitro*.

Во-первых, 100 мл MethoCult™ H4034 Optimum (стволовая клетка, кат. № 04034) разделяли на аликвоты, затем размораживали при 2-8 °C в течение ночи; энергично встряхивали в течение 1-2 мин и оставляли в течение 10 мин до тех пор, пока пузырьки не поднимутся до уровня жидкости. После плотного прилегания иглы шприца объемом 50 мл к одноразовому шприцу объемом 5 мл, среду аспирировали до объема 1 мл, выталкивали шприц полностью, чтобы выпустить газ из шприца, и повторно вносили 3 мл в каждую центрифужную пробирку объемом 15 мл (Corning, кат. № 430791); хранили при температуре 2-8 °C в течение 1 месяца и при -20 °C в течение длительного времени. Не замораживали и не размораживали повторно.

Готовили 3 мл среды MethoCult™ H4034 Optimum, затем размораживали в течение ночи при комнатной температуре (15-25 °C) или 2-8 °C.

Осуществляли посев клеток. Суспензию клеток, прошедшей 7-дневный период размножения и культивирования после индукции низкомолекулярным ингибитором (-ами) (CD34+ гемопоэтические стволовые клетки, полученные из пуповинной крови, после индукции низкомолекулярным ингибитором (-ами)), отбирали для подсчета клеток, затем аспирировали суспензию клеток при 100-кратной плотности посева по результатам подсчета (например, плотность посева составляет 100 клеток/лунку/3 мл, и следует собрать 10000 клеток), добавляли к 1 мл 2 % FBS (Gibco, кат. № 16000-044)-IMDM (Gibco, кат. № 12440-053) среду хорошо перемешивали для использования. После смешивания вышеуказанных клеток 50 мкл клеточной суспензии аспирировали в 0,5 мл IMDM (среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков) (2 % FBS) для ресуспендирования клеток (эквивалентно 10-кратному разведению клеточной суспензии). После хорошего перемешивания отбирали 100 мкл клеточной суспензии (100 клеток) для добавления в 3 мл

MethoCultTMH4034 Optimum; перемешивали на вортексе в течение не менее 4 с и выдерживали в течение 10 мин до тех пор, пока пузырьки не поднимутся до уровня жидкости. 3 куб. см шприцы (Stemcell, кат. № 28240) использовали в сочетании с иглами с тупым концом калибра 16 (Stemcell, кат. № 28110), чтобы аспирировать полученную клеточную суспензию до 1 мл, затем вытолкнуть ее из шприца, чтобы выпустить газ из шприца, и повторно абсорбировать всю полученную клеточную суспензию, чтобы ввести 3 мл в одну лунку SmsrtDishTM-6 (Stemcell, кат. № 27370, 6-луночный планшет) и медленно наклоняли 6-луночный планшет так, чтобы клеточная суспензия равномерно покрывала дно лунки. После инокулировали всех клетки, как описано выше, в промежутки между лунками 6-луночного планшета добавляли 3 мл стерильного PBS для предотвращения высыхания среды. 6-луночный планшет закрывали крышкой, затем помещали планшет в инкубатор с диоксидом углерода (Thermo, модель: 3111) для культивирования в течение 14 дней при 37 °C, 5 % CO₂ и 95 % относительной влажности.

Колонии наблюдали на 7-й и 14-й день культивирования, и колонии подсчитывали с помощью счетной сетки STEMgridTM-6 (Stemcell, кат. № 27000) после культивирования в течение 14 дней. Критерии для определения колоний следующие (различные типы колоний могут отражать способность HSC формировать колонии и поддерживать стволовость):

CFU-GEMM (CFU-G, CFU-E, CFU-MM): гранулоцитарно-эритроцитарно-макрофагально-мегакариоцитарная колониеобразующая единица. Колония содержит эритроциты и 20 или более незритроцитов (гранулоциты, макрофаги и/или мегакариоциты), обычно эритроциты расположены в центре колонии и окружены незритроцитами, и незритроциты также могут быть сконцентрированы на одной стороне эритроцитов. Как правило, колонии CFU-GEMM больше, чем колонии CFU-GM или BFU-E (эритроцитарная бурстообразующая единица), и они редко встречаются в большинстве образцов клеток (обычно 10 % от общего количества колоний).

CFU-GM: колония содержит более 20 гранулоцитов (CFU-G) и/или макрофагов (CFU-M). Пока клетки не окрашены в красный или коричневый, отдельные клетки в пределах колонии часто различимы, особенно на краю колонии, и большая колония может иметь одно или более плотных темных ядер. Эритропоэтин (EPO) не требуется для роста и дифференциации этой колонии.

BFU-E: эритроцитарная бурстообразующая единица образует колонии, состоящие из одного или нескольких кластеров клеток, каждая из которых содержит больше 200 зрелых эритроцитов. Когда клетки насыщены гемоглобином, они выглядят красными или коричневыми, что затрудняет различение отдельных клеток в каждом кластере, BFU-E представляют собой более незрелые клетки-предшественники, для роста которых требуется эритропоэтин (EPO) и другие цитокины, особенно интерлейкин 3 (IL-3) и фактор стволовых клеток (SCF) для оптимального роста их колоний.

CFU-E: эритроцитарная колониеобразующая единица, которая может образовывать 1-2 клеточных кластера, содержащих 8-200 эритроцитов, при гемоглобинизации клеток они выглядят красными или коричневыми, что затрудняет различение отдельных клеток внутри колонии. CFU-E являются предшественниками зрелой эритроидной линии, и им необходим эритропоэтин (EPO) для стимулирования их дифференцировки.

Пример 9: Сравнение клоногенной способности *in vitro* между ингибитором, используемым отдельно, и ингибиторами, используемыми в комбинации для скрининга ингибиторов SAHA, VPA и дазатиниба и ингибиторов UM171 и SR1, раскрытых в уровне техники

Сравнение клоногенной способности *in vitro* между ингибитором, используемым отдельно, и ингибиторами, используемыми в комбинации, для скрининга ингибиторов SAHA, VPA и дазатиниба и ингибиторов UM171 и SR1, раскрытых в уровне техники, проводили на клетках CD34+ пуповинной крови, отсортированных в примере 1. Образование клона *in vitro* (КОЕ) детектировали тем же способом, что и в примере 8, после индукции клеток низкомолекулярными ингибиторами в течение 7 дней, и количество клонов подсчитывали через 14 дней после инокуляции клеток, и анализировали CFU-GEMM. Результаты показаны на фиг. 16, где BFU-E, CFU-E, CFU-GM и CFU-GEMM представляют собой клоны различных линий крови, таких как эритроидная, миелоидная и лимфоидная.

Результаты на фиг. 16 показывают, что с точки зрения общего количества клонов комбинация VPA плюс дазатиниб является значительно более эффективной, чем другие комбинации. С точки зрения количества клонов GEMM, образованных дифференцировкой LT-HSC, комбинация VPA плюс дазатиниб значительно более эффективна, чем

низкомолекулярные ингибиторы, раскрытые в уровне техники (Fares I, et al. Science.2014; Boitano A E, et al. Science.2010;), когда ингибитор используется отдельно или в комбинации с SAHA (т.е. более эффективен, чем SR1, UM171, SAHA плюс SR1, SAHA плюс UM171). С точки зрения общего количества клонов или клонов GEMM, SAHA плюс дазатиниб более эффективен, чем VPA плюс дазатиниб, и SAHA плюс DZNeP плюс EPZ004777 значительно уступает VPA плюс дазатиниб и SAHA плюс дазатиниб.

В заключение, с точки зрения клоногенной способности *in vitro*, комбинации VPA плюс дазатиниб и SAHA плюс дазатиниб превосходят низкомолекулярные SR1, UM171, раскрытые в уровне техники, когда ингибитор используется отдельно или в комбинации с SAHA.

Пример 10: Верификация действия ингибиторов пути Src

На клетках CD34⁺ пуповинной крови, отсортированных в примере 1, скрининг других низкомолекулярных ингибиторов, нацеленных на Src, проводили тем же способом, что и в примере 2. Через 6-7 дней индукции с помощью комбинации низкомолекулярных ингибиторов, экспрессию маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁻CD38⁻) обнаруживали с помощью проточной цитометрии тем же способом, что и в примере 3. Результаты показаны на фиг. 17, где низкомолекулярные ингибиторы и концентрации, исследованные в этом цикле, показаны в таблице 9.

Таблица 9: Ингибиторы пути Src и выбранные концентрации

Наименование низкомолекулярного ингибитора	Испытываемая концентрация
SAHA	1 мкМ
UM-164	1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ
KX2-391	10 нМ, 50 нМ, 100 нМ
KX1-004	10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ

Результаты на фиг. 17 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости LT-HSC, ингибитор UM-164, нацеленный на Src, в 5 раз более эффективен, чем SAHA, и действие другого ингибитора KX1-004, нацеленного на Src, существенно не отличается от действия SAHA. С точки зрения поддержания доли CD34⁺ клеток, между UM164 и SAHA нет существенной разницы, и доля CD34⁺ клеток поддерживается на уровне около 80 %. Вышеуказанные результаты показывают, что Src в качестве новой мишени играет важную роль в поддержании стволовости HSC. В сочетании с ингибиторами, нацеленными на HDAC, эффект ингибиторов, нацеленных на Src, дополнительно усиливается в отношении поддержания стволовости HSC и стимулировании размножения HSC.

Пример 11: Сравнение *in vitro* размножения и способности поддерживать стволовость гемопоэтических стволовых клеток для скрининга ингибитора дазатиниба и ингибиторов UM171 и SR1, раскрытых в уровне техники

На клетках CD34⁺, полученных из пуповинной крови, отсортированных в Примере 1, проводили сравнение размножения *in vitro* и способности поддерживать стволовость гемопоэтических стволовых клеток для скрининга ингибитора дазатиниба и ингибиторов UM171 и SR1, раскрытых в литературных источниках. Через 6-8 дней индукции низкомолекулярным ингибитором экспрессию маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34⁺CD45⁺CD90⁺CD45RA⁺CD38⁻) обнаруживали с помощью проточной цитометрии в соответствии с тем же способом, что и в Примере 3. 20 мкл клеточной суспензии берут соответственно на 2, 4, 6 и 8 день культивирования для подсчета в счетчике клеток (Nexcelom, модель: Cellometer K2), рассчитывали окончательное абсолютное количество CD34⁺ клеток и LT клеток на 8 день (абсолютное количество клеток = доля клеток × общее количество клеток), результаты показаны на Фиг. 18.

Результаты на фиг. 18 показывают, что с точки зрения поддержания стволовости дазатиниб значительно лучше, чем SR1 и UM171, в частности, дазатиниб примерно в 1,2 раза эффективнее, чем SR1, и примерно в 2,8 раза эффективнее, чем UM171. Абсолютное количество LT-клеток в группе дазатиниба незначительно лучше, чем в группе SR1, и аналогично таковому в группе UM171. Что касается поддержания доли CD34⁺ клеток, то после обработки дазатинибом в течение 8 дней доля CD34⁺ клеток поддерживается на

уровне около 40 %, в то время как в группе SR1 она поддерживается на уровне около 65 %, а в группе UM171 - на уровне около 40 %. Таким образом, абсолютное количество CD34+ клеток в группе дазатиниба не значительно лучше, чем в группе SR1 и группе UM171.

Пример 12: Проверка влияния на трансплантацию *in vivo* гемопоэтических стволовых клеток исследованных ингибитора дазатиниба и ингибитора SR1, раскрытого в уровне техники

На клетках CD34+, полученных из пуповинной крови, отсортированных в примере 1, выполняли сравнение способности к восстановлению гемопоэтической системы *in vivo* между исследованными низкомолекулярным ингибитором дазатинибом и ингибитором SR1, раскрытым в уровне техники, которые использовали отдельно. Концентрации и группы низкомолекулярных ингибиторов, используемые в этом примере, показаны в таблице 10.

Таблица 10. Концентрации низкомолекулярных ингибиторов

Группа	Концентрация низкомолекулярного ингибитора
Mock	—
SR1	5 мкМ
Дазатиниб	50 нМ

Получение среды для культивирования клеток: как для среды SFEMII плюс 50 нг/мл фактора роста Flt-3L, плюс 50 нг/мл фактора роста SCF, плюс 50 нг/мл фактора роста TPO, плюс 10 нг/мл фактора роста IL-6, плюс 1 % двойного антитела, каталожные номера используемой среды, факторов роста и двойных антител и т.д. являются такими же, как описано в примере 2. Различные низкомолекулярные ингибиторы добавляли в соответствии с группами, указанными в Таблице 10.

Полученную среду для культивирования клеток добавляли в 24-луночный планшет, 950 мкл на лунку, затем помещали в инкубатор с диоксидом углерода для предварительного нагрева; полученные HSC в примере 1 ресуспендировали в SFEMII плюс 50 нг/мл Flt-3L, плюс 50 нг/мл SCF, плюс 50 нг/мл TPO, плюс 10 нг/мл IL-6, плюс 1 % двойного антитела,

затем вычисляли объем добавленной среды в соответствии с 50 мкл клеточной суспензии на лунку и плотностью клеток на лунку $1 \times 10^5/\text{мл}$; извлекали предварительно нагретую среду из инкубатора, добавляли 50 мкл клеточной суспензии в каждую лунку для хорошего перемешивания и наблюдали за состоянием клеток под микроскопом, а затем помещали ее в инкубатор для культивирования. Количество исходных культивируемых клеток для трансплантации у каждой мыши составляло $1 \times 10^5/\text{мышь}$, и клеток, размноженных в каждой лунке 24-луночного планшета, достаточно для трансплантации у одной мыши. Во время процесса культивирования клетки подсчитывали через день, способ подсчета и счетчик клеток были такими же, как в Примере 1, при этом плотность клеток не превышала $8 \times 10^5/\text{мл}$. Если клеток слишком много, они должны быть вовремя разделены в лунке и должна быть добавлена свежая среда.

Экспрессию маркеров клеточной поверхности LT-HSC (CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38-) детектировали в соответствии с тем же способом, что и в примере 3, после обработки клеток низкомолекулярным ингибитором в течение 7 дней.

Мышей готовили по 8 мышей на группу. Мышей покупали у Beijing Weitongda Biotechnology Co., Ltd., штамм NPG (NOD-Prkdc^{scid}112rg^{null}/Vst), 6-недельных самок мышей, и разницу массы тела между мышами контролировали в пределах 3 г. Мышей облучали полуживой дозой перед трансплантацией клеток, а доза облучения составляла 1,6 Гр.

Культированную клеточную суспензию (исходное количество культуральных клеток составляет $1 \times 10^5/\text{мл}$) собирали для центрифугирования при 400 g в течение 5 минут, отбрасывали супернатант, затем ресуспендировали клетки 100 мкл физиологического раствора (1 % HSA) и вводили клетки облученным мышам NPG через хвостовую вену, помечали разные группы мышей.

После трансплантации клеток мышам, периферическую кровь мышей соответственно собирали на 4 неделе, 8 неделе и 12 неделе, и долю CD45 человека обнаруживали с помощью проточной цитометрии; мышей умерщвляли на 16 неделе, а периферическую кровь, клетки костного мозга и клетки селезенки мышей собирали для обнаружения доли CD45 человека, CD19 человека, CD3 человека, CD33 человека и CD56 человека с помощью проточной цитометрии. Антитела и краситель 7-AAD, используемые в этом примере, и их источники показаны в таблице 11.

Таблица 11: Антитела и 7-AAD

Название антитела	Производство	Номер по каталогу
FITC к CD45 мыши	Biolegend	103108
APC/Cy7 к CD45 человека	Biolegend	304014
Brilliant Violet 510™ к CD3 человека	Biolegend	300448
PE к CD19 человека	Biolegend	363004
Brilliant Violet 421™ к CD33 человека	Biolegend	303416
APC к CD56 человека	Biolegend	304610
Раствор для оценки жизнеспособности 7-AAD	Biolegend	420404

Долю CD45 человека в периферической крови мышей обнаруживали с помощью проточной цитометрии, а обнаруженные группы клеток с заданным уровнем представлены в таблице 12.

Таблица 12:

Группа	Количество клеток	Название добавленного антитела	Количество антитела
NC	2×10^5	--	--
Образец	2×10^5	APC/Cy7 к CD45 человека	2 мкл
		FITC к CD45 мыши	2 мкл

Приготовление 1X лизата эритроцитов: 5 мл исходного раствора для лизиса/фиксации эритроцитов 10X (Biolegend, кат. № 422401), добавляли 45 мл деионизированной воды (Edigene, фильтровали с помощью фильтра 0,22 мкм), чтобы хорошо перемешать для приготовления 1× лизата эритроцитов.

Собирали периферическую кровь мышей (около 100 мкл) и добавляли антитела в соответствии с группами, указанными в Таблице 12, перемешивали на вортексе для хорошего перемешивания и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут в

темноте. После завершения инкубации в СК и каждый образец добавляли 1,2 мл $1 \times$ раствора для лизиса эритроцитов соответственно, перемешивали на вортексе для хорошего перемешивания и лизировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте, в течение этого периода центрифужную пробирку с образцом переворачивали каждые 3 мин. После завершения лизиса испытуемые растворы центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант отбрасывали, добавляли 1 мл PBS, содержащего 1 % HSA, к каждому экспериментальному образцу, чтобы хорошо перемешать, центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант отбрасывали, добавляли 100 мкл PBS, содержащего 1 % HSA и 5 мкл красителя 7-AAD, к каждому экспериментальному образцу для хорошего перемешивания с помощью вихревой мешалки и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут в темноте. После инкубации 1 мл PBS, содержащего 1 % HSA, добавляли к NC и к каждому образцу для хорошо перемешивания, центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант отбрасывали, затем добавляли 100 мкл PBS, содержащего 1 % HSA, к каждому экспериментальному образцу для ресуспендирования клеток; образцы хранили при комнатной температуре в темноте перед испытанием и детектировали с помощью проточной цитометрии.

Результаты тестирования анализировали следующим образом: 1) популяция клеток-мишеней представляет собой популяцию клеток CD45+ человека; 2) определение стратегии гейтирования и положения гейтов показано на фиг. 19: сначала популяцию клеток определяли как гейт P1; адгезивные клетки удаляли из популяции клеток, полученных из гейта P1 (гейт P2); популяцию жизнеспособных клеток в популяции клеток, полученных из гейта P2, отделяли с помощью 7-AAD (гейт P3); популяция клеток CD45- мыши и CD45- человека в популяции клеток, полученных из гейта P3 (Q2-LL), отделяли с помощью NC ; отделенный с помощью NC гейт использовали для определения того, являются ли клетки, отделенные с помощью гейта Q2-UL, клетками-мишенями CD45+ человека. Эффективность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток человека выражается долей клеток CD45 человека, а метод расчета следующий: $\% \text{ CD45 человека} / (\% \text{ CD45 человека} + \% \text{ CD45 мыши})$.

Процентные доли CD45 человека, CD19 человека, CD3 человека, CD33 человека и CD56 человека в периферической крови, клетках костного мозга и клетках селезенки мышей детектировали с помощью проточной цитометрии. См. Таблицу 13 для заданных групп обнаружения клеток.

Таблица 13:

Группа	Количество клеток	Название добавленного антитела	Количество антитела
NC	2×10^5	--	--
Образец	2×10^5	APC/Cy7 к CD45 человека	2 мкл
		FITC к CD45 мыши	2 мкл
		Brilliant Violet 510™ к CD3 человека	2 мкл
		PE к CD19 человека	2 мкл
		Brilliant Violet 421™ к CD33 человека	2 мкл
		APC к CD56 человека	2 мкл

Собирали периферическую кровь мышей (около 100 мкл) и добавляли антитела в соответствии с группами, указанными в таблице 13. Последующая обработка образцов крови согласуется с вышеупомянутой операцией по обнаружению доли CD45 человека в периферической крови мышей. После операции для обнаружения использовали проточный цитометр.

Мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, и брали большеберцовую и бедренную кости одной задней ноги мышей. С помощью офтальмологических ножниц и офтальмологических щипцов отрезали оба конца большеберцовой и бедренной костей соответственно для обнажения полости костного мозга. Для извлечения предварительно охлажденного PBS, содержащего 1 % HSA, использовали шприц объемом 1 мл, вводили иглу в один конец полости костного мозга и принудительно вводили PBS для вымывания клеток костного мозга с другого конца полости костного мозга. Полости большеберцового и бедренного костного мозга соответственно промывали 2 мл PBS. Клеточную суспензию костного мозга повторно продували и всасывали пипеткой, затем фильтровали через 40 мкм сито (BD, номер по каталогу: 352340), центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при

комнатной температуре. После центрифугирования надосадочную жидкость отбрасывали, а клетки костного мозга использовали для последующего использования.

Мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, а селезенку мыши удаляли и помещали в предварительно охлажденный PBS, содержащий 1 % HSA. Селезенку разрезали офтальмологическими ножницами, а суспензию ткани селезенки повторно продували и отсасывали пипеткой, затем фильтровали через 40 мкм сито и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования надосадочную жидкость отбрасывали, а клетки костного мозга использовали для последующего использования.

К запасным клеткам костного мозга и клеткам селезенки добавляли 1 мл $1 \times$ эритроцитарного лизата, перемешивали на вортексе и лизировали при комнатной температуре в течение 15 мин, в течение этого периода центрифужную пробирку с образцом переворачивали каждые 3 мин. После лизиса к каждому образцу добавляли 4 мл PBS, содержащего 1 % HSA, для центрифугирования при комнатной температуре в течение 5 мин при 400 г. После центрифугирования супернатант отбрасывали, и к каждому образцу добавляли 1 мл PBS, содержащего 1 % HSA, для хорошего перемешивания на вихревой мешалке. Из каждого образца отбирали по 100 мкл клеточной суспензии с последующим добавлением антител согласно группам в таблице 13, перемешивали на вортексе для хорошего смешивания и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте. После инкубации в каждый экспериментальный образец добавляли 5 мкл красителя 7-AAD, перемешивали на вортексе для хорошего смешивания и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин в темноте. После инкубации 1 мл PBS, содержащего 1 % HSA, добавляли к NC и каждому образцу для хорошего смешивания, центрифугировали при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант отбрасывали и в каждый экспериментальный образец добавляли 100 мкл PBS, содержащего 1 % HSA, для ресуспендирования клеток. Образцы хранили при комнатной температуре в темноте перед тестированием и детектирование проводили с помощью проточной цитометрии.

Результаты тестирования анализировали следующим образом: 1) популяция клеток-мишеней представляет собой популяцию клеток CD45⁺ человека, популяцию клеток

CD19+ человека, популяцию клеток CD3+ человека, популяцию клеток CD33+ человека и популяцию клеток CD56+ человека; 2) определение стратегии гейтирования и положения гейта показано на фиг. 20: сначала популяцию клеток отделяли как гейт P1; адгезивные клетки удаляли из популяции клеток, полученных из гейта P1 (гейт P2); популяцию жизнеспособных клеток в популяции клеток, полученную из гейта P2, отделяли с помощью 7-AAD (гейт P3); популяции клеток мыши CD45+ (гейт P4) и человека CD45+ (гейт P5) в популяции клеток, полученной из гейта P3, отделяли с помощью NC; популяцию клеток CD33+ человека (гейт P6) и популяцию клеток CD56+ человека (гейт P7) в популяции клеток, полученной из гейта P5, отделяли с помощью NC; популяцию клеток CD19+ человека (гейт P8) и популяцию клеток CD3+ человека (гейт P9) в популяции клеток, полученной из гейта P5 отделяли с помощью NC. Эффективность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток человека выражается долей клеток CD45 человека, и метод расчета следующий: $\% \text{ CD45 человека} / (\% \text{ CD45 человека} + \% \text{ CD45 мыши})$. Эффективность гемопоэтических стволовых клеток человека, дифференцированных в клетки крови различных линий у мышей выражена в проценте CD19 человека (представляющих собой В-клетки), проценте CD3 человека (представляющих собой Т-клетки), проценте CD33 человека (представляющих собой миелоидные клетки) и проценте CD56 человека (представляющих собой NK-клетки).

Результаты на фиг. 21 показывают, что эффективность трансплантации клеток, обработанных дазатинибом, значительно выше, чем у группы Mock и группы SR1, при анализе периферической крови на неделе 8, неделе 12 и неделе 16 при условии того же количества клеток в исходной культуре для трансплантации мыши. В анализах костного мозга и селезенки на неделе 16 эффективность трансплантации в группе клеток, обработанных дазатинибом, значительно выше, чем в группе SR1. Доказано, что дазатиниб может улучшить трансплантационную способность гемопоэтических стволовых клеток, и его действие лучше, чем у низкомолекулярного SR1, описанного в уровне техники.

Результаты на фиг. 22 показывают, что Т-клетки, В-клетки, миелоидные клетки и NK-клетки человека могут быть обнаружены в периферической крови, костном мозге и селезенке мышей через 16 недель после трансплантации, и пропорции между клетками каждой линии в каждой группе существенно не отличаются. Доказано, что гемопоэтические

стволовые клетки человека не только успешно трансплантируются, но и могут дифференцироваться в клетки различных линий с нормальной функцией дифференцировки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ стимулирования пролиферации HSC (гемопоетических стволовых клеток) и поддержания стволовости HSC, включающий *in vitro* приведение HSC в контакт с культуральной средой, содержащей низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT (преобразователя сигнала и активатора транскрипции) или низкомолекулярный ингибитор другого клеточного сигнального пути, отличного от клеточного сигнального пути STAT.

2. Способ по п. 1, где низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT представляет собой низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src.

3. Способ по п. 2, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, кверцетина, UM-164, KX2-391 и KX1-004.

4. Способ по любому из п. 2 или 3, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором указанного другого клеточного сигнального пути.

5. Способ по п. 4, где низкомолекулярный ингибитор указанного другого клеточного сигнального пути представляет собой один, или два, или более из группы, состоящей из: низкомолекулярного ингибитора, нацеленного на HDAC (деацетилазы гистонов), низкомолекулярного ингибитора, нацеленного на PKC (протеинкиназа C), и низкомолекулярного ингибитора, нацеленного на JNK (Jun-N-терминальная киназа).

6. Способ по п. 5, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором, нацеленным на HDAC, низкомолекулярным ингибитором, нацеленным на PKC, или низкомолекулярным ингибитором, нацеленным на JNK.

7. Способ по п. 6, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют в комбинации с низкомолекулярным ингибитором VPA (вальпроевая кислота), нацеленным на HDAC, низкомолекулярным ингибитором SAHA (субероиланилид гидроксамовой кислоты), нацеленным на HDAC, низкомолекулярным ингибитором энзастаурином, нацеленным на PKC, или низкомолекулярным ингибитором JNK-IN-8, нацеленным на JNK.

8. Способ по п. 7, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой дазатиниб.

9. Способ по п. 8, где дазатиниб применяют в комбинации с VPA или SAHA.

10. Способ по любому из пп. 2-8, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют отдельно или в комбинации с другим ингибитором (-ами) для поддержания доли HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток.

11. Способ по любому из пп. 2-9, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, применяют отдельно или в комбинации с другим ингибитором (-ами) для поддержания доли CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток.

12. Композиция для поддержания стволовости HSC, содержащая низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT.

13. Композиция по п. 12, где низкомолекулярный ингибитор клеточного сигнального пути STAT представляет собой низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src.

14. Способ по п. 13, где низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на Src, представляет собой один или более из группы, состоящей из: дазатиниба, кверцетина, UM-164, KX2-391 и KX1-004.

15. Композиция по любому из п. 13 или 14, дополнительно содержащая низкомолекулярный ингибитор другого клеточного сигнального пути, отличного от клеточного сигнального пути STAT.

16. Композиция по п. 15, где низкомолекулярный ингибитор указанных других клеточных сигнальных путей включает низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на PKC, или низкомолекулярный ингибитор, нацеленный на JNK.

17. Композиция по п. 16, где низкомолекулярный ингибитор указанных других клеточных сигнальных путей включает низкомолекулярный ингибитор VPA, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный ингибитор SAHA, нацеленный на HDAC, низкомолекулярный ингибитор энзастаурин, нацеленный на PKC, или низкомолекулярный ингибитор JNK-IN-8, нацеленный на JNK.

18. Композиция по любому из пп. 12-17, дополнительно содержащая среду SFEMII (бессывороточная среда для размножения II), фактор роста Flt-3L, фактор роста SCF (фактор стволовых клеток), фактор роста TPO (тиреопероксидаза) или фактор роста IL-6 (интерлейкин 6).

19. Композиция по любому из пп.12-18, которая поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток.

20. Композиция по любому из пп.12-19, которая поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток.

21. Композиция для поддержания стволовости HSC, содержащая любую комбинацию, выбранную из: SAHA плюс EPZ004777, SAHA плюс DZNeP (ингибитор гистоновой

метилтрансферазы EZH2), SAHA плюс дазатиниб, VPA плюс дазатиниб, SAHA плюс JNK-IN-8 или SAHA плюс VPA.

22. Композиция по п. 21, которая поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток.

23. Композиция по п. 21 или 22, которая поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток.

24. Композиция по любому из пп. 21-23, дополнительно содержащая среду SFEMII, фактор роста Flt-3L, фактор роста SCF, фактор роста TPO и фактор роста IL-6.

25. Композиция для поддержания стволовости HSC, содержащая любую комбинацию, выбранную из: SAHA плюс EPZ004777 плюс DZNeP или SAHA плюс VPA плюс дазатиниб.

26. Композиция по п. 25, которая поддерживает долю HSC с фенотипом CD34+CD45+CD90+CD45RA-CD38- более 8, 10, 15, 20, 25 или 30 % всех клеток.

27. Композиция по п. 25 или 26, которая поддерживает долю CD34+ клеток более 65, 70, 75, 80 или 85 % всех клеток.

28. Композиция по любому из пп. 25-27, дополнительно содержащая среду SFEMII, фактор роста Flt-3L, фактор роста SCF, фактор роста TPO и фактор роста IL-6.

29. Композиция по любому из пп. 17-19, где концентрация каждого ингибитора в культуральной среде составляет:

дазатиниб: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

SAHA: 10 нМ - 20 мкМ, предпочтительно 20 нМ - 15 мкМ, более предпочтительно 30 нМ - 10 мкМ, наиболее предпочтительно 0,1 мкМ - 10 мкМ;

VPA: 10-2000 мкМ, предпочтительно 10-1500 мкМ, более предпочтительно 10-1000 мкМ, наиболее предпочтительно 100-1000 мкМ;

JNK-IN-8: 0,1-20 мкМ, предпочтительно 0,5-15 мкМ, более предпочтительно 0,5-10 мкМ, наиболее предпочтительно 1-10 мкМ;

EPZ004777: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

DZNeP: 1-500 нМ, предпочтительно 5-400 нМ, более предпочтительно 10-300 нМ, наиболее предпочтительно 10-250 нМ;

UM-164: 0,1-1000 мкМ, предпочтительно 0,5-500 мкМ, более предпочтительно 1-100 мкМ, наиболее предпочтительно 1-10 мкМ;

KX2-391: 0,1-1000 нМ, предпочтительно 1-1000 нМ, более предпочтительно 10-500 нМ, наиболее предпочтительно 10-100 нМ;

KX1-004: 0,1-1000 мкМ, предпочтительно 1-1000 мкМ, более предпочтительно 10-500 мкМ, наиболее предпочтительно 10-100 мкМ.

30. Композиция по любому из пп. 21-24, где концентрация каждого ингибитора в культуральной среде составляет:

дазатиниб: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

SAHA: 10 нМ - 20 мкМ, предпочтительно 20 нМ - 15 мкМ, более предпочтительно 30 нМ - 10 мкМ, наиболее предпочтительно 0,1-10 мкМ;

VPA: 10-2000 мкМ, предпочтительно 10-1500 мкМ, более предпочтительно 10-1000 мкМ, наиболее предпочтительно 100-1000 мкМ;

JNK-IN-8: 0,1-20 мкМ, предпочтительно 0,5-15 мкМ, более предпочтительно 0,5-10 мкМ, наиболее предпочтительно 1-10 мкМ;

EPZ004777: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

DZNeP: 1-500 нМ, предпочтительно 5-400 нМ, более предпочтительно 10-300 нМ, наиболее предпочтительно 10-250 нМ.

31. Композиция по любому из пп. 25-28, где концентрация каждого ингибитора в культуральной среде составляет:

дазатиниб: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

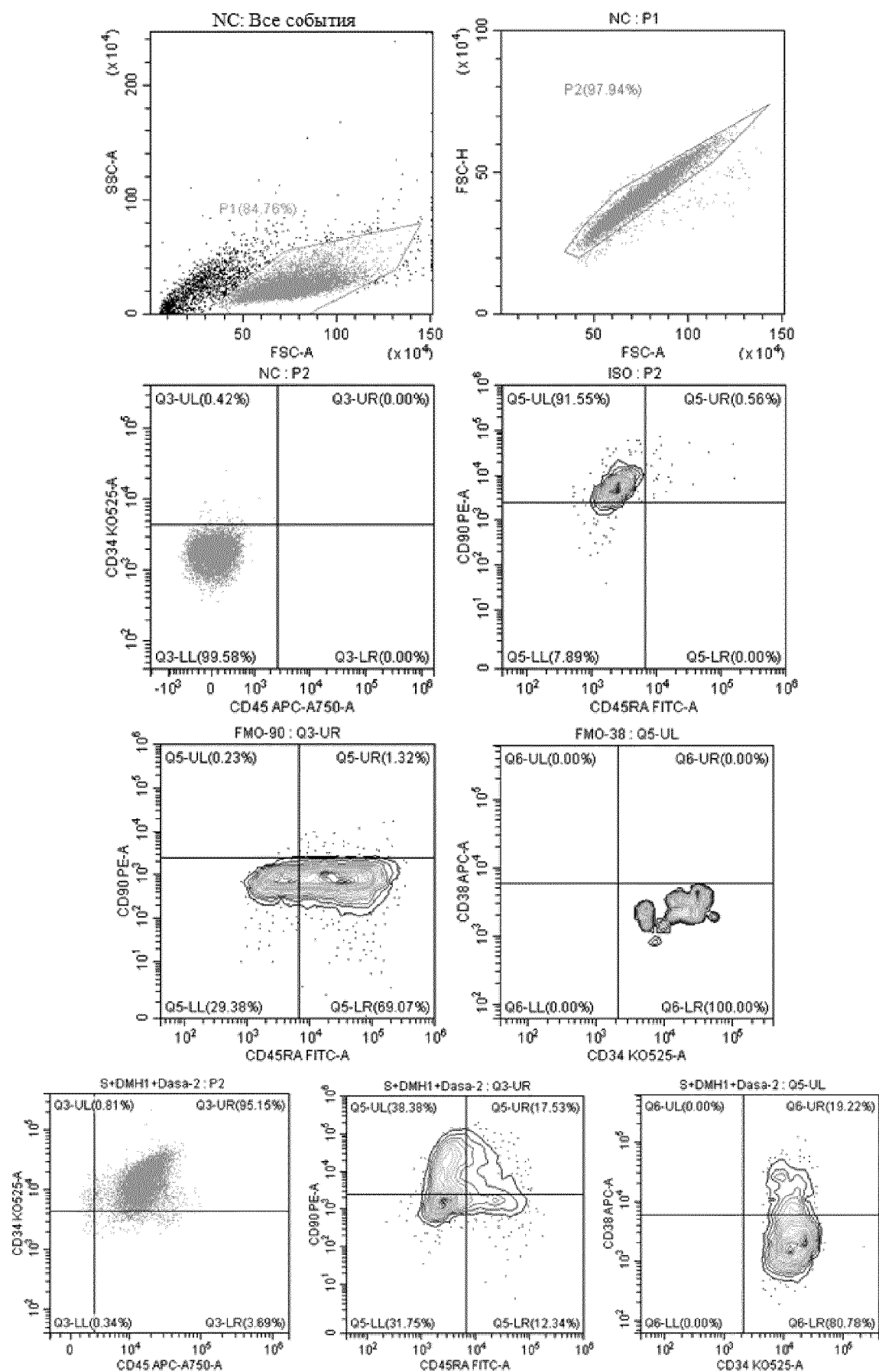
SAHA: 10 нМ - 20 мкМ, предпочтительно 20 нМ - 15 мкМ, более предпочтительно 30 нМ - 10 мкМ, наиболее предпочтительно 0,1-10 мкМ;

VPA: 10-2000 мкМ, предпочтительно 10-1500 мкМ, более предпочтительно 10-1000 мкМ, наиболее предпочтительно 100-1000 мкМ;

EPZ004777: 0,1-50 мкМ, предпочтительно 0,5-40 мкМ, более предпочтительно 0,5-30 мкМ, наиболее предпочтительно 0,5-10 мкМ;

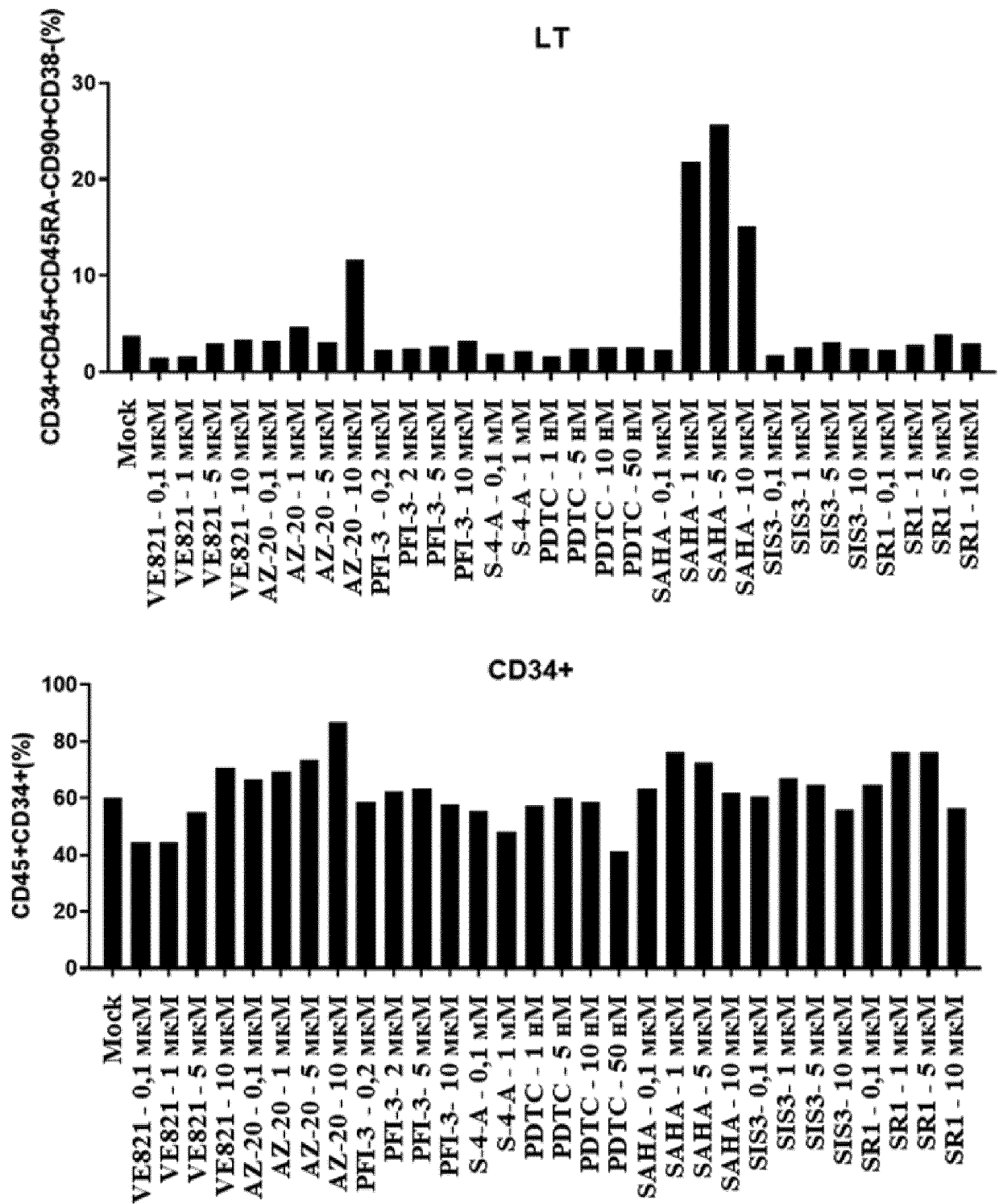
DZNeP: 1-500 нМ, предпочтительно 5-400 нМ, более предпочтительно 10-300 нМ, наиболее предпочтительно 10-250 нМ.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



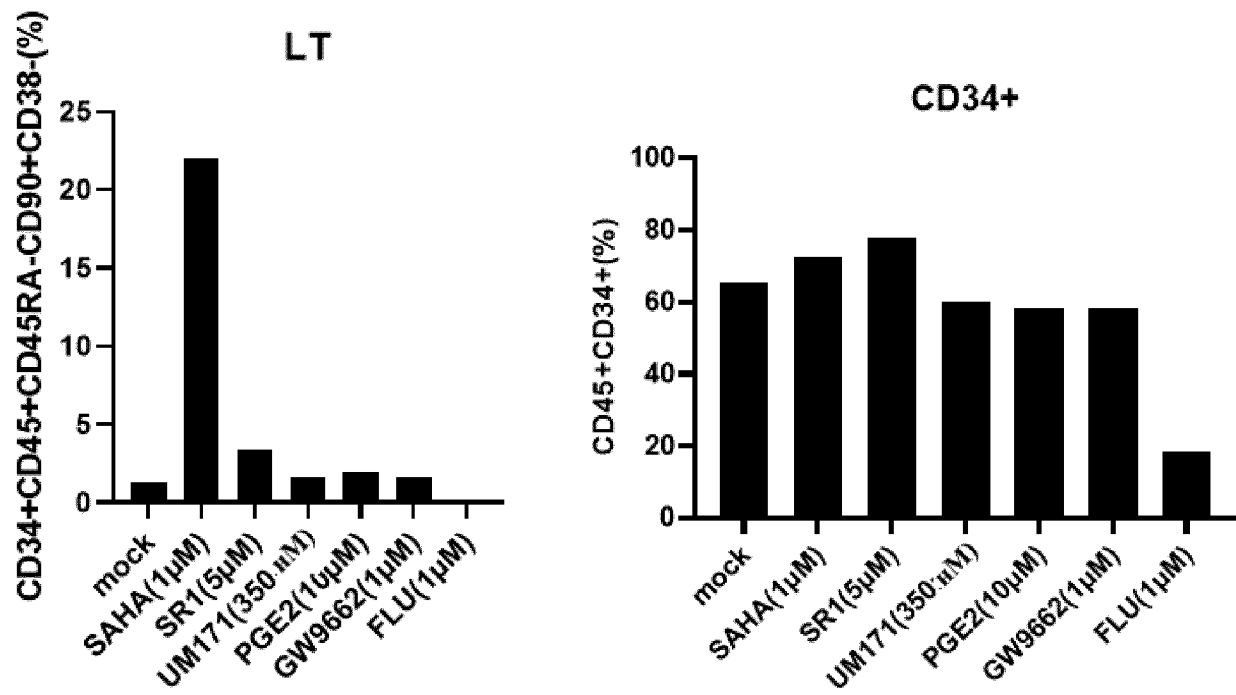
Фиг. 1

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



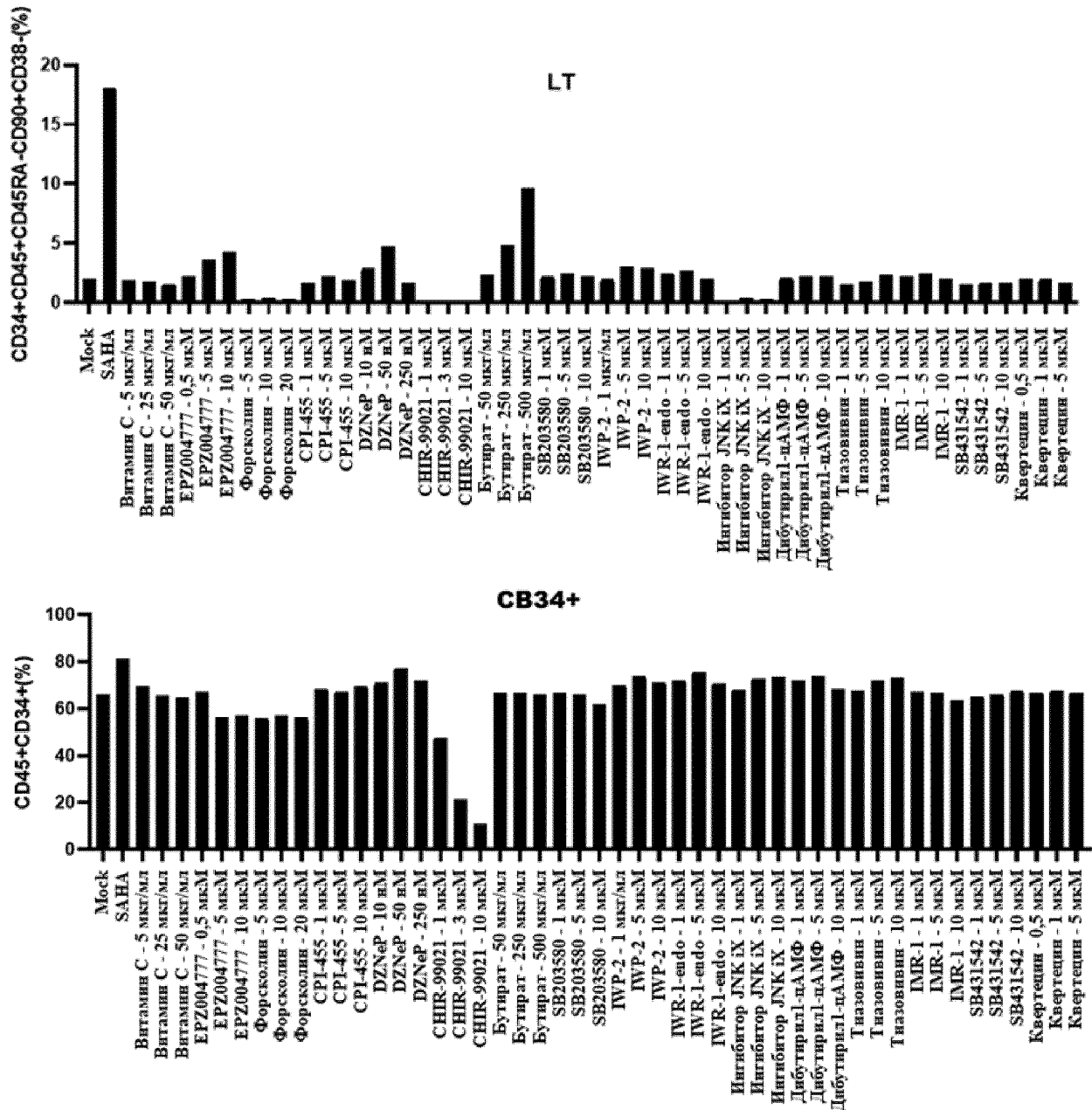
Фиг. 2

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



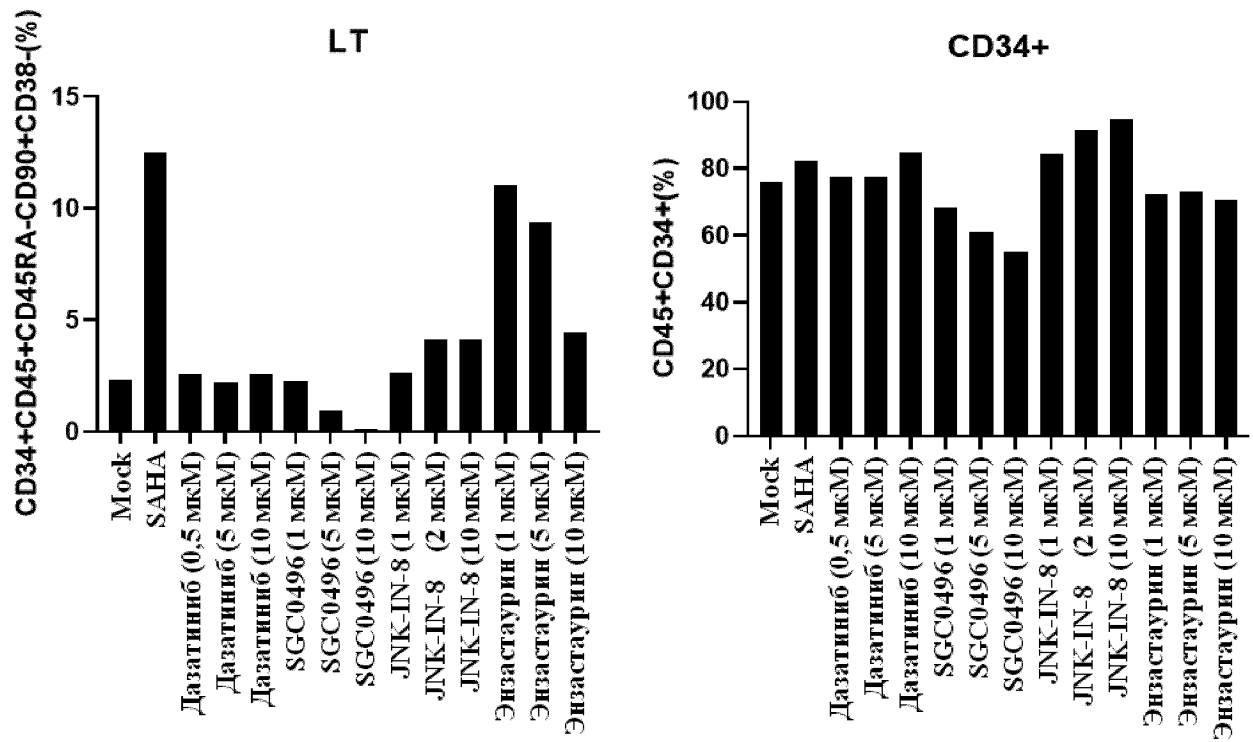
Фиг. 3

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



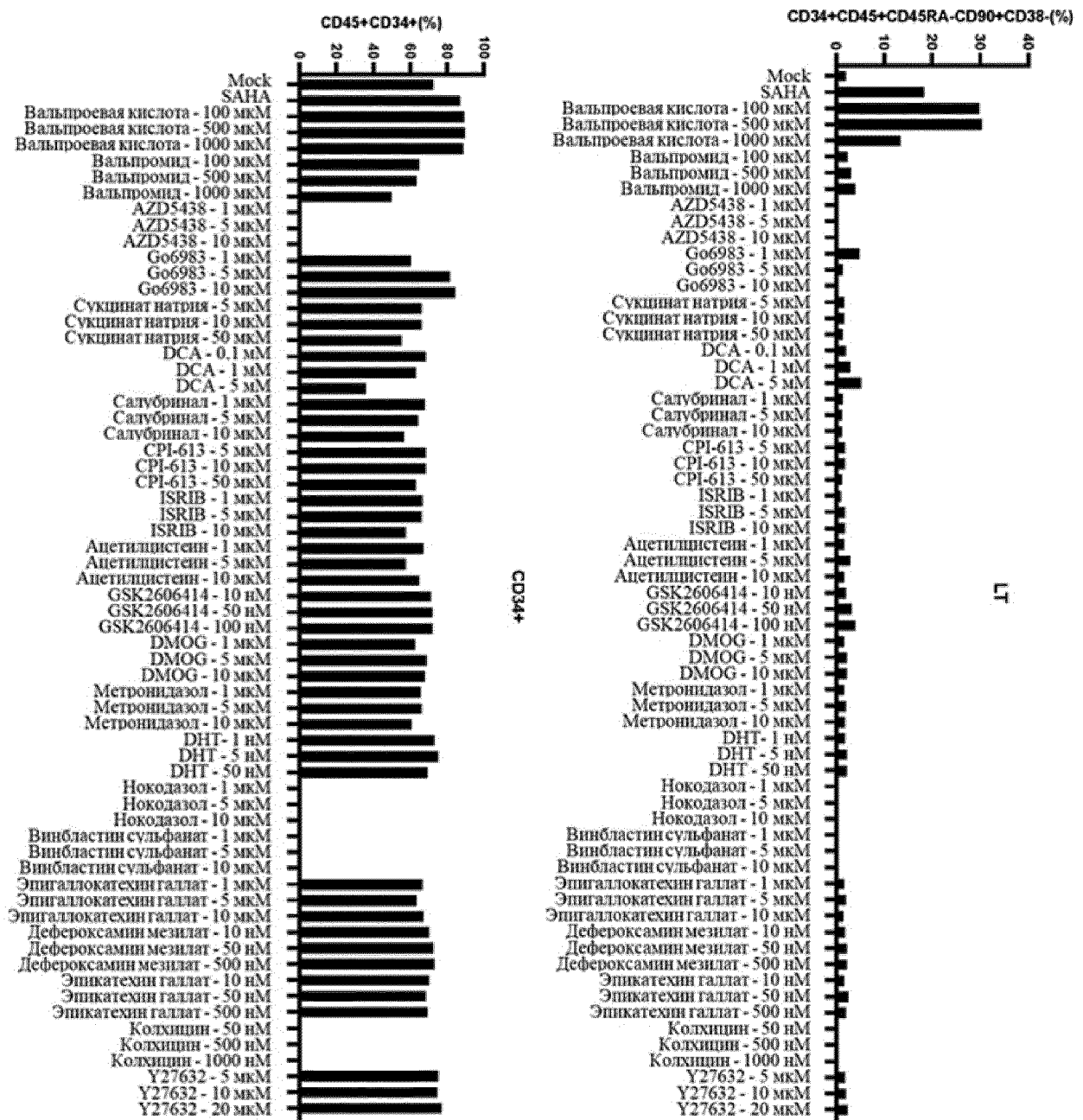
Фиг. 4

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



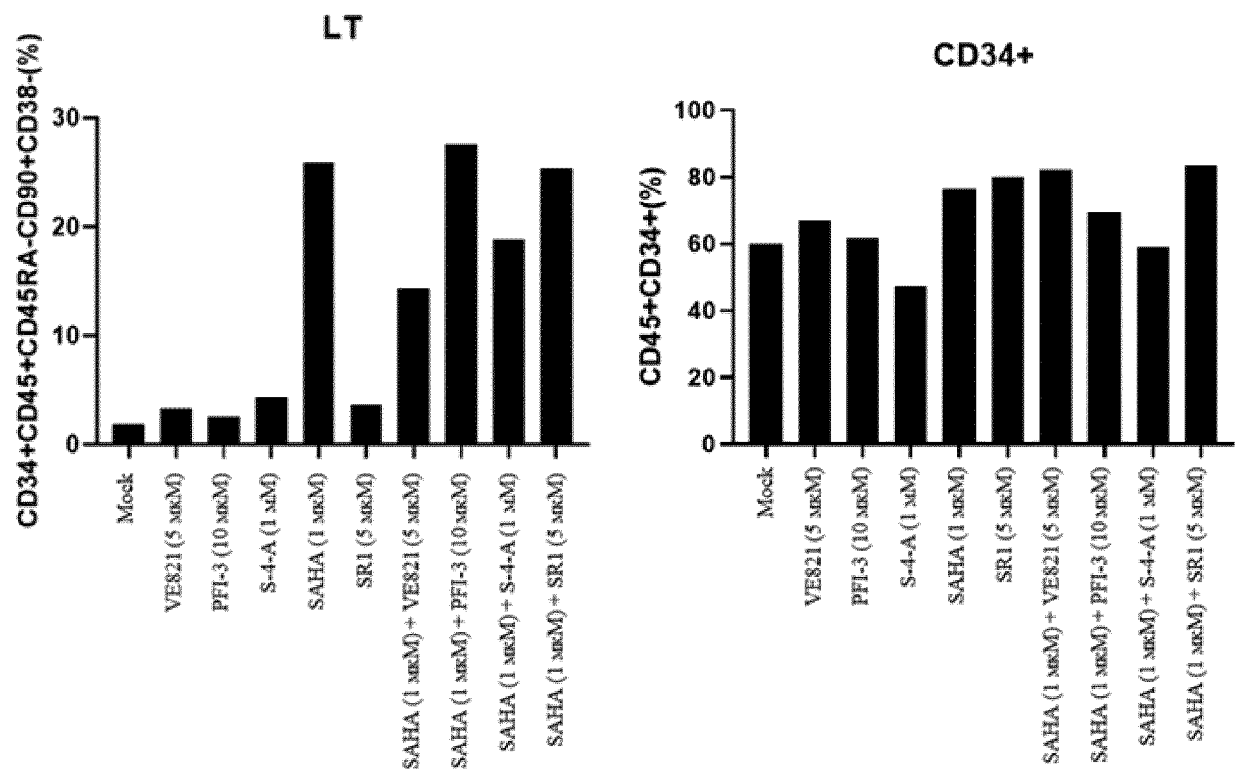
Фиг. 5

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



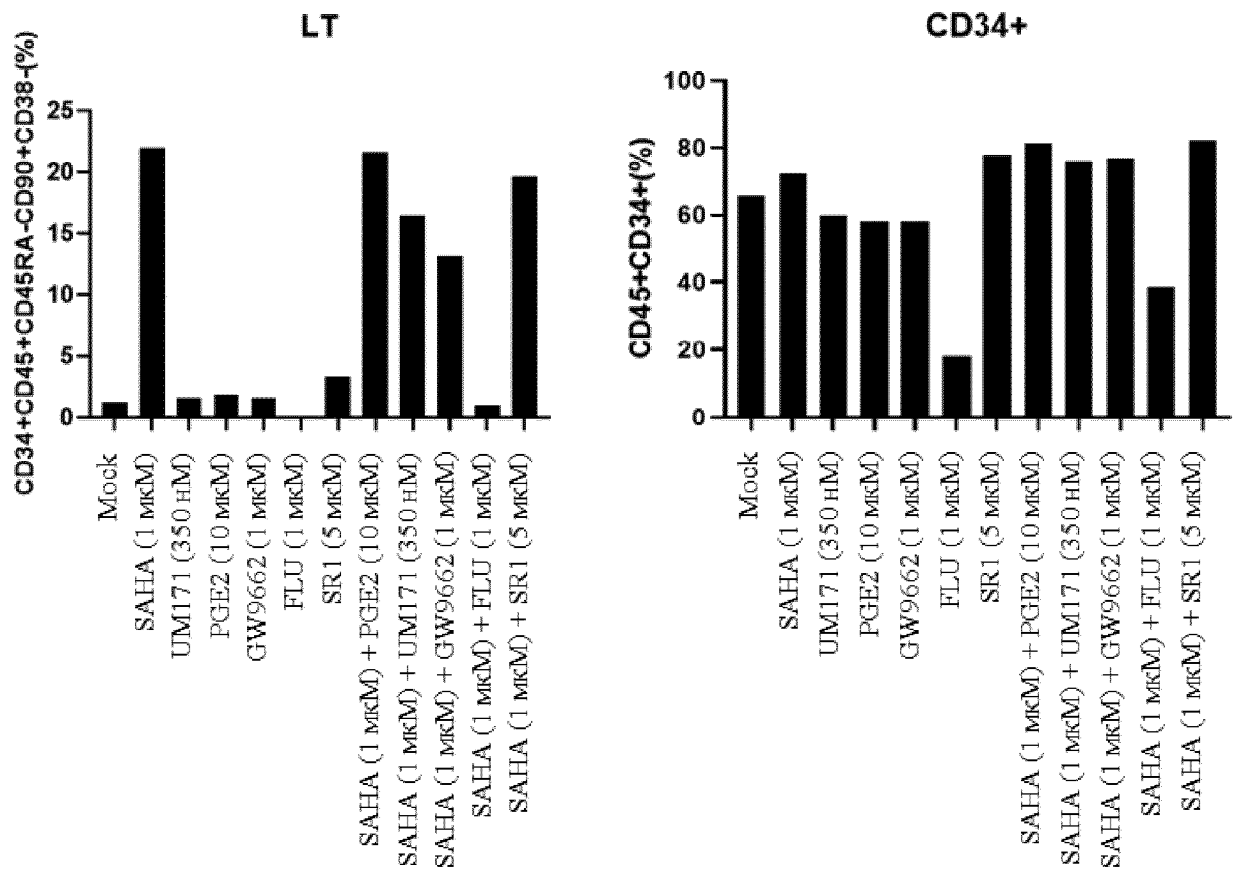
Фиг. 6

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



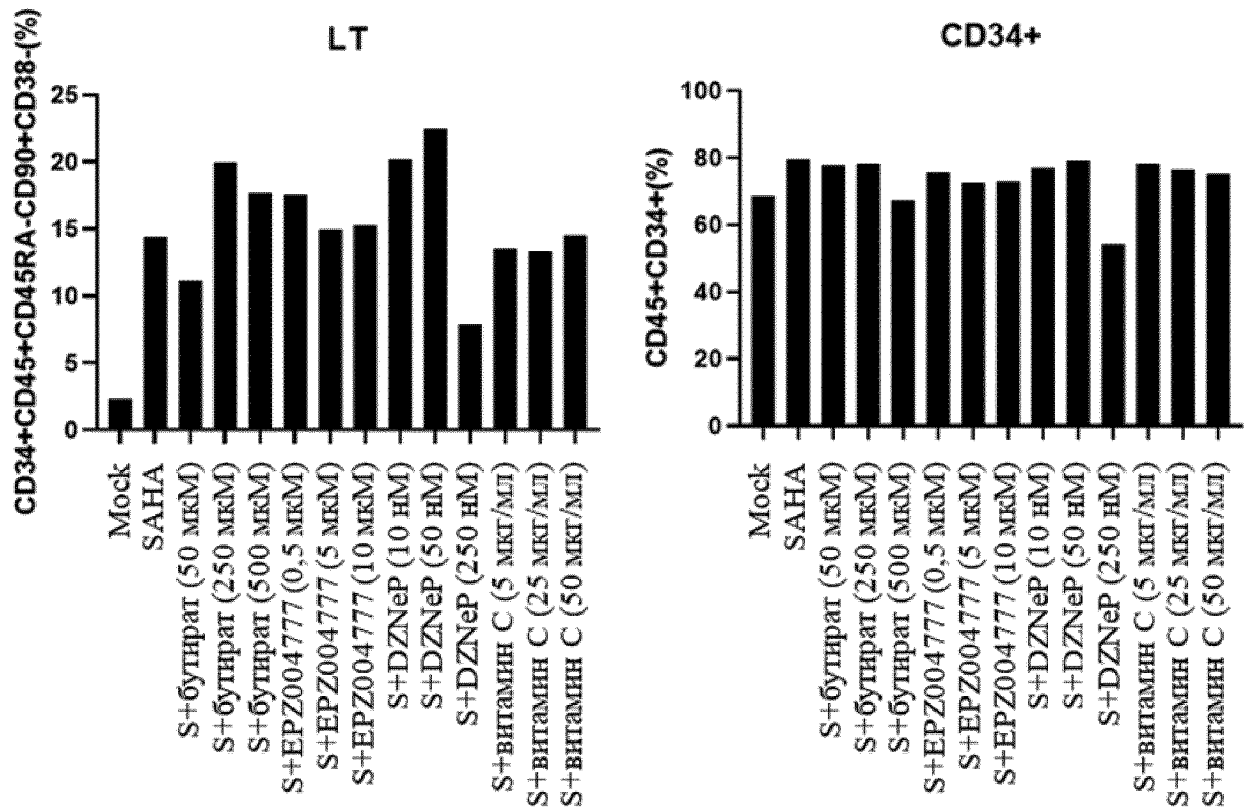
Фиг. 7

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ

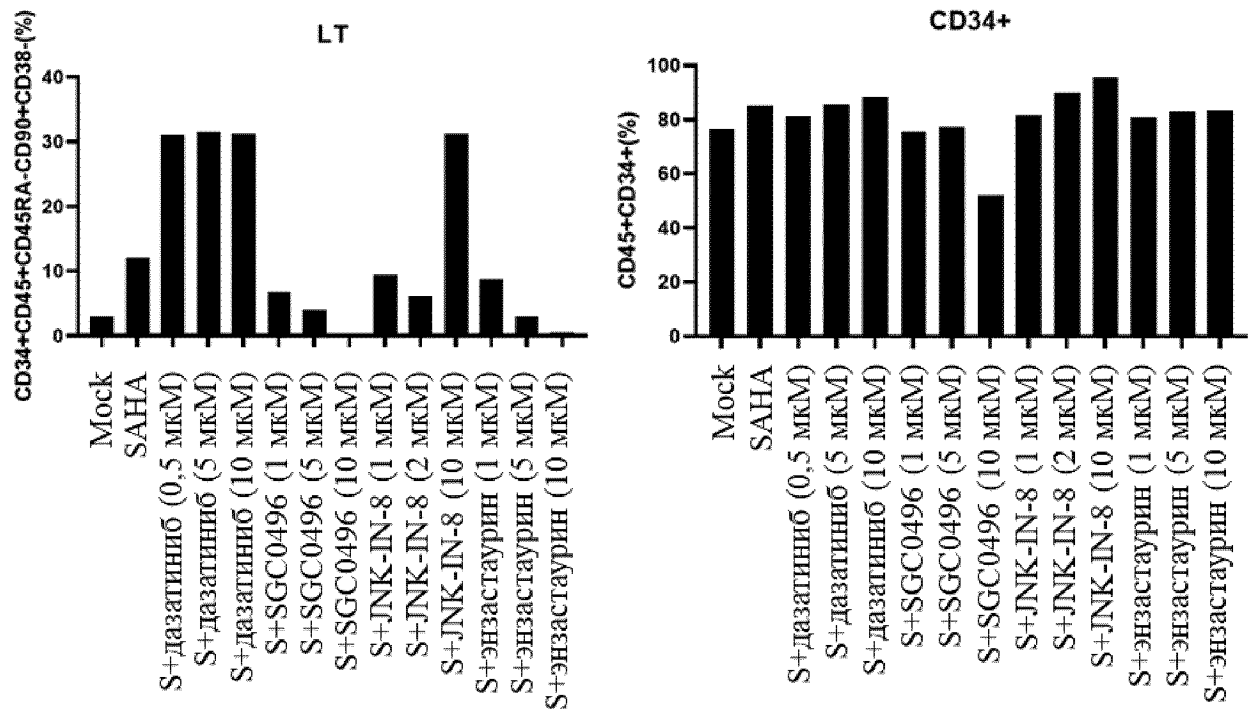


Фиг. 8

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ

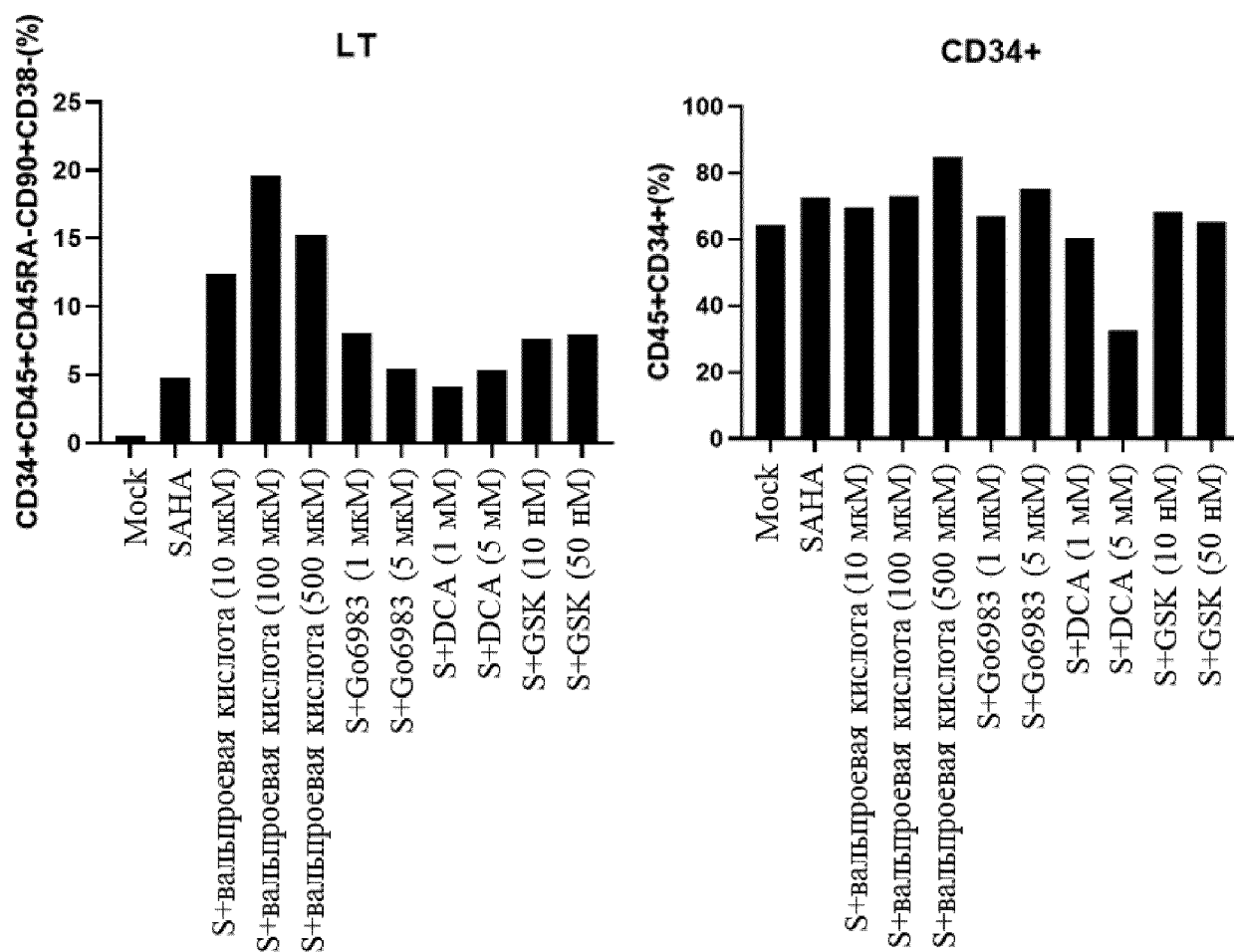


Фиг. 9



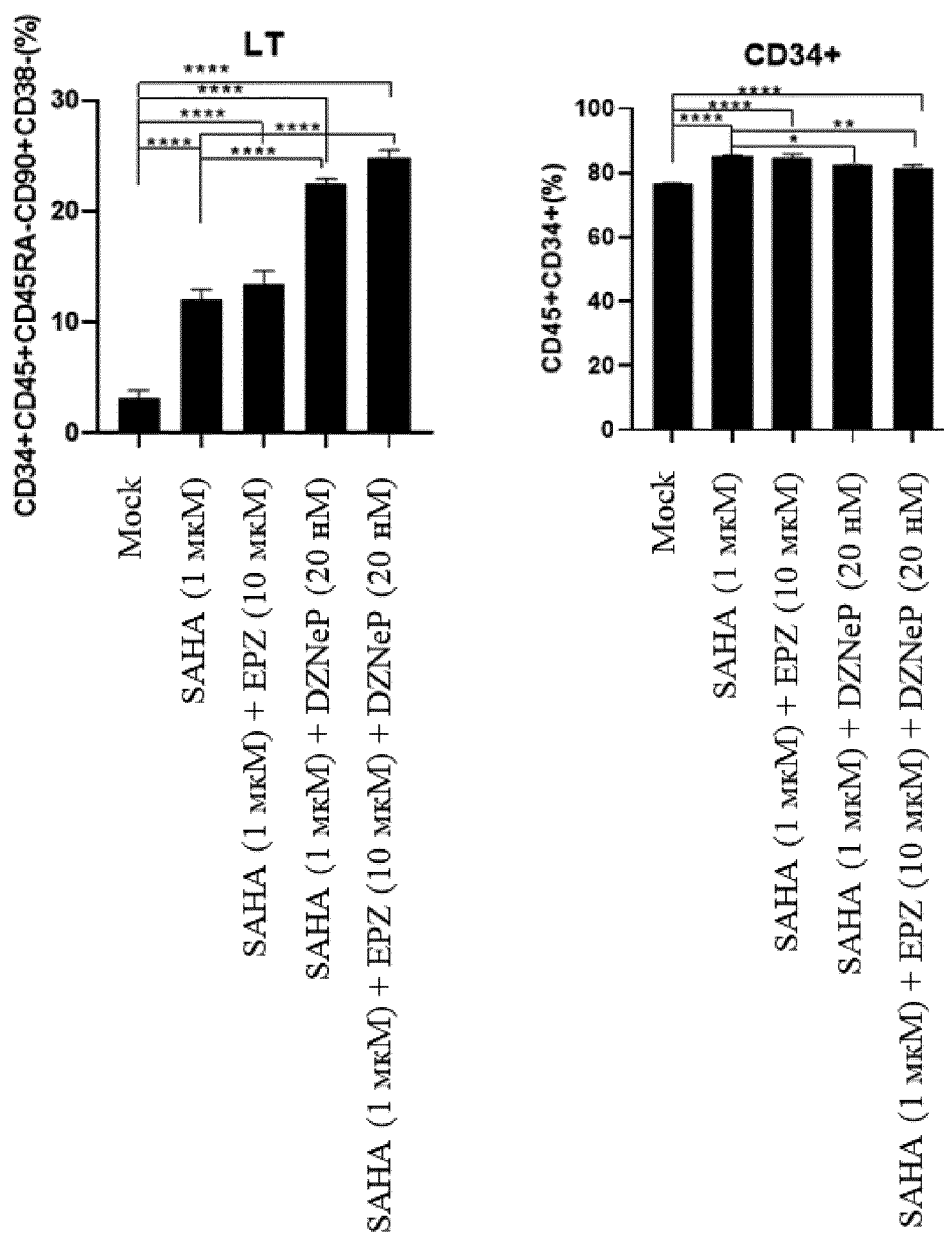
Фиг. 10

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



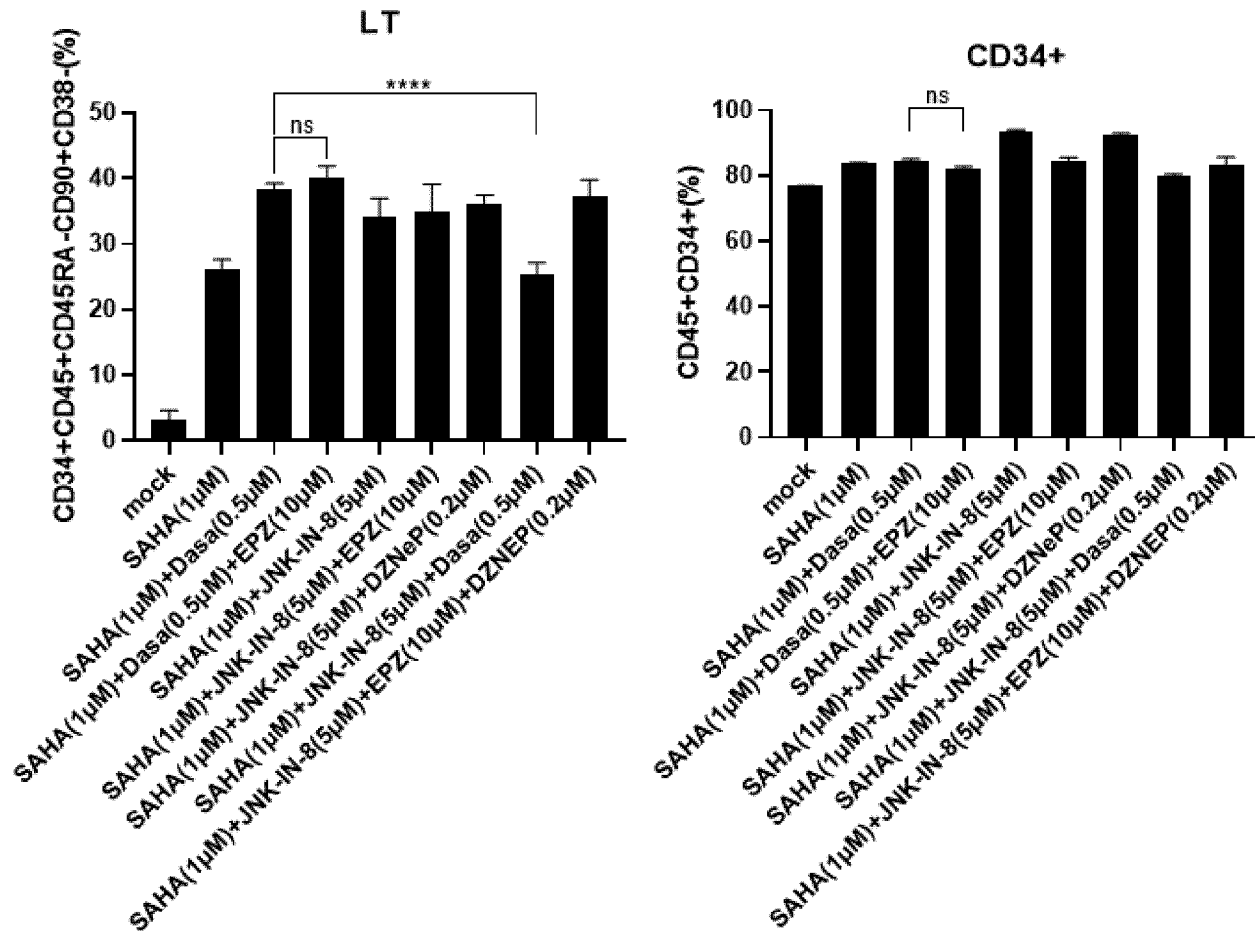
Фиг. 11

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



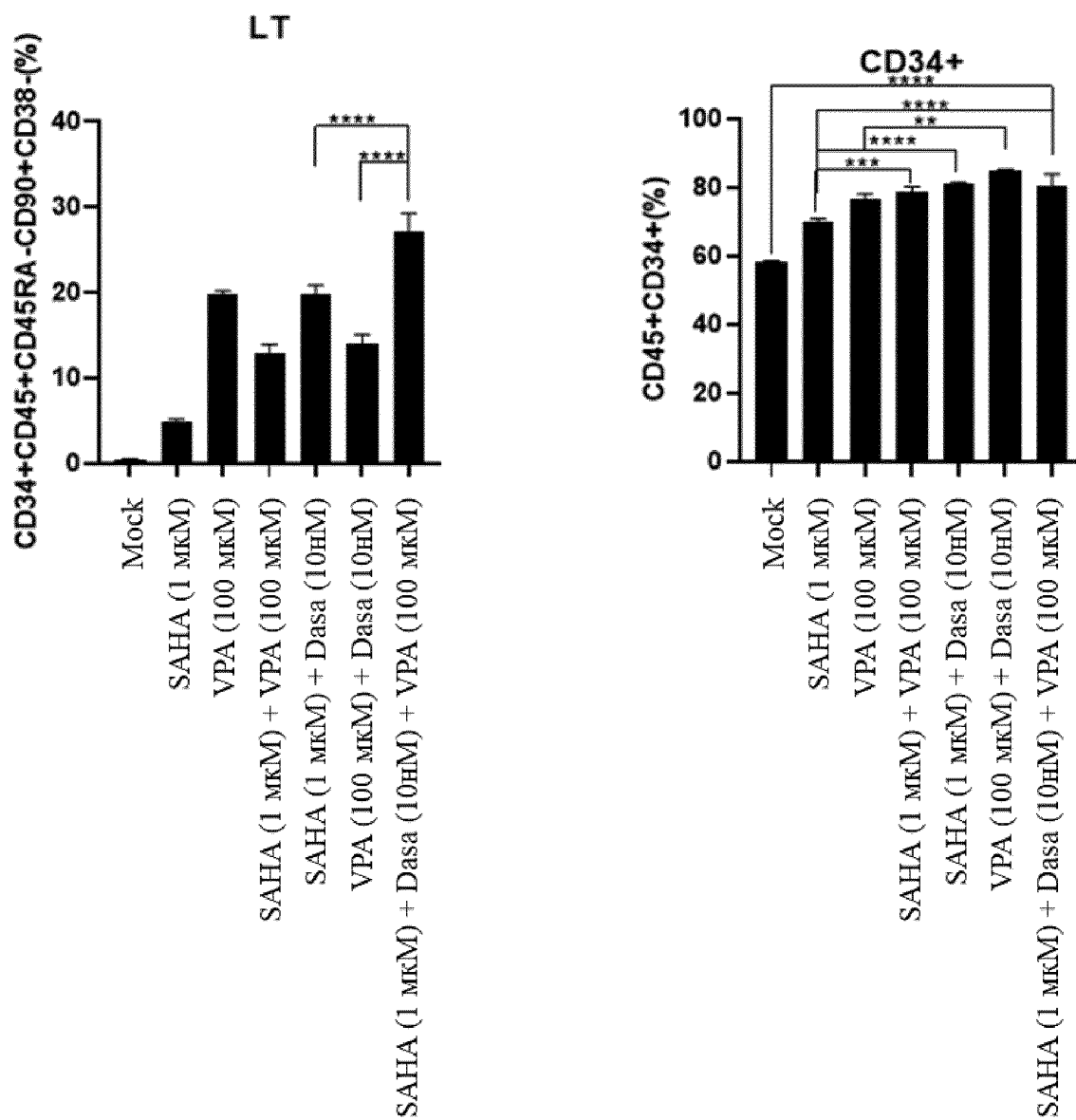
Фиг. 12

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



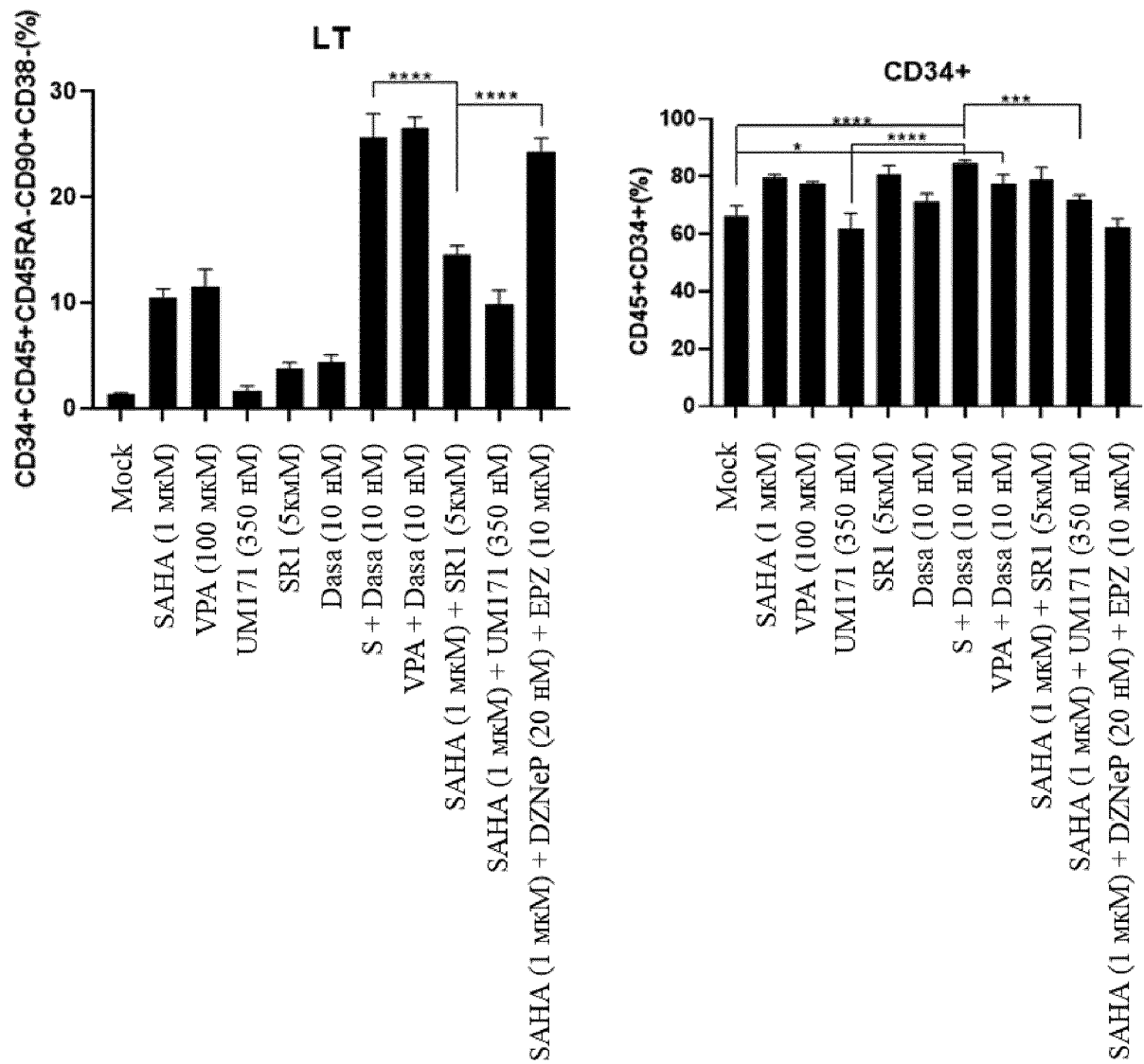
Фиг. 13

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



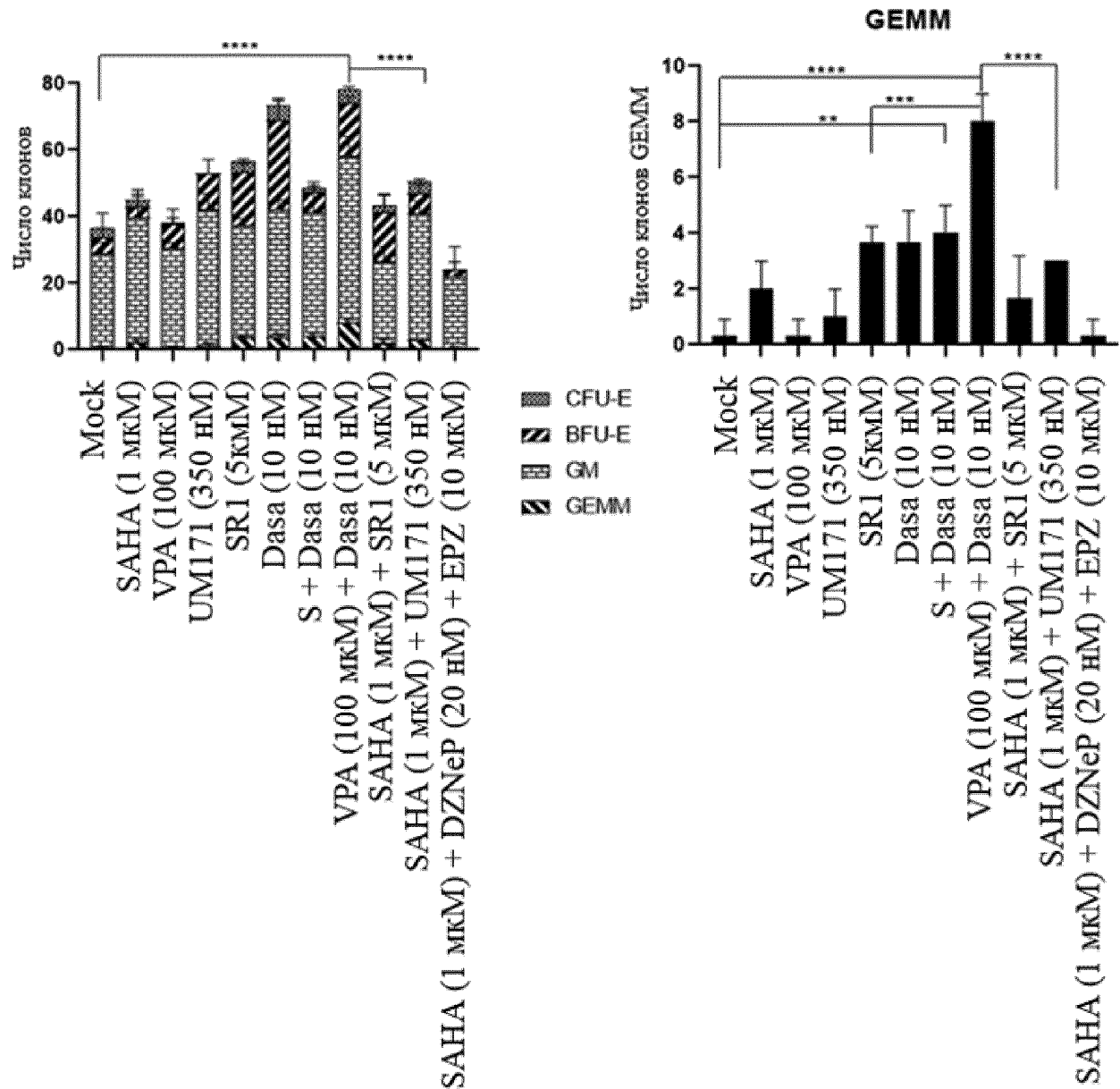
Фиг. 14

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



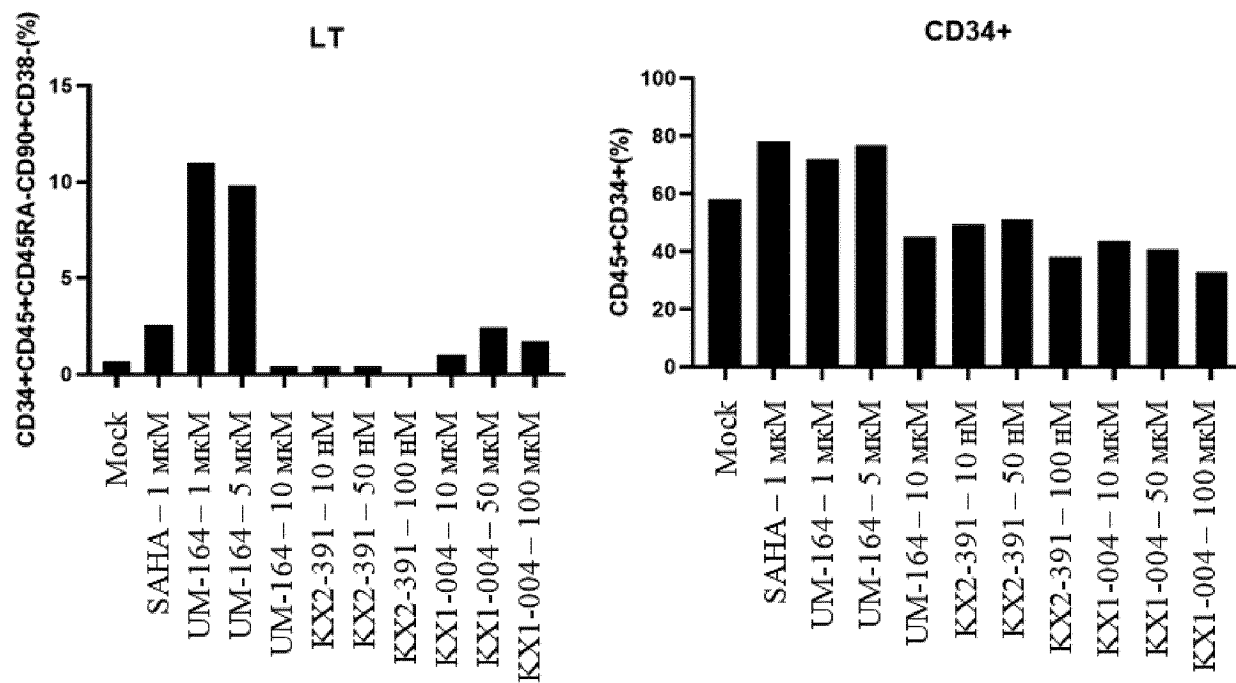
Фиг. 15

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



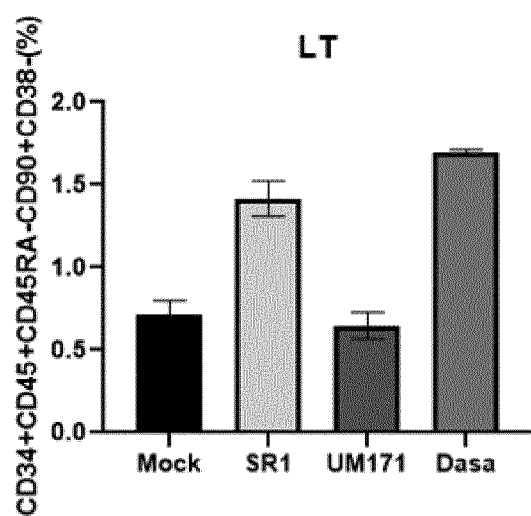
Фиг. 16

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ

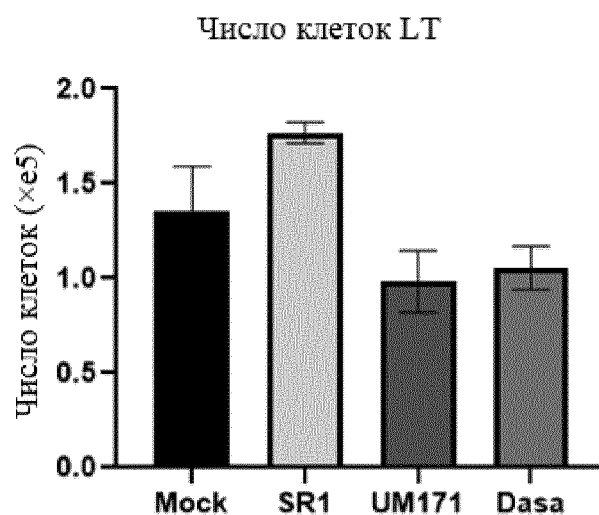


Фиг. 17

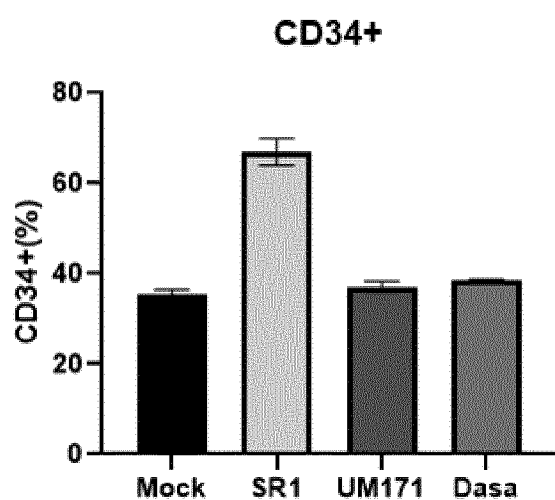
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



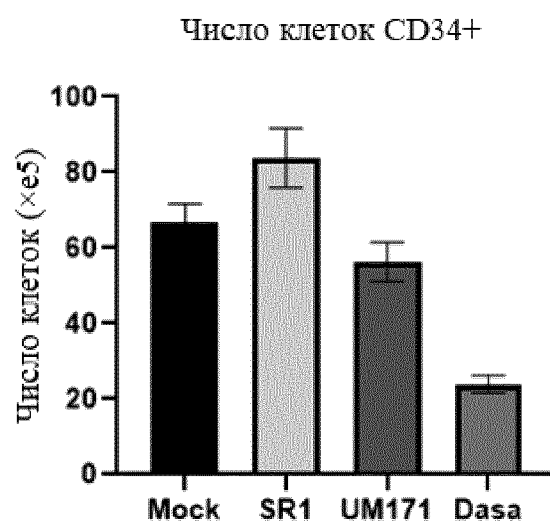
Фиг. 18А



Фиг. 18В

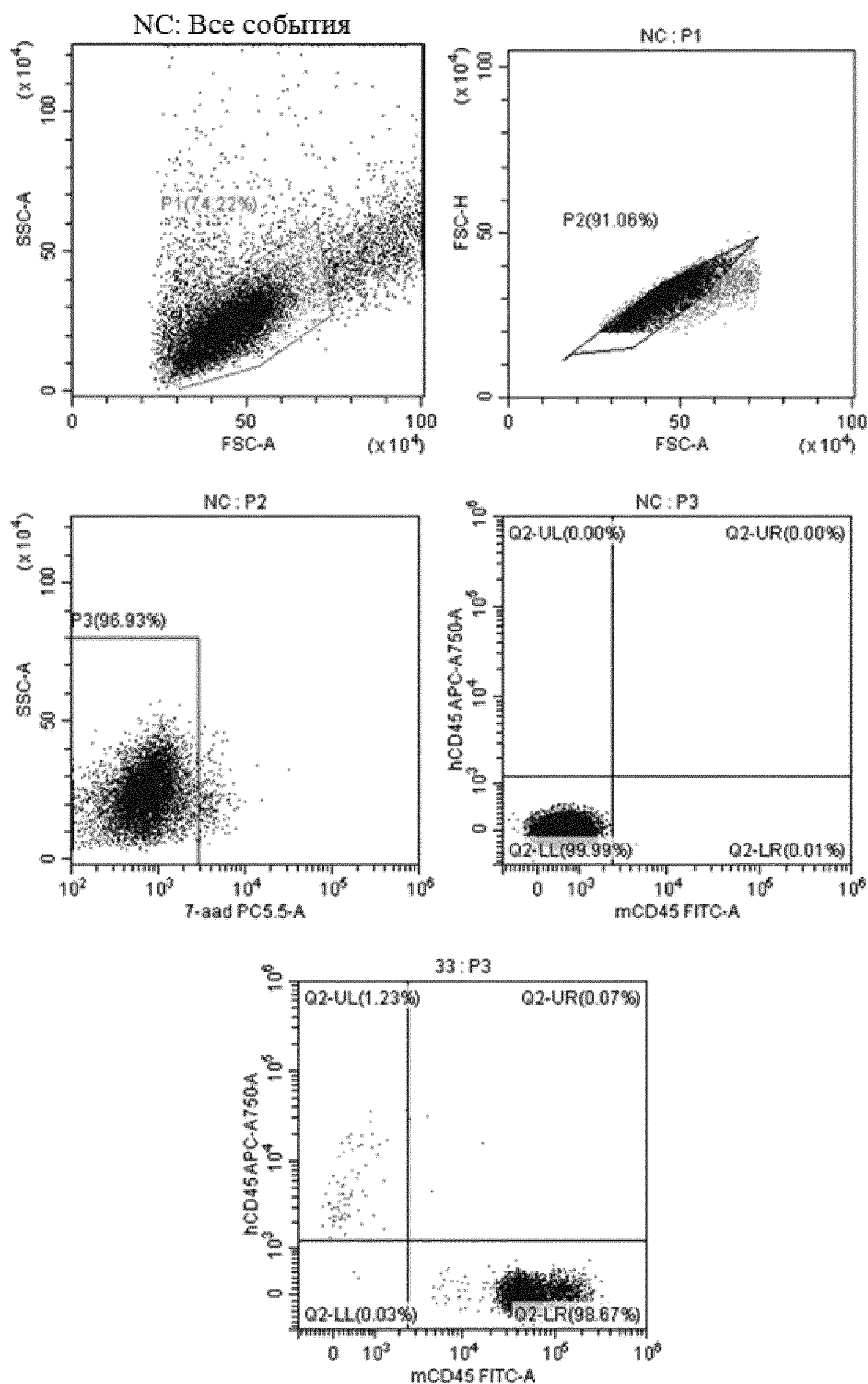


Фиг. 18С



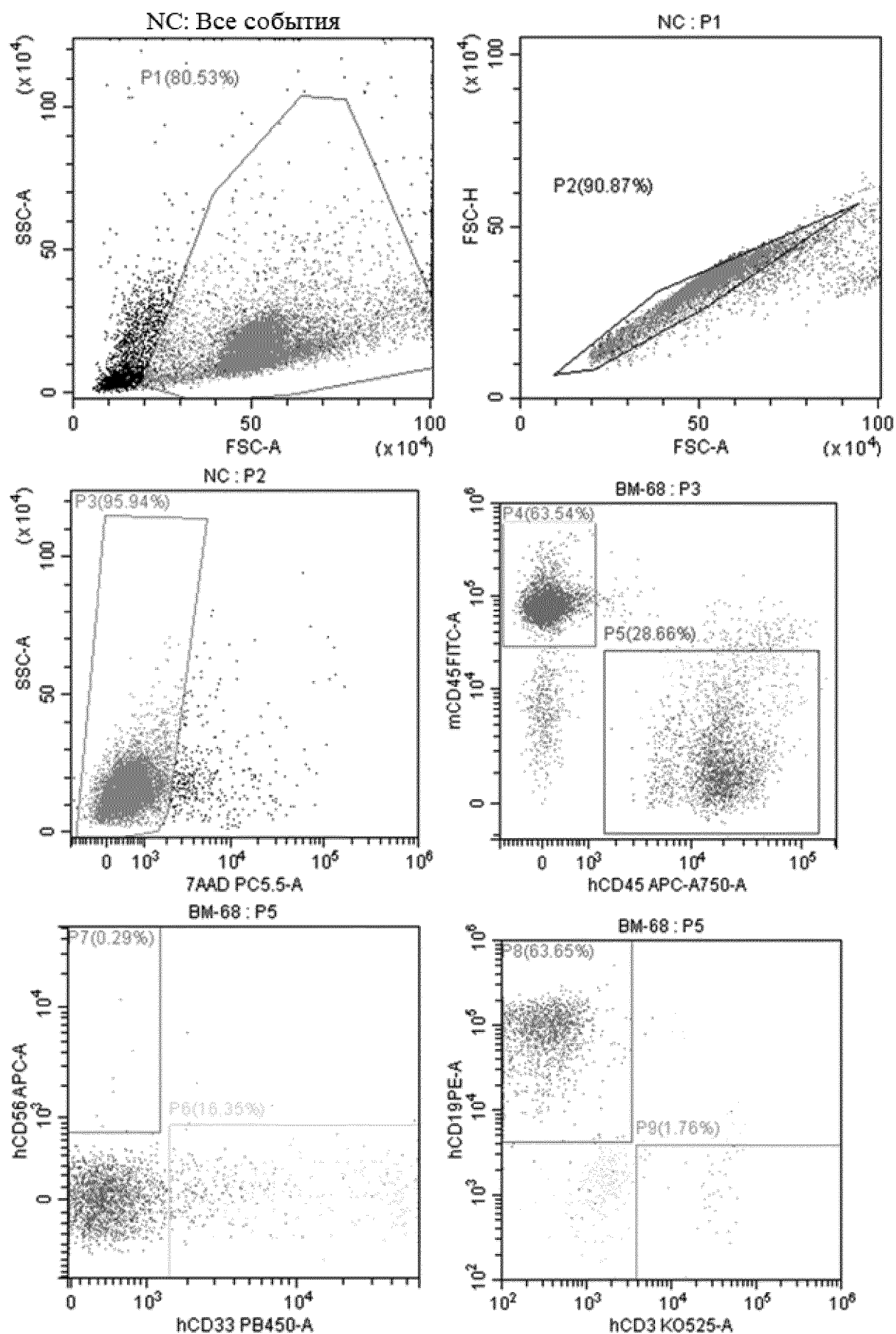
Фиг. 18D

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



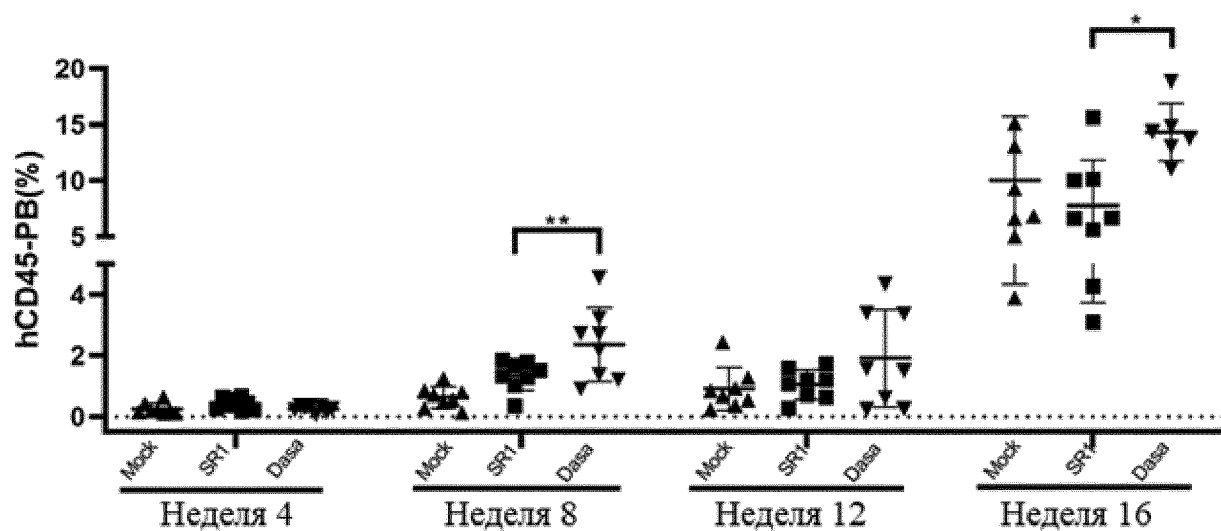
Фиг. 19

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ

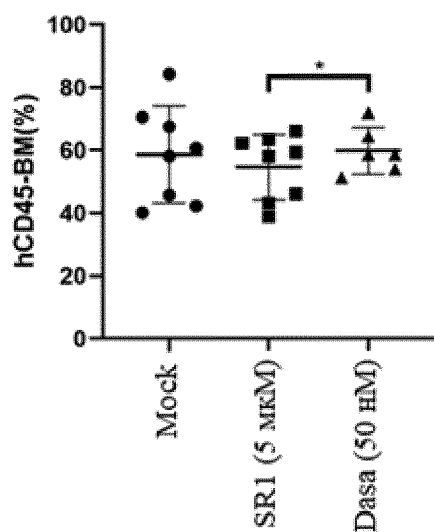


Фиг. 20

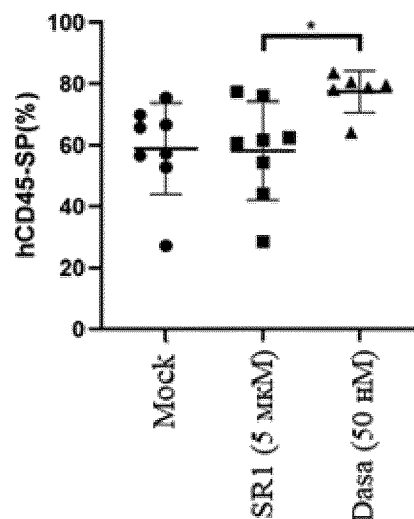
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТКИ И ИХ КОМБИНАЦИЯ



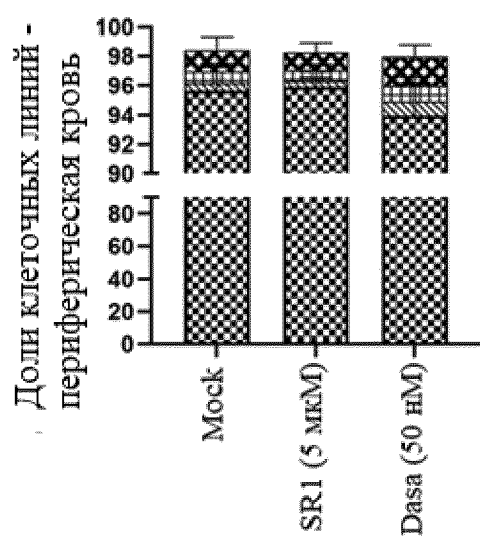
Фиг. 21А



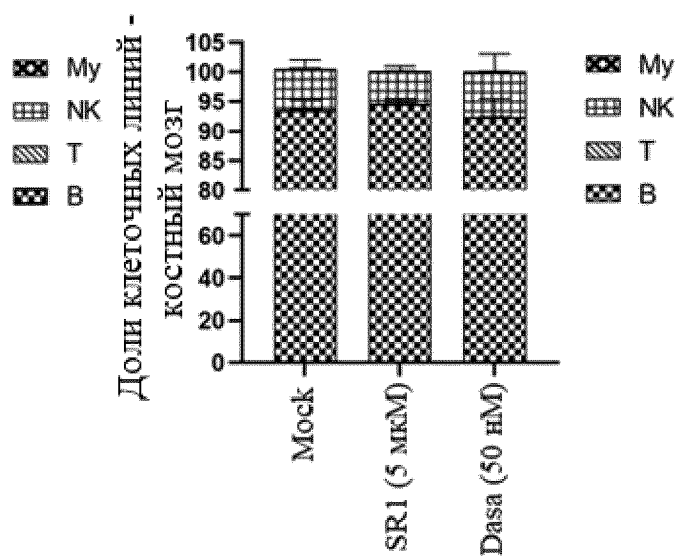
Фиг. 21В



Фиг. 21С

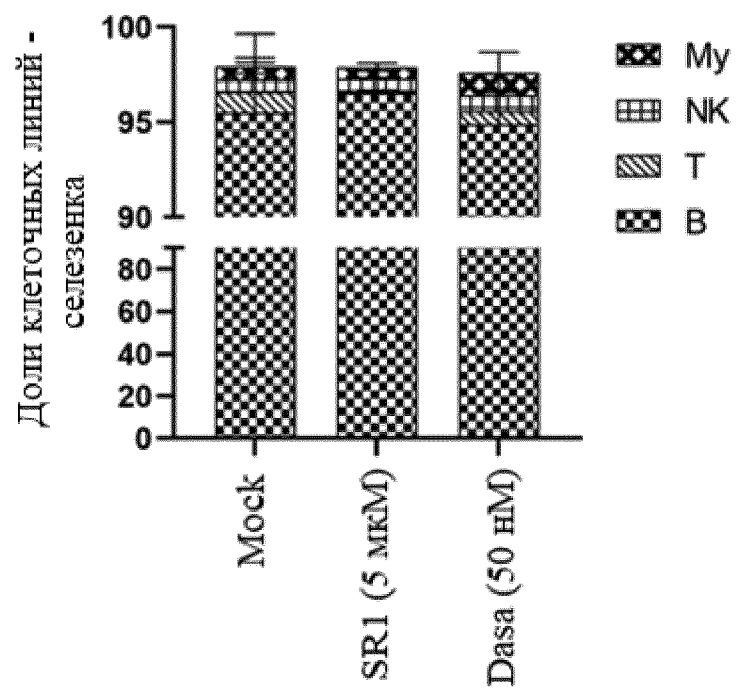


Фиг. 22А



Фиг. 22В

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ КОМБИНАЦИЯ



Фиг. 22С