



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113284** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 31/5585** (2006.01)**A61K 35/28** (2015.01)**C12N 5/078** (2010.01)**C12N 5/0735** (2010.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2013 09882	(72) Винахідник(и): Фрайсмут Міхаель (АТ), Цебедін-Брандль Єва-Марія (АТ), Бергмайр Крістіан (АТ), Хуссайн Фільца (АТ)
(22) Дата подання заявки:	13.01.2012	(73) Власник(и): СІФАРМ САРЛ , 26-28, rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg (LU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.01.2017	(74) Представник: Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11150835.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Trista E. North, Wolfram Goessling, Carl R. Walkley et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis / E. North Trista, Goessling Wolfram, Walkley Carl R., Lengerke Claudia, R. Kopani Kamden, M. Lord Allegra, J. Weber Gerhard, V. Bowman Teresa, Jang Il-Ho, Grosser Tilo, A. FitzGerald Garret, Q. Daley George, H. Orkin Stuart, I. Zon Leonard // Nature. - 2007 Jun 21. - vol. 447, no 7147. - P.1007-1011 Adams Gregor B., Alley Ian R., Chung Ung-il Haematopoietic stem cells depend on Gas-mediated signalling to engraft bone marrow / Nature // Gregor B. Adams, Ian R. Alley, Ung-il Chung, Karissa T. Chabner, Nathaniel T. Jeanson, Cristina Lo Celso, Emily S. Marsters, Min Chen, Lee S. Weinstein, Charles P. Lin, Henry M. Kronenberg, David T. Scadden. - 20.09.2001. - vol. 459. - P.103-107 Hoggatt J., Singh P., Sampath J., Pelus L.M. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation / Jonathan Hoggatt, Pratibha Singh, Janardhan Sampath, Louis M. Pelus // Blood. - 28.05.2009. - vol.113, no 22. - P.5444-5455 WO 2006/017169 A2, 16.02.2006 Crutchley D.J., Conanan L.B., Que B.G. Effects of prostacyclin analogs on the synthesis of tissue factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in human monocytic THP-1 cells / Crutchley D.J., Conanan L.B., Que B.G. // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 01.10.1994. - vol. 271, no 1. - P.446-451 WOLFRAM G. et al. Prostaglandin E2 Enhances Human Cord Blood Stem Cell Xenotransplants and Shows Long-Term Safety in Preclinical Nonhuman Primate Transplant Models / W. Goessling, R.S. Allen, X. Guan, P. Jin, N. Uchida, M. Dovey, J.M. Harris, M.E. Metzger, A.C. Bonifacio, Stroncek D., J. Stegner, M. Armant, T. Schlaeger, J.F. Tisdale, L.I. Zon, R.E. Donahue, T.E. North // CELL STEM CELL. - 2011. - vol. 8, no. 4. - P.445 - 458 WO 2011/015630 A1, 10.02.2011 Otsuka H., Akashi H., Murohara T. et al. The Prostacyclin Analog Beraprost Sodium Augments the Efficacy of Therapeutic Angiogenesis Induced by Autologous Bone Marrow Cells / H. Otsuka, H. Akashi, T. Murohara, T. Okazaki, S. Shintani, K. Tayama, K. Sasaki, T. Imaizumi, S. Aoyagi // Ann. Vasc. Surg. - 01.09.2006 - vol. 20, no 5. - P.646-652 Madonna R., Rinaldi L., Rossi C., Geng Y.J., De Caterina R. Prostacyclin improves transcatheter myocardial delivery of adipose tissue-derived stromal cells / R. Madonna, L. Rinaldi, C. Rossi, Y.-J. Geng, and R. De Caterina // Eur. Heart. J. - 2006 Sep. - vol. 27, no 17. - P.2054-2061 Ishii M., Numaguchi Y., Okumura K. et al. Mesenchymal stem cell-based gene therapy with prostacyclin synthase enhanced neovascularization in hindlimb ischemia / M. Ishii, Y. Numaguchi, K. Okumura, R. Kubota, X. Ma, R. Murakami, K. Naruse, T. Murohara // Atherosclerosis. - 2009-09-01. - vol. 206, no. 1. - P.109-118
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.01.2011	
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP	
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.11.2013, Бюл.№ 21	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.01.2017, Бюл.№ 1	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2012/050484, 13.01.2012	

(54) СПОСІБ ПОЛІПШЕНОГО ПРИЖИВЛЕННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу поліпшеного приживлення гемопоетичних стовбурових клітин шляхом попередньої обробки ex vivo, що включає стадію змішування зразка, що містить

UA 113284 C2

гемопоетичні стовбурові клітини, щонайменше з одним аналогом простагліну разом з неспецифічним цАМФ-активуючим агентом, переважно вибраним з холерного токсину й форсколіну для одержання суміші, стадію інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання Гальфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах, і необов'язково стадію виділення зазначених стимульованих клітин. Винахід також стосується композиції для ex vivo посиленого приживлення гемопоетичних стовбурових клітин.

Даний винахід пропонує новий спосіб поліпшеного приживлення гемопоетичних стовбурових клітин шляхом попередньої обробки *ex vivo*, що включає стадії одержання зразка, який містить гемопоетичні стовбурові клітини, додавання аналога простагліцину для одержання суміші, стадію інкубації зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимуляції G альфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах, і необов'язково виділення зазначених стимульованих клітин.

Додатково, надається композиція, що містить трепростиніл, для використання при лікуванні індивідумів, що зазнають трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Гемопоетичні стовбурові клітини (HSC) є первинними клітинами, здатними до регенерації всіх компонентів крові протягом життя індивідуума, урівноважуючи своє самовідновлення з диференціюванням клітин-нащадків. Місце розташування HSC переміщується в ході розвитку, і вони циркулюють протягом всього життя ссавців, входячи й виходячи із кровотоку, щоб зайняти нішу кісткового мозку в ході послідовних стадій хоумінгу, приживлення й утримання. Хоумінг є процесом, шляхом якого донорні стовбурові клітини потрапляють у кістковий мозок, а приживлення стовбурових клітин має на увазі їхній ріст у кістковому мозку.

Гемопоетичні стовбурові клітини мають лікувальні можливості завдяки своїй здатності відновлювати клітини крові й імунної системи у реципієнтів трансплантата. Крім того, HSC мають здатність утворювати клітини інших тканин, таких як мозок, м'язи й печінка. Методи аутологічної і алогенної трансплантації кісткового мозку людини в цей час використовуються в якості терапії таких захворювань, як лейкоз, лімфома, та інших небезпечних для життя захворювань. Для таких операцій повинна бути виділена велика кількість донорного кісткового мозку, щоб забезпечити достатню кількість HSC для приживлення.

Для заселення ніші кісткового мозку *in vivo* гемопоетичними стовбуровими клітинами необхідний G_{α_s}-перетворений сигнал (1). Ці недавні дані підтверджують більш ранні *in vitro* експерименти, що показали, що активація G_{α_s} сприяє виживанню й диференціюванню гемопоетичних стовбурових клітин (2,3). G_{α_s} являє собою єднальну гуаніновий нуклеотид α-субодиницю гетеротримірного G-білка, який стимулює всі 9 ізоформ мембранозв'язаної аденілатциклази ссавців. G_{α_s} може бути конститутивно активована *ex vivo/in vitro* за допомогою обробки клітин холерним токсином, оскільки холерний токсин АДФ-рибозилує каталітичний залишок аргініну (R^{186/187/201/202}, точний номер аргініну залежить від сплайс-варіанта G_{α_s}); інтактний залишок аргініну необхідний для гідролізу GTP і приводить до дезактивації G_{α_s} (4). Поліпшене приживлення дійсно може спостерігатися після попередньої обробки гемопоетичних стовбурових клітин холерним токсином: у кістковому мозку налічувалося приблизно у два рази більше (Lin⁺) клітин-попередників, якщо препарат стовбурових клітин був попередньо оброблений холерним токсином (1).

Однак для препаратів стовбурових клітин для пацієнтів, що зазнають трансплантації кісткового мозку, холерний токсин був би вкрай несприятливим. Холерний токсин (СТ), особливо його нетоксичний фрагмент пентамірної В субодиниці (СТВ), є мукозним ад'ювантом, що мають сильні імуномодулюючі властивості як *in vivo*, так і *in vitro*, і являє собою один з найбільш сильних мукозних імуногенів. Холерний токсин і СТВ викликають сильне утворення IgA антитіл у кишечнику й тривалу імунологічну пам'ять. На цій підставі СТВ став важливим компонентом недавно розроблених пероральних вакцин проти холери й діареї, викликані ентеротоксигенними *E. coli*. Сильну імуногенність СТ і СТВ у значній мірі можна пояснити їхньою здатністю зв'язуватися з рецепторами на поверхні слизової оболонки кишечника.

Додатково, протягом природного ходу інфекції пентамірна частина В молекули токсину зв'язується з поверхнею епітеліальних клітин кишечника й швидко ендоецитуються разом з А субодиницею. Будучи ендоецитованою, каталітично активна А-субодиниця відділяється від пентамірної частини В і проникає в клітину крізь пору, утворену В-субодиницею. Усередині клітини вона постійно рибозилує G_s альфа-субодиницю гетеротримірного G-білку, приводячи до конститутивної продукції цАМФ. Це, у свою чергу, приводить до секреції H₂O, Na⁺, K⁺, Cl⁻ і HCO₃⁻ у просвіт тонкого кишечника, що обумовлює швидку дегідратацію й інші особливості, обумовлені холерою. При внутрішньовенному введенні холерний токсин поглинається більшістю клітин (тільки деякі клітини захищені специфічними бар'єрами, таким як гематоенцефалічний бар'єр). Відповідно, при цьому буде спостерігатися збільшення цАМФ у більшості клітин тіла й безліч побічних ефектів (від тахікардії до вазодилатації, м'язового тремору, гіперглікемії і т.д.).

Таким чином, ці ефекти роблять холерний токсин недоцільним для медичного застосування відносно стимуляції гемопоетичних стовбурових клітин.

Однак, терапевтична значимість стимулювання стовбурових клітин є істотною при виконанні гетерологічної трансплантації кісткового мозку (тобто гемопоетичних стовбурових клітин, узятих

в імуносумісних донорів) і є стандартною процедурою, використовуваної для лікування людей, що страждають від лейкемії, для лікування людей з генетичними дефектами в компартменті клітин крові (наприклад, гемоглобінопатією, такою як таласемія; порушеннями функції нейтрофільних гранулоцитів і т.д.).

5 Це також важливо у зв'язку з тим, що аутологічна трансплантація кісткового мозку є стандартною процедурою, яка використовується для того, щоб збільшити терапевтичне вікно цитотоксичних лікарських засобів, і тим самим уможливити високодозову інтенсивну хіміотерапію (5,6).

10 Гемопоетичні стовбурові клітини експресують усі чотири рецептори простагландину E (EP1-4). Попередня обробка гемопоетичних стовбурових клітин (диметильованим) простагландіном E2 збільшує їхнє приживлення (7,8). Цей вплив опосередковує канонічним G_{α_s} -залежним шляхом передачі сигналу, оскільки цАМФ-індукована активація протеїнкінази A (PKA) синергічна з Wnt-залежними сигналами стабілізації β -катеніну (9).

15 Імплантація мононуклеарних клітин (MNCs) аутологічного кісткового мозку (BM) може бути поліпшена за допомогою берапросту натрію на моделі кролика згідно Otsuka et al. Метою цього дослідження була підтримка розвитку артерій при периферичній ішемії й ішемії міокарду. Гемопоетичні стовбурові клітини, однак, являють собою специфічний тип клітин кісткового мозку (16).

20 Комбінація терапії стовбуровими клітинами й фармакологічного лікування описане Madonna et al., коли простациклін випробовували в ADSC міокардіальному приживленні після внутрішньокоронарного введення (17).

Ishii M. et al. розкривають, що вповільнене вивільнення простацикліну збільшує проангіогенну функцію мезенхімальних стовбурових клітин і ріст м'язових клітин в ішемічній тканині (18).

25 WO2006/017169 описує імплантуємий сенсор з біологічно сумісним покриттям для контролювання росту тканини, яке може містити, серед іншого, аналоги простацикліну.

Інгібуюча дія цикапросту або ілопросту на синтез тканинного фактора, фактора некрозу пухлини й інтерлейкіну-1 β у клітинах THP1 людини описане в Crutchley D. et al. (19).

30 Локалізація стовбурових клітин після трансплантації є критичним показником успішності трансплантації. У цей час для трансплантації необхідно велика кількість стовбурових клітин, оскільки стовбурові клітини не завжди успішно приживаються в кістковому мозку, і є довгий період аплазії кісткового мозку, що приводить до зниження зрілих клітин крові.

Таким чином, дотепер затребуваним є надання способів і композицій для стимуляції HSC з метою збільшення хоумінгу, приживлення й утримання виділених HSC у кістковомозкових нішах суб'єктів, що зазнають трансплантації кісткового мозку.

35 Дана проблема вирішується за допомогою варіантів здійснення дан-ого винаходу.

Короткий опис винаходу

40 Зненацька було показано, що синтетичні аналоги простацикліну I2 (PGI₂), наприклад, трепростиніл, ілопрост, берапрост і цикапрост, здатні збільшувати рівень цАМФ у гемопоетичних стовбурових клітинах, що збільшує приживлення стовбурових клітин у кістковому мозку.

Аналог простацикліну, такий як трепростиніл, забезпечує кілька переваг у порівнянні із простагландіном E2:

45 (i) це стабільний аналог простацикліну/PGI₂, який також стимулює EP2- і EP 4-рецептори (10). Таким чином, він має можливість стимулювати безліч G_s -сполучених рецепторів без залучення інгібуючих (т.б., G_i -сполучених) EP₃-рецепторів, які інгібують нагромадження цАМФ. Для останнього повним агоністом є диметил-PGE₂ (1). Напроти, трепростиніл є лише низькоафінним агоністом EP₃-рецепторів.

50 (ii) так як вони є метаболічно більш стабільними, ніж природні простацикліни, трепростиніл, ілопрост, берапрост і цикапрост можуть викликати більш тривалі ефекти при застосуванні in vivo і, таким чином, підтримувати більш ефективне приживлення у кістковому мозку.

(iii) тривале/повторне введення аналога простацикліну, зокрема, трепростинілу, ілопросту, берапросту й цикапросту, добре переноситься.

55 Даний винахід надає новий спосіб поліпшеного приживлення гемопоетичних стовбурових клітин шляхом попередньої обробки ex vivo стадії, що включає:

a) одержання зразка, що містить гемопоетичні стовбурові клітини, і

b) додавання, щонайменше, одного аналога простацикліну для одержання суміші,

60 c) інкубації зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимуляції G альфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах, і необов'язково

d) виділення й необов'язково очищення зазначених стимульованих клітин.

Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу аналог простацикліну вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту й берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей.

Відповідно до винахідницького способу також може надаватися суміш стимульованих і нестимульованих стовбурових клітин.

5 Зокрема, зразок є кістковим мозком. Стовбурові клітини можуть походити з будь-якого відомого джерела, зокрема, вони можуть бути HSC, виділеними з периферичної крові, пуповинної крові або кісткового мозку.

Відповідно до винаходу трепростиніл може бути похідним, обраним із групи кислотних похідних, проліків, поліморфів або ізомерів.

10 Аналогічно, ілопрост, цикапрост або берапрост можуть бути похідними із групи кислотних похідних, проліків, їхніх поліморфів або ізомерів.

Відповідно до альтернативного варіанта здійснення винаходу зразок може бути змішаний, щонайменше, з одним аналогом простацикліну разом з неспецифічним цАМФ-активуючим агентом, переважно обраним з холерного токсину й форсколіну.

15 Відповідно до окремого варіанта здійснення композиція, що містить аналог простацикліну, надається для використання при лікуванні індивідуумів, що страждають від захворювань кісткового мозку, які можуть зазнати трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

20 Відповідно до окремого варіанта здійснення винаходу аналог простацикліну вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту або берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей.

Відповідно до кращого варіанта здійснення композиція містить трепростиніл.

Зокрема, індивідууми є індивідуумами, що страждають від лейкозу, дефекту компартменту клітин крові, трансплантації кісткового мозку після хіміотерапії або опромінення.

25 Відповідно до додаткового варіанта здійснення винаходу дефект компартменту клітин крові є гемоглобінопатією або порушенням функції нейтрофільних гранулоцитів.

Композиція винаходу також може використовуватися для лікування індивідуумів, що страждають від захворювань кісткового мозку, які зазнають трансплантації гемопоетичних клітин, шляхом введення аналога простацикліну протягом, щонайменше, семи днів після трансплантації кісткового мозку. Зокрема, використовується аналог простацикліну, обраний із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту й берапросту, більш конкретно, трепростиніл.

Відповідно до додаткового варіанта здійснення надається композиція, що містить аналог простацикліну й стимульовані гемопоетичні стовбурові клітини.

35 Відповідно до додаткового варіанта здійснення надається композиція, що містить трепростиніл або його фармацевтично прийнятну сіль і стимульовані гемопоетичні стовбурові клітини.

Зокрема, для застосування на тваринах або в дослідженнях на тваринах композиції винаходу можуть додатково містити форсколін або холерний токсин.

Винахідницькі композиції можуть бути фармацевтичними композиціями.

40 Винахідницька композиція може вводиться будь-яким способом, відомим у даній області техніки, зокрема, вона може бути приготовлена для внутрішньовенного або підшкірного введення.

Аналог простацикліну може надаватися в перорально доступній формі, обраний із групи форм із тривалим вивільненням, таблеток або капсул.

45 Кількість аналогів простацикліну залежить від терапевтичного застосування або способу приготування стимульованих HSC. Як правило, для терапевтичного застосування ефективна кількість трепростинілу становить, щонайменше, 1,0 нг/кг ваги тіла.

Фігури

50 Фігура 1. Дослідження Lin⁺ клітинної популяції, утриманої магнітними частками. Вісь x (позначена APC-C7-A) показує флуоресценцію, зареєстровану за допомогою суміші антитіл до маркерів напрямку диференціювання: CD3ε для Т-клітин, CD45R(=B220) для В-клітин, CD11b і Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) для мієлоїдного (моноцитарного/гранулоцитарного) напрямку диференціювання, Ter-119 для еритроїдного напрямку диференціювання. Вісь y являє собою флуоресценцію, зареєстровану відносно антитіл до рецептора мишачого фактора стовбурових клітин c-Kit. Очевидно, що лівий верхній квадрант (який показує клітини, негативні за c-Kit⁺ і маркером напрямку диференціювання) збіднений клітинами.

60 Фігура 2. Дослідження Lin⁻ клітинної популяції, яка не зв'язалася з магнітними частками. Як на Фіг. 1, вісь x (позначена APC-C7-A) указує флуоресценцію, зареєстровану за допомогою суміші антитіл до маркерів напрямку диференціювання: CD3ε для Т-клітин, CD45R(=B220) для веток, CD11b і Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) для мієлоїдного (моноцитарного/гранулоцитарного) напрямку

диференціювання, Ter-119 для еритроїдного напрямку диференціювання. Вісь у являє собою флуоресценцію, зареєстровану відносно антитіл до рецептора мишачого фактора стовбурових клітин c-Kit. Очевидно, що нижній квадрант (який показує клітини, негативні за c-Kit і позитивні за маркерами напрямку диференціювання) збіднений клітинами, і що клітини переважно виявляються у верхньому лівому квадранті, де мали очікувати позитивні за c-Kit і негативні за маркерами напрямку диференціювання клітини.

Фігура 3 показує дослідження Lin^+ (Фіг. 3A) і Lin^- клітинних популяцій (Фіг. 3B) на наявність Sca-1 і c-Kit. Панелі 3A і 3B демонструють клітини, утримані на магнітних частках (охарактеризовані на Фіг. 1), що й перебувають в елюаті (охарактеризовані на Фіг. 2). Вони були пофарбовані, як зазначено в розділі Методи, і проаналізовані на наявність одночасно c-Kit (PerCP-Cy5-5-A, вісь y) і Sca-1 (PE-Cy7-A, вісь x). Очевидно, що позитивні за маркерами напрямку диференціювання клітини, проаналізовані на панелі A, виявляються в лівому нижньому квадранті, т.б. вони позбавлені як c-Kit, так і Sca-1. Напроти, клітини на Панелі B переважно перебувають у верхніх квадрантах, т.б. вони мають високі рівні або c-Kit (верхній лівий квадрант) або й c-Kit і Sca-1 (верхній правий квадрант), як і передбачалося для популяції гемопоетичних стовбурових клітин і некомітованих попередників.

Фігура 4. Нагромадження циклічного АМФ в (Lin^- , c-Kit $^+$, Sca-1 $^+$) гемопоетичних стовбурових клітинах після стимуляції форсколіном, трепростинілом, ілопростом, берапростом або комбінацією форсколіну й простаноїдів. Lin^- клітини (7×10^5 /аналіз) інкубували у присутності [^3H]аденіну для того, щоб попередньо метаболічно позначити пул аденінових нуклеотидів відповідно до Методів. Клітини інкубували під час відсутності (лівий стовпчик, позначений 0) і в присутності зазначених сполук. Накопичений [^3H]цАМФ очищали шляхом послідовної хроматографії на колонках з Dowex AG50-X8 і оксидом алюмінію й визначали кількість методом рідинно-сцинтиляційних вимірів. Дані є середнім \pm S.D. (середньоквадратичне відхилення) (n=4).

Фігура 5. Крива концентрація-відповідь для індукованого трепростинілом нагромадження цАМФ в (Lin^- , c-Kit $^+$, Sca-1 $^+$) гемопоетичних стовбурових клітинах. Умови аналізу відповідали позначенням на Фіг. 4. Дані є середнім \pm S.D. (n=2).

Фігура 6. Ex vivo обробка гемопоетичних стовбурових клітин трепростинілом приводить до поліпшеного приживлення кісткового мозку в летально опромінених мишей. Гемопоетичні стовбурові клітини, приготовлені як на Фіг. 3, попередньо обробляли зазначеними сполуками (FSK, форсколін) відповідно до Методів. Кількість лейкоцитів була визначена за допомогою FACS. Зазначене число досліджених тварин.

Фігура 7. Відношення Ly5.2^+ і Ly5.1^+ позитивних клітин крові через 16 тижнів після трансплантації кісткового мозку. Ly5.1^+ клітини були попередньо оброблені СТХ або трепростинілом і форсколіном.

Фігура 8. Відношення Ly5.2^+ і Ly5.1^+ позитивних клітин крові через 16 тижнів після трансплантації кісткового мозку. Ly5.2^+ клітини були попередньо оброблені СТХ або трепростинілом і форсколіном.

Докладний опис винаходу

Надані методи й способи збільшення хоумінгу й приживлення HSC у мікрооточенні кісткового мозку мають цілком визначене біологічне й медичне значення. Локалізація стовбурових клітин після трансплантації вкрай важлива для клінічних процедур, тому що на сьогоднішній день для клінічної трансплантації потрібні величезні кількості стовбурових клітин, що приводить, таким чином, до необхідності більших кількостей донорських клітин. Такі способи також досить корисні, оскільки значне число аутологічних донорських трансплантатів містить недостатню кількість стовбурових клітин, або HSC. Також пацієнти часто не можуть знайти гістосумісних донорів, що підкреслює необхідність способів і композицій для зниження числа HSC, необхідних для успішної трансплантації. Можливість поліпшити хоумінг і приживлення HSC in vitro або ex vivo дає можливість відбору меншої кількості клітин у донорів, тим самим зменшуючи час і дискомфорт, пов'язані зі збором кісткомозкових/периферичних стовбурових клітин, і збільшуючи число добровільних донорів HSC.

Даний винахід, таким чином, надає новий спосіб поліпшеного приживлення HSC шляхом попередньої обробки HSC ex vivo, що включає стадії: а) одержання зразка, що містить гемопоетичні стовбурові клітини; б) додавання, щонайменше, одного аналога простагліну для одержання суміші; с) інкубації зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимуляції G альфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах; д) необов'язково, виділення зазначених стимульованих клітин або використання зазначеної суміші, що містить зазначені стимульовані клітини, для подальшого використання, наприклад, для лікування або трансплантації.

Зокрема, аналог простацикліну вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, берапросту й цикапросту або їх фармацевтично прийнятних солей.

Трепростиніл є синтетичним аналогом простацикліну. Трепростиніл комерційно доступний як Ремодулін™. Трепростиніл є моноватрієвою сіллю (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-гексагідро-2-гідрокси-1-[(3S)-3-гідроксиоктил]-1H-бенз[ф]інден-5-іл]окси]оцтової кислоти.

Ілопрост комерційно доступний як "Іломедин" і є 5-[(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-гідрокси-6-[(E)-(3S,4RS)-3-гідрокси-4-метил-1-октен-6-ініл]-бі-цикло[3.3.0]октан-3-іліден]-валеріановою кислотою.

Берапрост є 2,3,3a,8b-тетрагідро-2-гідрокси-1-(3-гідрокси-4-метил-1-октен-6-ініл)-1H-циклопента(б)бензофуран-5-бутановою кислотою.

Цикапрост є 2-[(2E)-2-[(3aS,4S,5R,6aS)-5-гідрокси-4-[(3S,4S)-3-гідрокси-4-метилнону-1,6-дініл]-3,3a,4,5,6,6a-гексагідро-1H-пентален-2-іліден]етокси]-оцтовою кислотою.

Відповідно до винахідницького варіанта здійснення, щонайменше, два, зокрема, щонайменше, три різні аналоги простацикліну можуть використовуватися для зазначеного способу. Альтернативно, два, три, чотири, п'ять або шість, або навіть більше різних аналогів простацикліну можуть використовуватися для зазначеного способу. Даний спосіб переважно надає стимульовані клітини, які можуть безпосередньо вводитися індивідуумам і які не проявляють яких-небудь небажаних побічних ефектів завдяки більшим кількостям неселективних цАМФ-стимулюючих агентів.

Відповідно до додаткового варіанта здійснення винаходу надається спосіб поліпшеного приживлення гемопоетичних стовбурових клітин за допомогою попередньої обробки ex vivo, що включає наступні стадії:

- a. одержання зразка, що містить гемопоетичні стовбурові клітини й
- b. додавання аналога простацикліну й форсколіну для одержання суміші
- c. інкубації зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимуляції G альфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах і необов'язково
- d. виділення зазначених стимульованих клітин і необов'язково
- e. виділення й/або концентрування зазначених стимульованих клітин.

Відповідно до окремого варіанта здійснення винаходу співвідношення аналога простацикліну й форсколіну може приблизно становити 1:3. HSC, оброблені форсколіном і аналогами простацикліну, можуть бути очищені перед реїмплантацією, однак, ці HSC також можуть бути реїмплантовані без додаткових стадій очищення, тому що невеликі кількості форсколіну можуть бути присутніми, але не викликати які-небудь негативні побічні ефекти.

Альтернативно, до стовбурових клітин може додаватися комбінація трепростинілу з одним із числа ілопросту, берапросту або цикапросту. Альтернативно, трепростиніл може додаватися у комбінації з більш ніж одним або, наприклад, із двома, трьома, чотирма або п'ятьма іншими аналогами простацикліну, наприклад, без обмеження, ілопростом, берапростом або цикапростом або їх фізіологічно прийнятними солями.

Відповідно до окремого варіанта здійснення для використання при дослідженнях на тваринах або лікуванні тварин, агент, що підсилює цАМФ (енхансер), такий як форсколін і/або холерний токсин, може бути додатково доданий до HSC, або суміші HSC/трепростиніл, ілопрост, цикапрост або берапрост до інкубації.

Період часу, необхідний для стимулювання G альфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах, може бути обмірюваний за допомогою відомих методів, наприклад шляхом вимірів цАМФ, яких існує безліч варіацій: RIA, метод резонансного переносу енергії флуоресценції (FRET) з EPAC (epac1) (Ponsiouen B. et al., EMBO reports, 5, 12, 1176-1180 (2004)), радіохімічні методи і т.д. Стимульовані клітини, у яких має місце G альфа_s-шлях передачі сигналу, можуть бути відібрані або відділені від нестимульованих клітин способами, відомими в даній області техніки, такими як цАМФ-репортер на основі FRET.

Відповідно до варіанта здійснення винаходу час інкубації становить приблизно від 1 до 60 хв., переважно приблизно від 2 до 30 хв.

цАМФ-залежний шлях є шляхом, необхідним для надання сприяння приживленню гемопоетичних стовбурових клітин. Винахідниками було показано, що аналог простацикліну здатний викликати підвищення цАМФ у гемопоетичних стовбурових клітинах. Це досягається за рахунок активації безлічі рецепторів, т.б. IP- і EP-рецепторів, що призводить до підвищення G альфа_s-передачі сигналу. Відповідно, аналоги простацикліну, подібні трепростинілу, ілопросту, цикапросту або берапросту більш ефективно збільшують рівень цАМФ.

Відповідно до конкретного варіанта здійснення трепростиніл є кращим аналогом простацикліну, використовуваним відповідно до способу даного винаходу.

Альтернативно, у певних способах і композиціях винаходу також може бути доданий,

щонайменше, один агент, обраний з енхансера циклічного АМФ (цАМФ) або ліганду рецептора простагланліну EP. Приклади енхансерів цАМФ включають, але не обмежуються цим, дибутирил цАМФ (ДВцАМФ), форболовий ефір, форсколін, скларелін, 8-бром-цАМФ, холерний токсин (СТ), амінофілін, 2,4 динітрофенол (DNP), норепінефрин, епінефрин, ізопротеренол, ізобутилметилксантин (IBMX), кофеїн, теофілін (диметилксантин), дофамін, роліпрам, простагландин Е₁, простагландин Е₂, гіпофізарний активуючий аденілатциклазу поліпептид (РАСАР) і вазоактивний поліпептид кишечника (VIP), поряд з іншими, відомими в даній області техніки, можуть бути додані до стовбурових клітин, або сумішей стовбурові клітини/трепростиніл або стовбурові клітини/трепростиніл, ілопрост, цикапрост і/або берапрост перед інкубацією. Приклади енхансерів цАМФ також включають цАМФ і аналоги цАМФ, такі як sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS), у числі інших.

Відповідно до окремого варіанта здійснення винаходу форсколін і/або холерний токсин або А субодинаця холерного токсину додатково додаються до стовбурових клітин або до суміші стовбурові клітини/трепростиніл перед інкубацією.

В окремому варіанті здійснення зазначені енхансери цАМФ використовуються для проведення обробки стовбурових клітин тварин або для проведення досліджень на тваринах з урахуванням приживлення стовбурових клітин.

Щодо аналогів простагланліну, відповідно до даного винаходу термін "аналоги простагланліну" включає також похідні й аналоги зазначених речовин.

Терміни "аналог" або "похідне" відносяться до хімічної молекули, яка подібна з іншою хімічною речовиною за структурою й функцією окремим елементом, що часто структурно відрізняється, або групою, яка може відрізнятися внаслідок модифікації більш, ніж однієї групи (наприклад, 2, 3 або 4 груп), якщо вона зберігає ту ж саму функцію як вихідна хімічна речовина. Такі модифікації є звичайними для фахівців і включають, наприклад, додаткові або заміщені хімічні фрагменти, такі як складні ефіри або аміди кислоти, захисні групи, такі як бензильна група для спирту або тіолу, і тре-бутоксилкарбонільні групи для аміну. Також включаються модифікації алкільних бічних ланцюгів, такі як алкільні заміщення (наприклад, метил, диметил, етил і т.д.), модифікації рівня насиченості й ненасиченості бічних ланцюгів і введення модифікованих груп, таких як заміщений феніл і феноксигрупа. Похідні також можуть включати кон'югати, такі як молекули біотину або авідину, ферменти, такі як пероксидаза хрину й таке інше, і радіоізотопно-мічені, біолоюмінесцентні, хемолюмінесцентні або флуоресцентні фрагменти. Крім того, фрагменти можуть бути додані до описаних тут речовин для зміни їх фармакокінетичних властивостей, наприклад, для збільшення часу напівжиття *in vivo* або *ex vivo*, або збільшення їх здатності проникати в клітину, у числі інших бажаних властивостей. Також включаються проліки, відомі як посилюючі численні бажані властивості фармацевтичних препаратів (наприклад, розчинність, біологічну доступність, властивості, необхідні при виробництві, і т.д.).

Термін "похідне" також включає зміни вихідної послідовності, включаючи додавання, видалення й/або заміщення, які надають функціонально еквівалентні або функціонально поліпшені молекули.

Відповідно до окремого варіанта здійснення винаходу похідний трепростинілу вибирають із групи кислотних похідних трепростинілу, проліків трепростинілу, поліморфів трепростинілу або ізомерів трепростинілу.

Аналогічно, ілопрост, цикапрост або берапрост можуть бути похідними із групи кислотних похідних, проліків, їхніх поліморфів або ізомерів.

Термін "гемопоетичні стовбурові клітини" (HSC) або більш загальний термін "стовбурові клітини" слід розуміти як еквівалентні терміни в описі даного винаходу, які звичайно відносяться до плюрипотентних або мультипотентних "стовбурових клітин", які дають початок типам клітин крові, включаючи мієлоїдний (наприклад, моноцити й макрофаги, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, еритроцити, мегакаріоцити/тромбоцити, дендритні клітини) і лімфоїдний напрямки диференціювання (наприклад, Т-клітини, В-клітини, NK-клітини), і інших, відомих у даній області техніки. "Стовбурові клітини", як правило, характеризуються здатністю утворювати безліч типів клітин (т.б. мультипотентністю) і здатністю до самовідновлення. Однак також можуть включатися олігопотентні й уніпотентні попередники. "Гемопоез" звичайно відноситься до процесу клітинного диференціювання або утворення спеціалізованих клітин крові з HSC. У ході розвитку гемопоезу переміщується з ембріональної печінки в кістковий мозок, який потім залишається місцем гемопоезу протягом всієї зрілості. Після усталення в кістковому мозку HSC не розподіляються безладно по всій порожнині кістки. У значній мірі, HSC звичайно виявляються в безпосередній близькості до ендостальної поверхні. Число більш зрілих стовбурових клітин збільшується при віддаленні від поверхні кістки.

Гемопоетичні тканини містять клітини, здатні до довгочасної й короткочасної регенерації, а також комітовані мультипотентні, олігопотентні й уніпотентні клітини-попередники.

Зокрема, зразок, що містить HSC, може являти собою кістковий мозок.

HSC можуть бути отримані відомими способами з будь-якого джерела, яке, як відомо, містить HSC, зокрема, з периферичної крові, пуповини або пуповинної крові, плаценти й кісткового мозку. Альтернативно, також можливі такі джерела, як ембріональна печінка, ембріональна селезінка й аорта-гонадо-мезонефрос тварин. HSC людського походження є кращими для способів і композицій винаходу. Наприклад, HSC можна знайти в кістковому мозку дорослих, включаючи стегнові кістки, шийку стегна, ребра, грудину й інші кістки. HSC можна одержати безпосередньо шляхом відбору зі стегна за допомогою голки й шприца або із крові, часто після попередньої обробки цитокінами, такими як G-CSF (гранулоцитарні колоніє-стимулюючі фактори), які викликають вивільнення клітин з кістково-мозкового компартменту.

HSC можуть бути ідентифіковані відповідно до певних фенотипічних або генотипічних маркерів. Наприклад, HSC можуть бути ідентифіковані за їхнім малим розміром, відсутністю маркерів напрямку диференціювання (lin), низькому фарбуванню (бічна популяція) вітальними барвниками, такими як родамін 123 (rho¹⁰) або Hoechst 33342, і присутності різних антигенних маркерів на їхній поверхні, багато з яких належать до групи кластера диференціювання (наприклад, CD5, CD11b, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4, Ter-119 і c-kit). HSC переважно є негативними за маркерами, які звичайно використовуються для визначення напрямку диференціювання, і, таким чином, часто відносяться до lin(-) клітин. Більша частина HSC людини може бути охарактеризована як CD5⁺, CD45R (B220)⁺, CD11⁺, GR-1⁺, CD34⁺, CD59⁺, Thy/CD90⁺, CD38^{low}, C-kit/CD117⁺ і lin(-). Однак, не всі стовбурові клітини враховуються за допомогою цих комбінацій, оскільки певні HSC є CD347⁺ і CD38⁺. Також деякі дослідження припускають, що на поверхні найбільш ранніх стовбурових клітин може бути відсутній c-kit.

Для очищення lin(-) HSC за допомогою проточної цитометрії, або FACS, може використовуватися набір антитіл до маркерів напрямку диференціювання зрілих клітин відносно виснаження lin(+) клітин або пізніх мультипотентних попередників (MPP), включаючи, наприклад, антитіла до CD3ε, CD5, CD45R, CD11b, CD16, GR-1, 7-4 і Ter-119, CD 13, CD32 і CD33, CD71, CD 19, CD61, Mac-1 (CD11b/CD18), Gr-1, 117Ra, CD3, CD4, CD5 і CD8 у числі інших, відомих у даній області техніки. У даній області техніки відомі додаткові способи очищення, наприклад, способи, що використовують певні характерні риси "сигнальних молекул активації лімфоцитів" (SLAM) сімейства молекул клітинної поверхні.

HSC, будь то клітини з пуповинної крові, кісткового мозку, периферичної крові або іншого джерела, можуть рости або розмножуватися в будь-якому підходящому, комерційно доступному або виготовленому на замовлення певному середовищі, із сироваткою або без сироватки. HSC з людського джерела являють собою кращі варіанти здійснення винаходу. Наприклад, у певних варіантах здійснення в безсировоточному середовищі може застосовуватися альбумін і/або трансферин. Крім того, можуть бути включені цитокіни, такі як Flt-3 ліганд, фактор стовбурових клітин (SCF) і тромбопоетин (TPO), у числі інших. HSC також можуть вирощуватися в судинах, таких як біореактори. Середовище, що підходить для ex vivo експансії HSC, також може містити підтримуючі HSC клітини, такі як стромальні клітини (наприклад, лімфоретикулярні стромальні клітини), які можуть бути отримані, наприклад, при дезагрегації лімфоїдної тканини, і які демонструють підтримку in vitro, ex vivo і in vivo збереження, росту й диференціювання HSC, а також їх нащадків.

"Пуповинна кров" або "кров з пупочної вени" звичайно має відношення до відносно невеликої кількості крові (приблизно до 180 мл), отриманої від немовляти, яка вертається в неонатальну циркуляцію. Пуповинна кров багата HSC і може бути зібрана й збережена для наступного використання відповідно до методів, відомих у даній області техніки.

Терміни "ex vivo" або "in vitro" відносяться до активностей, що мають місце поза організмом, таких як експериментальні роботи або вимірювання, зроблені в або на живій тканині в штучному навколишньому середовищі поза організмом, переважно з мінімальними змінами природних умов. У деяких варіантах здійснення такі тканини або клітини можуть бути зібрані й заморожені, і пізніше розморожені для обробки ex vivo. Експерименти з культурою тканини або процедури, що тривають довше декількох днів з використанням живих клітин або тканини, у більшості випадків прийнято вважати процедурами "in vitro", хоча цей термін може використовуватися взаємозамінним чином з терміном ex vivo. Перерахування "ex vivo уведення", "ex vivo обробка" або "ex vivo терапевтичне використання" відносяться в основному до медичних процедур, у яких один або більше органів, клітин або тканин отримані від живого або тільки що померлого суб'єкта, необов'язково очищені/збагачені, піддані обробці або операції з метою вплинути на

стовбурові клітини (наприклад, стадія ex vivo уведення, яка припускає інкубацію клітин з композицією даного винаходу для збільшення здатності HSC прищеплюватися), і потім уведені тому ж самому або іншому живому суб'єктові після необов'язкової обробки або процедури.

Такі ex vivo терапевтичні варіанти застосування також можуть включати необов'язкову стадію in vivo обробки або методичну стадію, таку як уведення композиції винаходу один або більше разів живому суб'єктові після введення органа, клітин або тканини. Для цих варіантів здійснення передбачається й місцеве, і системне застосування відповідно до добре відомих у даній області техніки методами. Кількість трепростинілу або кількість суміші, що містить трепростиніл і стимульовані стовбурові клітини, необов'язково разом з додатковими засобами, що вводиться суб'єктові, залежить від характерних рис цього суб'єкта, таких як загальний стан здоров'я, вік, стать, вага тіла й переносимість лікарських засобів, а також ступінь, вага й тип реакції на трепростиніл і/або клітинний трансплантат.

Відповідно до конкретного варіанта здійснення винаходу композиція, що містить аналог простацикліну надається для використання при лікуванні індивідумів, що зазнають трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Відповідно до кращого варіанта здійснення композиція містить аналог простацикліну, обраний із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту й берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей, конкретніше, вона містить трепростиніл.

Винахідницька композиція також може містити трепростиніл разом з одним або більше з числа ілопросту, цикапросту або берапросту. Альтернативно, композиція може містити ілопрост у комбінації з одним або більше з числа трепростинілу, цикапросту або берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей. Альтернативно, композиція може містити берапрост у комбінації з одним або більше з числа трепростинілу, цикапросту або ілопросту, або їх фармацевтично прийнятних солей. Альтернативно, композиція може містити цикапрост у комбінації з одним або більше з числа трепростинілу, берапросту або ілопросту або їх фармацевтично прийнятних солей.

Зазначені суб'єкти можуть страждати від якої-небудь хвороби кісткового мозку, т.б. захворювання, при якому нормальна архітектура кісткового мозку «зміщена» зловласними новоутвореннями, апластичною анемією або інфекціями, що призводять до зниження продукції клітин крові й тромбоцитів. Зазначені захворювання кісткового мозку можуть являти собою, наприклад, лейкоз, дефект компартменту клітин крові або необхідність трансплантації кісткового мозку після хіміотерапії або лікування опроміненням.

Конкретніше, дефект компартменту клітин крові може бути гемоглобінопатією, подібною до таласемії, або порушеннями функції нейтрофільних гранулоцитів. Крім того, цей винахід передбачає використання для лікування індивідумів, що страждають від захворювання кісткового мозку, наприклад, внаслідок хіміотерапії або опромінення, і при цьому, зазнають трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, шляхом уведення, щонайменше, одного аналога простацикліну протягом обмеженого періоду часу після трансплантації кісткового мозку.

Лікування суб'єктів, що зазнають трансплантації кісткового мозку, з використанням, щонайменше, одного аналога простацикліну, щонайменше, одного аналога простацикліну разом з одним або більше, зокрема, двома, більш конкретно, трьома енхансерами цАМФ або суміші, що містить, щонайменше, один, зокрема два, більш конкретно три аналоги простацикліну, і стимульованих стовбурових клітин, необов'язково разом з додатковими засобами, такими як один або більш енхансерів цАМФ, також розглядається даним винаходом.

Конкретніше, енхансер цАМФ може бути форсколіном.

Щонайменше, один аналог простацикліну може використовуватися для поліпшення приживлення людських HSC під час трансплантації кісткового мозку або після відновлення кісткового мозку з використанням HSC. Прискорене приживлення скорочує період, під час якого суб'єкти чутливі до потенційно летальних інфекцій, кровотечі й інших серйозних ускладнень. Отже, аналог простацикліну повинен бути корисним методом лікування, призначеним для попередньої обробки донорного кісткового мозку з метою збільшення приживлення кісткового мозку (т.б. шляхом зменшення числа необхідних клітин і скорочення тривалості аплазії кісткового мозку).

Зокрема, аналог простацикліну вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту або берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей. Конкретніше, трепростиніл є кращим для застосування аналогом простацикліну.

Тривале лікування суб'єктів протягом декількох днів після трансплантації кісткового мозку аналогом простацикліну повинне давати в результаті поліпшені клінічні результати у вигляді поліпшення приживлення (т.б. шляхом зменшення числа необхідних клітин і скорочення тривалості аплазії кісткового мозку).

Таким чином, відповідно до конкретного варіанта здійснення лікування проводять протягом, щонайменше, п'яти днів після трансплантації, конкретніше протягом, щонайменше, 10 днів, ще конкретніше протягом, щонайменше, 14 днів після трансплантації.

Відповідно до альтернативного варіанта здійснення винаходу розглядається композиція, що містить один або більш ніж один, аналог простагліну й стимульовані гемопоетичні стовбурові клітини.

Альтернативно, у певних варіантах здійснення до композиції може додаватися засіб, обраний з енхансера циклічного АМФ (цАМФ) або ліганду рецептора простагліну EP. Відповідно до окремого варіанта здійснення винахідницька композиція також може містити форсколін.

Зокрема, композиції винаходу є фармацевтичними композиціями.

У зазначених композиціях можуть міститися додаткові фармацевтично прийнятні ексципієнти (допоміжні речовини), відомі в даній області техніки.

Кількість аналога простагліну залежить від терапевтичного засобу або методу приготування стимульованих HSC. Зокрема, ефективну кількість трепростинілу для терапевтичних варіантів застосування становить, щонайменше, 1,0 нг/кг ваги тіла.

Винахідницька композиція може вводиться суб'єктові будь-яким способом, застосовуванім і відомим у даній області техніки. Конкретніше, забезпечується внутрішньовенне або підшкірне введення.

Зазначена композиція може перебувати у формі для перорального приймання, обраної із групи форм із тривалим вивільненням, таблеток або капсул.

Попередній опис стане повністю зрозумілим на підставі наступних прикладів. Однак, такі приклади є лише характерними прикладами застосування на практиці одного або більше варіантів здійснення даного винаходу, і їх не слід розуміти як обмежуючі винахід рамки.

Приклади

Приклад 1

Матеріали й методи

Виділення кісткомозгових стовбурових клітин

Десять мишей (C57BL/6) умертвляли зсувом шийних хребців. Трубочасті кістки задніх кінцівок (тобто стегнові й великогомілкові) звільнили від м'язів і сполучної тканини й промили середовищем RPMI, використовуючи шприц і голку 27½ G. Клітинну суспензію звільнили від видимої сполучної тканини, зібрали й перенесли в центрифужні пробірки. Клітини зібрали центрифугуванням (1200 об./хв./~100 г протягом 5 хв.) і ресуспендували в 3 мл буферу, лізуючого еритроцити (0,15 M NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA, значення pH від 7,2 до 7,4). Суспензію клітин інкубували протягом 2 хв. при 20 °C, а потім 4 хвилини на льоду. Після цього, додали RPMI (10 мл) і клітини зібрали центрифугуванням і підраховували. Типово вихід клітин становив 3*10⁷/мишу.

Клітини ресуспендували в крижаному PBS (фосфатно-сольовому буфері), що містить 2% FCS (ембріональна теляча сироватка) при щільності клітин 2,5*10⁸ клітин/мл, до яких додали суміш біотинільованих антитіл (набір "Lineage Cell Depletion Kit" від Miltenyi Biotec), що містить лінієспецифічні антитіла до CD5, CD45R (B220), CD11b, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4 і Ter-119 при відношенні 0,1 мл розчину антитіл на 10⁸ клітин. Клітини інкубували з антитілами протягом 20 хв. на льоду й осадили центрифугуванням. Після ресуспендування до суспензії клітин додали (3,3*10⁸ клітин/мл) вторинні антибіотин-покрите мікробусини (0,2 мл/10⁸ клітин, надані з набором ("Lineage Cell Depletion Kit" від Miltenyi Biotec), а суміш інкубували протягом 15 хв. на льоду. Після цього зразок розвели в MACS-буфері (30 мл), клітини зібрали центрифугуванням і ресуспендували в 6 мл MACS-буферу. Цю суспензію завантажили на попередньо заправлені LS колонки, які містили феромагнітні частки, покриті сумісним із клітинами пластмасовим матеріалом. Як правило, використовували три колонки (2 мл суспензії клітин/колонка). Елюат містив клітини, негативні за лінійним маркером (клітини Lin⁻), тоді як лінійно-комітовані клітини втримувалися на колонці. Клітини осаджували центрифугуванням і ресуспендували в мл PBS.

Типовий вихід становив 7*10⁵ Lin⁻ клітин/миша.

Флуоресцентно-активуєме сортування клітин (FACS-аналіз)

Антитіла, використовувані для фарбування маркерів клітинної поверхні, були отримані з наступних джерел: набір мишачих лінійних антитіл був отриманий від Becton Dickinson Biosciences (BD 559971, що містить у біотинованій формі анти-CD3ε, анти-CD11b, анти-CD45R, анти-Ly-6G/Ly-6c, анти-Ter-119), афінно очищені щурячі антимишачі CD16/CD32 (mouse Fcγ_{II/III} block, BD 553142) і флуоресцентний барвник стрептавідин-алофікоціанін-Cy7 (стрептавідин APC-Cy7, BD554063) також були від компанії Becton Dickinson Biosciences. Фікоеритрин(PE)-Cy 7-мічені антимишачі Ly6A/E (=антиген стовбурових клітин-1 = Sca1) PE-Cy7 (катал. № 25-5981-

82) і PE-Cy5 антимишачі CD117 (c-Kit) (катал. № 15-1171-81) були від компанії ebiosciences.

Відразу після MACS 1×10^6 лінійно-позитивних (Lin⁺) і негативних (Lin⁻) клітин перенесли в FACS пробірки й тримали на льоду в 50 мк PBS. У цей час наступні FACS антитіла розвели (1:50) і змішали в PBS: анти CD16/CD32 очищені (для блокування Fc-рецепторів), біотинільовані анти-CD3ε, біотинільовані анти-CD11b, біотинільовані анти-CD45R, біотинільовані анти-Ly-6G/Ly-6C і біотинільовані анти-Ter-119, мічені стрептавідином APC-Cy7, PE-Cy 7-мічені анти-Sca-1, PE-Cy 5-мічені анти-c-kit. Цей майстер-мікс (суміш) (50 мкл) додавали до кожного зразка, який потім перемішували за допомогою слабого струшування й інкубували за 4 °C у темряві протягом 15 хв. Після цього, клітини збирали центрифугуванням, промивали в 2 мл PBS і ресуспендували в PBS. Зразки аналізували на приладі FACS Canto II (Becton Dickinson). Використовували установку дискримінаційного вікна як зазначено далі: "ворота" для живих клітин були встановлені шляхом реєстрації переднього й бічного розсіювання. Живі клітини додатково розрізняли на основі експресії лінійних маркерів (т.б., CD11b, CD45R, Ly-6G/Ly-6C, Ter-119). Це давало можливість установлення «воріт» для Lin⁻ клітин, які додатково аналізували відносно експресії Sca-1 і c-Kit.

Аналіз нагромадження [3H]цАМФ

Lin⁻ /sca1⁺-клітини інкубували в 1 мл середовища для стовбурових клітин (Stem Span SFEM, Stem Cell Tech #09650), що містить по 0,5 мг/л бензилпеніциліну й стрептомицину, по 50 нг/мл мишачого фактора стовбурових клітин (mSCF), людського Flt-3, hIL-11 50 нг/мл, m-IL3 (10 нг/мл) (усе від компанії Preprotech), 10 мкг/мл аденозиндезамінази (Roche) і [³H]аденін (Perkin Elmer, 1 мкCi/мл). Преінкубація тривала протягом 4 год. при 37 °C. Потім клітини стимулювали різними речовинами (форсколіном, трепростинілом і іншими простаноїдами; холерним токсином) протягом 1 год. Потім клітини осадили центрифугуванням (5 хв. при 100 g), середовище вилучили й осад лізували в крижаній 2,5% хлорній кислоті (0,9 мл), що містить 0,1 мМ цАМФ, тримали на льоду протягом 1 год. і нейтралізували 4,2 М KOH (0,1 мл)). Клітини, позитивні за лінійними маркерами, попередньо інкубували аналогічним чином, але в середовищі, що містило RMP1 замість безсивороточного середовища для стовбурових клітин. АМФ і цАМФ розділили за допомогою послідовної хроматографії на колонках, що містять Dowex AG50-X8 і нейтральний окис алюмінію (12).

Той факт, що відмінності можна бачити тільки в присутності форсколіну, є технічною проблемою - без підвищення чутливості форсколіном (тобто при його відсутності) сигнал є недостатнім, щоб бачити які-небудь відмінності між різними сполуками, т.б. іпопростом, берапростом і трепростинілом. Підвищення чутливості означає, що клітини стають більш чутливими (сенсibiliзуються) до рецепторної відповіді, тому що ці клітини містять надзвичайно низький рівень цАМФ.

По концентраційній кривій (Фіг. 5) для трепростинілу можна бачити, що збільшення цАМФ є істотним без додавання форсколіну.

Трансплантація кісткового мозку

Ізогенних мишей-реципієнтів піддавали летальному опроміненню. Якщо цих мишей не врятувати шляхом внутрішньовенного введення гемопоетичних стовбурових клітин, вони гинуть протягом перших двох тижнів. Lin⁻ (Sca1⁺ і c-Kit⁺) гемопоетичні стовбурові клітини були приготовлені, як описано вище, і були попередньо оброблені ex vivo за відсутності та у присутності 10 мкМ трепростинілу, комбінації трепростинілу + 30 мкМ форсколін (FSK), 10 мкг/мл холерного токсину протягом 1 год. при 37 °C. Після цього, клітини (3×10^5 /миша) вводили через хвостову вену. Підрахунок лейкоцитів проводили за допомогою FACS. Підрахунок лейкоцитів проводили кожні 5 днів, починаючи з 9 дня (коли кількість лейкоцитів була ~1 г/л).

Результати

Очищення гемопоетичних стовбурових клітин

Використання методу на основі MACS дозволяє утримати позитивні за лінійними маркерами (Lin⁺) клітини на магнітних частках і дає можливість виділення клітин, негативних за лінійними маркерами (Lin⁻): властивості клітинної популяції були охарактеризовані за допомогою FACS. MACS-затримана популяція клітин дійсно була збагачена клітинами, які були пофарбовані лінійно-специфічними маркерами й були позбавлені рецептора стовбурових клітин c-Kit/CD117 (Фіг. 1).

На противагу цьому, клітини, виділені з елюату колонки, переважно були виявлені у верхньому лівому квадранті, т.б., вони показували високий рівень c-Kit і були позбавлені APC-Cy7-а флуоресценції, що свідчило про виснаження лінійних маркерів (Фіг. 2).

Популяції клітин додатково оцінювали шляхом подвійного фарбування й c-Kit і Sca-1 (антиген стовбурових клітин-1): лінійно-позитивні клітини були позбавлені цих двох маркерів (Фіг. 3А), у той час як лінійно-негативна фракція експресувала високі рівні c-Kit або комбінації c-

Kit і Sca-1 (Фіг. 3B).

Нагромадження циклічного АМФ у клітинах c-Kit⁺ і Sca1⁺

Пул аденинових нуклеотидів гемопоетичних стовбурових клітин (c-Kit⁺ і Sca-1⁺ популяція, дивися Фіг. 3B) метаболічно позначили [³H]аденином і перевірили їхню відповідь на трепростиніл і інші агоністи простагландинового рецептора. Оскільки ці клітини показують досить помірну цАМФ-відповідь, фермент сенсibiliзували шляхом використання форсколіну. Цей diterпен зв'язується в псевдосубстратній щілині між каталітичними C1 і C2 доменами аденілатциклази й робить різні ізоформи ферменту більш легко реагуючими на стимулюючий G білок G_{αs} (13-15). Як видно з Фіг. 4, трепростиніл, берапрост і ілопрост як такі (per se) викликали помірне нагромадження цАМФ, порівнянне за величиною з нагромадженням, викликаним форсколіном 30 мкМ. Однак, у комбінації з форсколіном трепростиніл викликав збільшення рівня цАМФ, що перевершує збільшення, викликане IP-(I протанолід) рецептор-специфічними сполуками ілопрост і берапрост. Це можна пояснити, якщо взяти до уваги дію трепростинілу на EP(E протанолід)-рецептори (10). Трепростиніл викликав залежне від концентрації нагромадження цАМФ у межах від 0,1 до 10 мкМ (Фіг. 5). Значення EC₅₀ перебувало в межах 0,3 мкМ. Трепростиніл виявився нездатним підвищити рівень цАМФ в Lin⁺ фракції гемопоетичних клітин (дані не показані).

Відновлення кісткового мозку гемопоетичними стовбуровими клітинами (Lin⁻, c-Kit⁺, Sca1⁺)

Летально опромінених мишей відновлювали за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 3*10⁵ Lin⁻, c-Kit⁺, Sca1⁺ клітин. Кількість лейкоцитів починала збільшуватися з найнижчого рівня на 9 день і повільно збільшувалася протягом наступних декількох тижнів. Рівень лейкоцитів у день 60 після ін'єкції гемопоетичних стовбурових клітин був обраний у якості релевантної кінцевої крапки, тому що через 60 днів циркулюючі лейкоцити могли продукуватися гемопоетичними стовбуровими клітинами, що тільки прижилися. Як видно на Фіг. 6, миші, ін'єктовані попередньо обробленими трепростинілом гемопоетичними стовбуровими клітинами, мали значно вищі рівні циркулюючих лейкоцитів, ніж ті, що одержали оброблені носієм гемопоетичні стовбурові клітини (p<0,05, t-критерій Ст'юдента для непарних даних).

У якості додаткових контролів тваринам ін'єктували:

- (i) клітини, оброблені холерним токсином, оскільки він є найбільш ефективним і стійким активатором G_{αs},
- (ii) форсколіном, оскільки, як зазначено вище, він безпосередньо активує ізоформи аденілатциклази,
- (iii) комбінацією форсколіну й трепростинілу.

Очевидно, що трепростиніл був також ефективний у якості позитивного контролю як і холерний токсин, який, як було встановлено, є ефективним ex vivo впливом (1,2).

Приклад 2

Виділення кісткомозкових стовбурових клітин

Мишей C57BL/6 і B6SJL забивали й виділяли кісткомозкові стовбурові клітини, як описано в прикладі 1.

Попередня обробка виділених стовбурових клітин in vitro

Кісткомозкові стовбурові клітини, отримані від мишей C57BL/6 або C6SJL, попередньо обробляли in vitro холерним токсином (CTX) або комбінацією трепростиніл+форсколін (FSK), і стовбурові клітини позначили Lu5.2 або Lu5.1.

У першому експерименті кісткомозкові стовбурові клітини від C57BL/6 мишей використовували без попередньої обробки, а стовбурові клітини позначили Lu5.2. Кісткомозкові стовбурові клітини від C6JL були попередньо оброблені in vitro холерним токсином або комбінацією трепростиніл+форсколін, а стовбурові клітини позначили Lu5.1.

Для порівняльних досліджень суміш клітин 1:1 Lu5.1+ і Lu5.2+ вводили мишам шляхом трансплантації кісткового мозку, і із самого початку було виміряно співвідношення Lu5.2 і Lu5.1 позитивних клітин крові. Далі через 16 тижнів після трансплантації кісткового мозку був обмірюваний ріст (розростання) клітин крові. Результати показано на Фіг. 7, на якій ясно видно, що попередньо оброблені трепростинілом/FSK клітини (Lu5.1+) показують значно збільшене розростання в порівнянні з неопрацьованими клітинами й клітинами, попередньо обробленими СТ.

У другому експерименті кісткомозкові стовбурові клітини від C57BL/6 попередньо обробили in vitro холерним токсином або комбінацією трепростиніл+форсколін, а стовбурові клітини позначили Lu5.2. Кісткомозкові стовбурові клітини від C6JL мишей, позначені Lu5.1, використовували без якої-небудь попередньої обробки.

І в цьому випадку для порівняльних досліджень суміш клітин 1:1 Lu5.1+ і Lu5.2+ вводили мишам шляхом трансплантації кісткового мозку, і із самого початку було виміряне

співвідношення Ly5.2 і Ly5.1 позитивних клітин крові. Потім через 16 тижнів після трансплантації кісткового мозку було виміряно розростання клітин крові. Результати показані на Фіг. 8, де знову явно видно, що попередньо оброблені трепростинілом/FSK клітини (Ly5.2+) показують значно збільшене розростання в порівнянні з неопрацьованими клітинами й клітинами, попередньо обробленими СТ. Таким чином, можна бачити, що ефект трепростинілу й форсколіну не залежить від джерела походження клітин кісткового мозку.

Таким чином, комбінація трепростинілу й форсколіну збільшує приживлення гемопоетичних стовбурових клітин і є настільки ж або навіть більш ефективним, як і попередня обробка холерним токсином.

Посилання

1. Adams GB, Alley IR, Chung UI, Chabner KT, Jeanson NT, Lo Celso C, Marsters ES, Chen M, Weinstein LS, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT (2009) Haematopoietic stem cells depend on G α -mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* 459:103-107.

2. Dexter TM, Whetton AD, Heyworth CM (1985) Inhibitors of cholera toxin-induced adenosine diphosphate ribosylation of membrane-associated proteins block stem cell differentiation. *Blood* 65:1544-1548.

3. Long MW, Heffner CH, Gragowski LL (1988) Cholera toxin and phorbol diesters synergistically modulate murine hematopoietic progenitor cell proliferation *Exp Hematol.* 16:195-200.

4. Freissmuth M, Gilman AG (1989) Mutations of G α designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG¹⁸⁷ result in loss of Gtpase activity. *J Biol Chem* 264:21907-21914.

5. Aksentijevich I, Flinn I (2002) Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. *Cancer Biother Radiopharm* 17:399-403.

6. Awedan AA (2002) High intensity regimens with autologous hematopoietic stem cell transplantation as treatment of multiple myeloma. *Ann Transplant* 7:38-43.

7. North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, Weber GJ, Bowman TV, Jang IH, Grosser T, Fitzgerald GA, Daley GQ, Orkin SH, Zon LI (2007) Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447:1007-1011.

8. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 113:5444-5455.

9. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, Zon LI (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells i regeneration. *Cell* 136:1136-1147.

10. Aronoff DM, Peres CM, Serezani CH, Ballinger MN, Carstens JK, Coleman N, Moore BB, Peebles RS, Faccioli LH, Peters-Golden M (2007) Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol* 178:1628-1634.

11. Kiriya M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, i Narumiya S (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 122:217-224.

12. Johnson RA, Alvarez, R, Salomon, Y. (1994) Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double chromatographic procedures. *Methods in Enzymology* 238:31-56

13. Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* 278:1907-1916.

14. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461-480.

15. Kudlacek O, Mitterauer T, Nanoff C, Hohenegger M, Tang WJ, Freissmuth M, Kleuss C (2001) Inhibition of adenylyl and guanylyl cyclase isoforms by the antiviral drug foscarnet. *J Biol Chem* 276:3010-3016.

16. Otsuka H. et al., The prostacyclin analog beraprost sodium augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by autologous bone marrow cells, *A...Vasc.Surg*, 2006, 20:646-652.

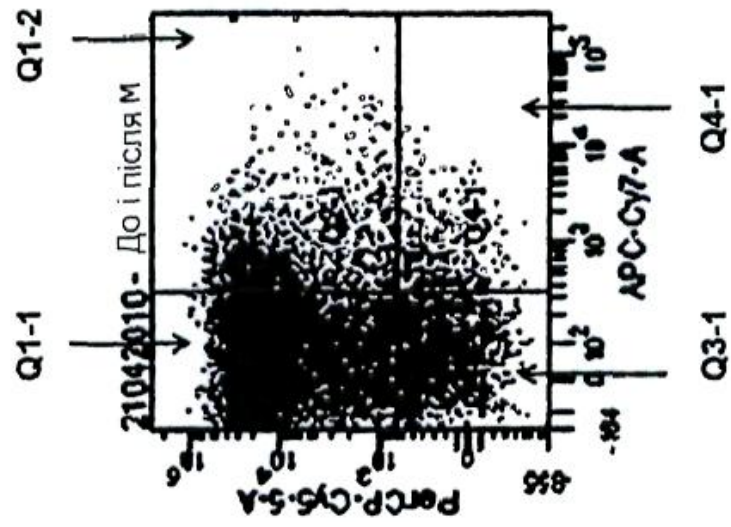
17. Madonna R., "Prostacyclin improves transcatheter myocardial delivery of adipose tissue-derived stromal cells", *Europ. Heart Journ.*, 2006, Vol. 27, No. 17, 2054-2061.

18. Ishii M. et al., "Mesenchymal stem cell-based gene therapy with prostacyclin synthase enhanced neovascularisation in hindlimb ischemia", 2009, Vol. 206, No. 1, 109-118.

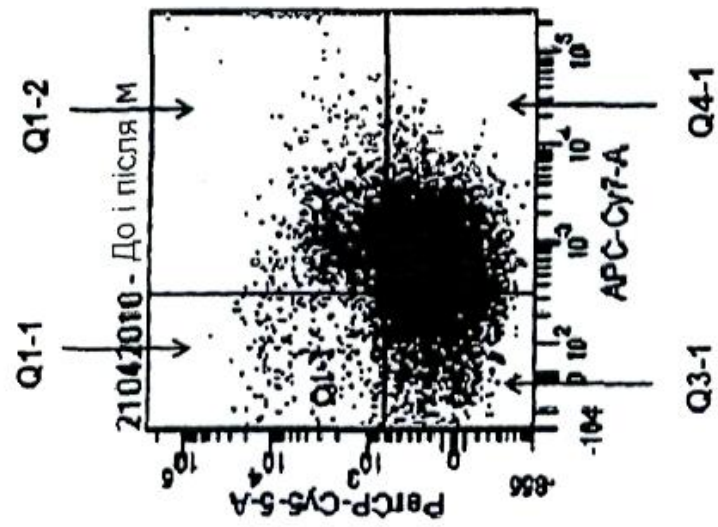
19. Crutchley D. J. et al., "Effects of prostacyclin analogs on the synthesis of tissue factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 β in human monocytic THP-1 cells", *J.. Pharma. i Exp. Therap*, 1994, Vol. 271, No. 1, 446-451.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

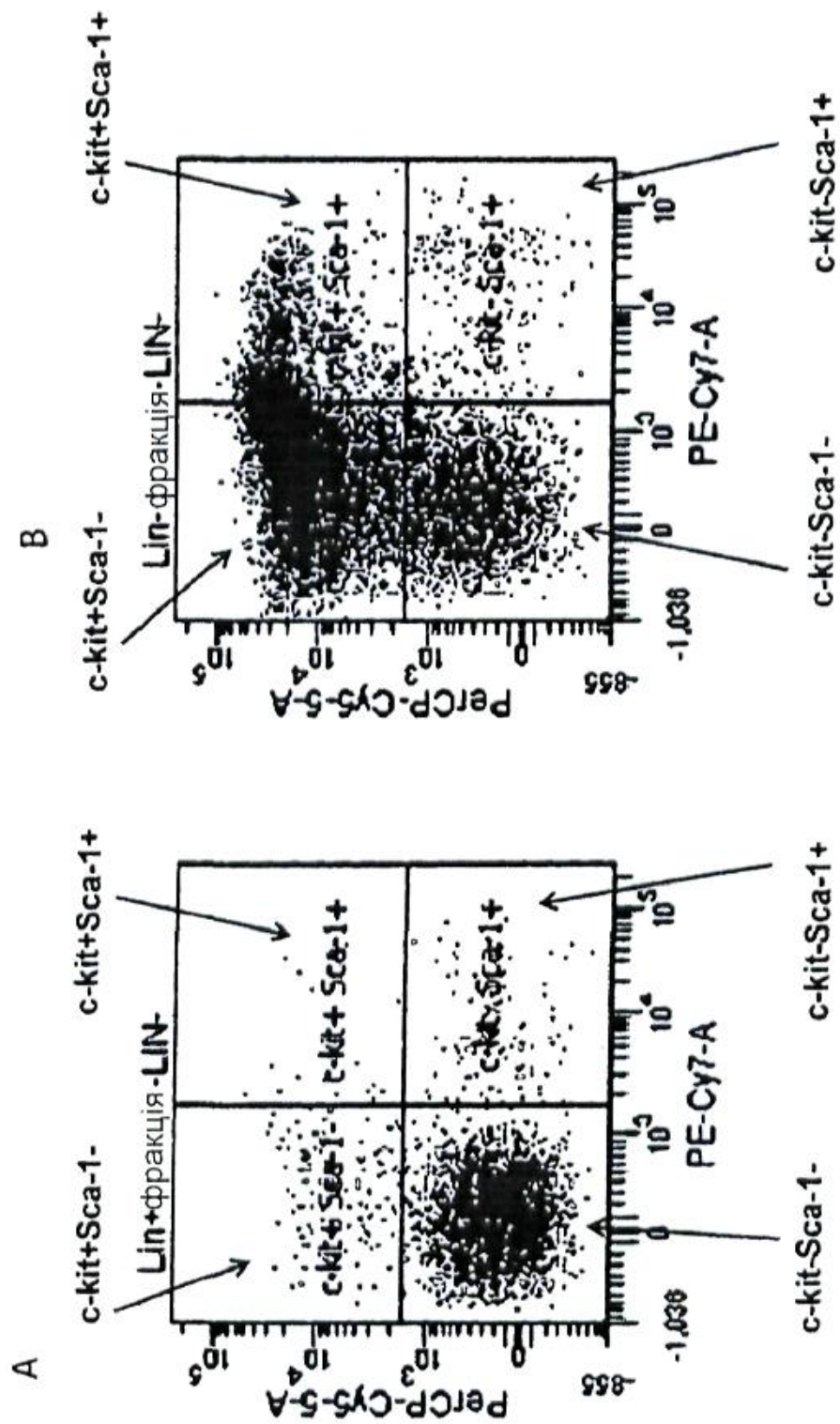
1. Спосіб поліпшення здатності приживлення гемопоетичних стовбурових клітин (HSC) шляхом попередньої обробки HSC ex vivo, що включає наступні стадії:
 - а) змішування зразка, що містить гемопоетичні стовбурові клітини, щонайменше з одним аналогом простацикліну разом з неспецифічним цАМФ-активуючим агентом, переважно вибраним з холерного токсину й форсколіну для одержання суміші,
 - б) інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання Гальфа_s-шляху передачі сигналу в зазначених клітинах, і необов'язково
 - с) виділення зазначених стимульованих клітин.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зазначений аналог простацикліну вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту й берапросту або їх фармацевтично прийнятих солей.
3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що зазначений аналог простацикліну є трепростинілом.
4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що зазначений трепростиніл є похідним трепростинілу, вибраним із групи кислотних похідних трепростинілу, проліків трепростинілу, поліморфів трепростинілу та ізомерів трепростинілу.
5. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-4, який **відрізняється** тим, що зазначений зразок є кістковим мозком.
6. Композиція для ex vivo посиленого приживлення гемопоетичних стовбурових клітин, яка містить щонайменше один аналог простацикліну разом з неспецифічним цАМФ-активуючим агентом, переважно вибраним з холерного токсину й форсколіну, і носієм.
7. Композиція за п. 6, яка **відрізняється** тим, що зазначений аналог простацикліну вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту й берапросту або їх фармацевтично прийнятих солей.
8. Композиція за п. 7, яка **відрізняється** тим, що зазначений аналог простацикліну є трепростинілом, переважно похідним трепростинілу, вибраним із групи кислотних похідних трепростинілу, проліків трепростинілу, поліморфів трепростинілу або ізомерів трепростинілу.
9. Композиція, яка **відрізняється** тим, що містить щонайменше один аналог простацикліну разом з неспецифічним цАМФ-активуючим агентом, переважно вибраним з холерного токсину й форс коліну, і стимульовані гемопоетичні стовбурові клітини, отримані відповідно до способу за будь-яким з пп. 1-5.
10. Композиція за будь-яким з пп. 6 або 9, яка **відрізняється** тим, що є у формі для внутрішньовенного або підшкірного введення, або у формі для перорального введення, вибраної з форм із тривалим вивільненням, пігулок і капсул.
11. Композиція за будь-яким із пп. 6-10, яка **відрізняється** тим, що хвороба кісткового мозку є лейкозом, дефектом компартменту клітин крові, хворобами кісткового мозку, викликаними хіміотерапією або опроміненням.
12. Композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що вказаний дефект компартменту клітин крові є гемоглобінопатією або порушенням функції нейтрофільних гранулоцитів.
13. Композиція за будь-яким із пп. 6-12, яка **відрізняється** тим, що призначена для застосування при лікуванні суб'єктів, що страждають від хвороби кісткового мозку, шляхом уведення аналога простацикліну разом з неспецифічним цАМФ-активуючим агентом, переважно вибраним з холерного токсину й форсколіну, щонайменше впродовж 7 днів, переважно щонайменше впродовж 10 днів, переважно щонайменше впродовж 14 днів після трансплантації кісткового мозку.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що вказані стовбурові клітини отримують з пуповинної крові, донорного кісткового мозку або плаценти.
15. Композиція за будь-яким з пп. 6-10, яка **відрізняється** тим, що вказані стовбурові клітини походять з пуповинної крові, донорного кісткового мозку або плаценти.
16. Композиція за будь-яким з пп. 11-13, яка **відрізняється** тим, що вказані стовбурові клітини отримують з пуповинної крові, донорного кісткового мозку або плаценти.



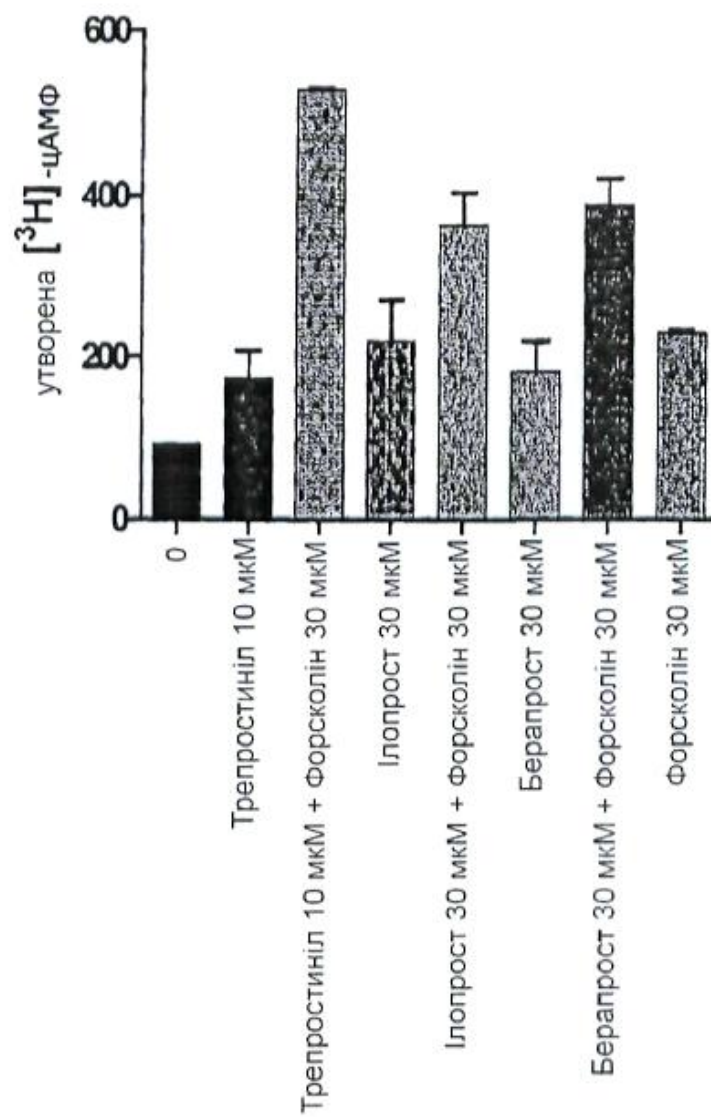
Фіг. 2



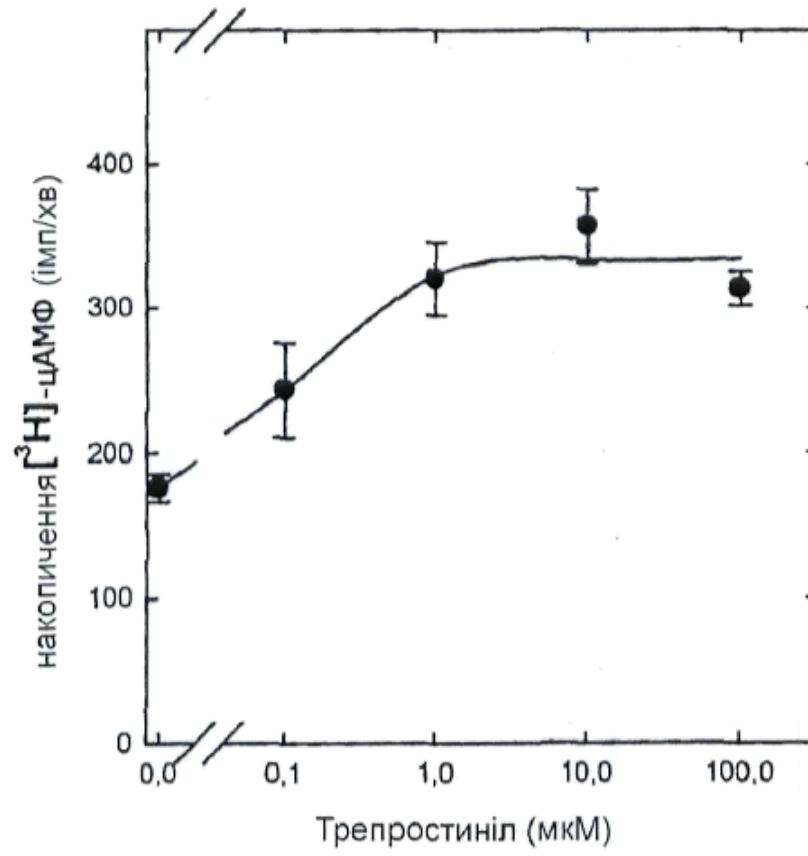
Фіг. 1



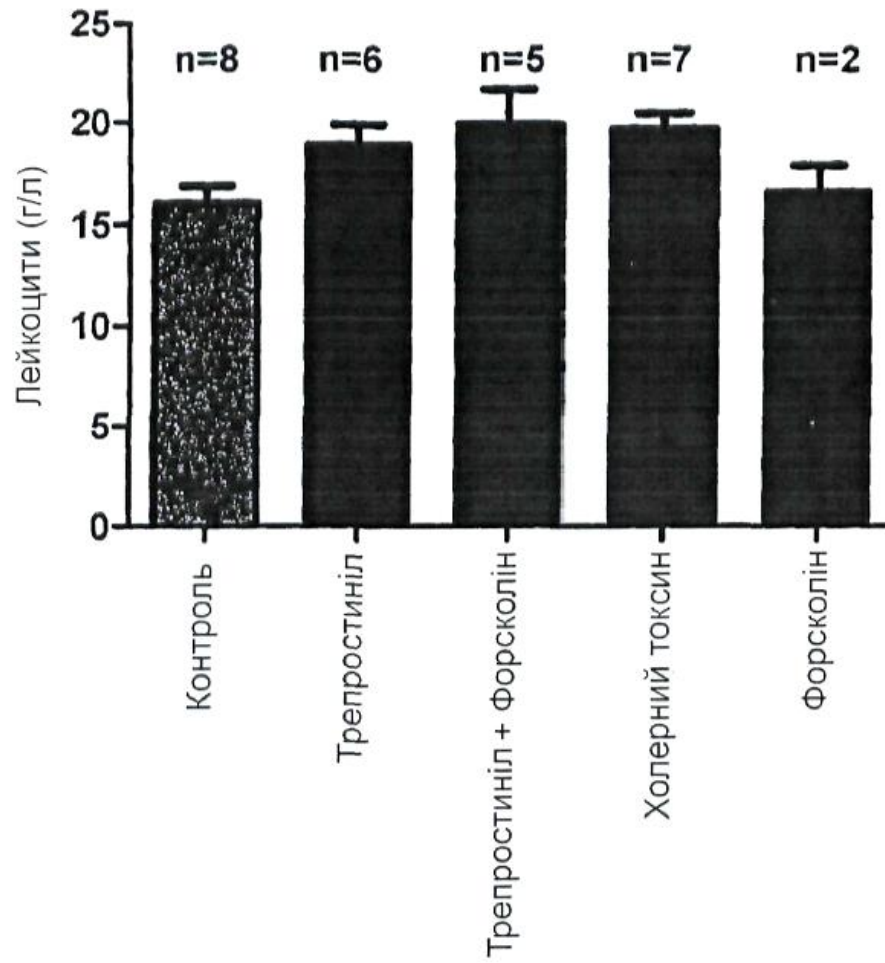
Фіг. 3



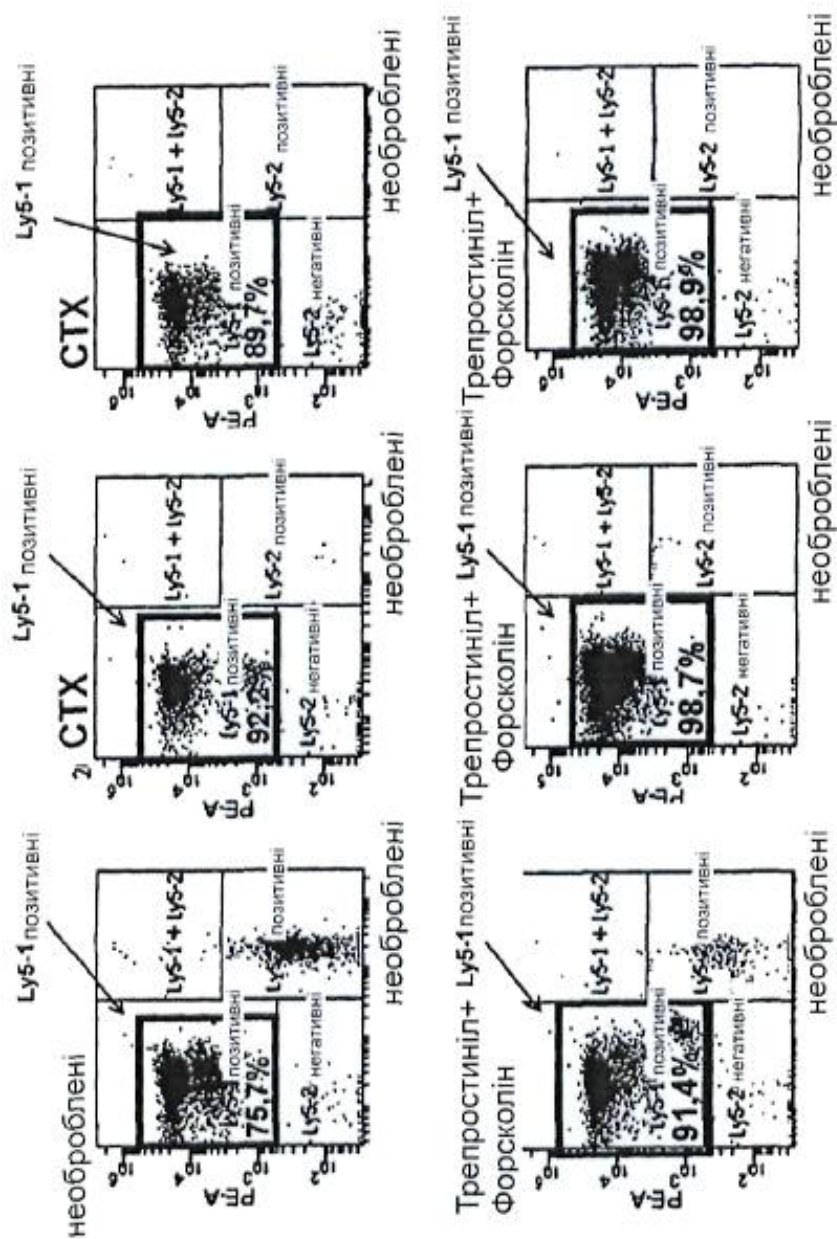
Фіг. 4



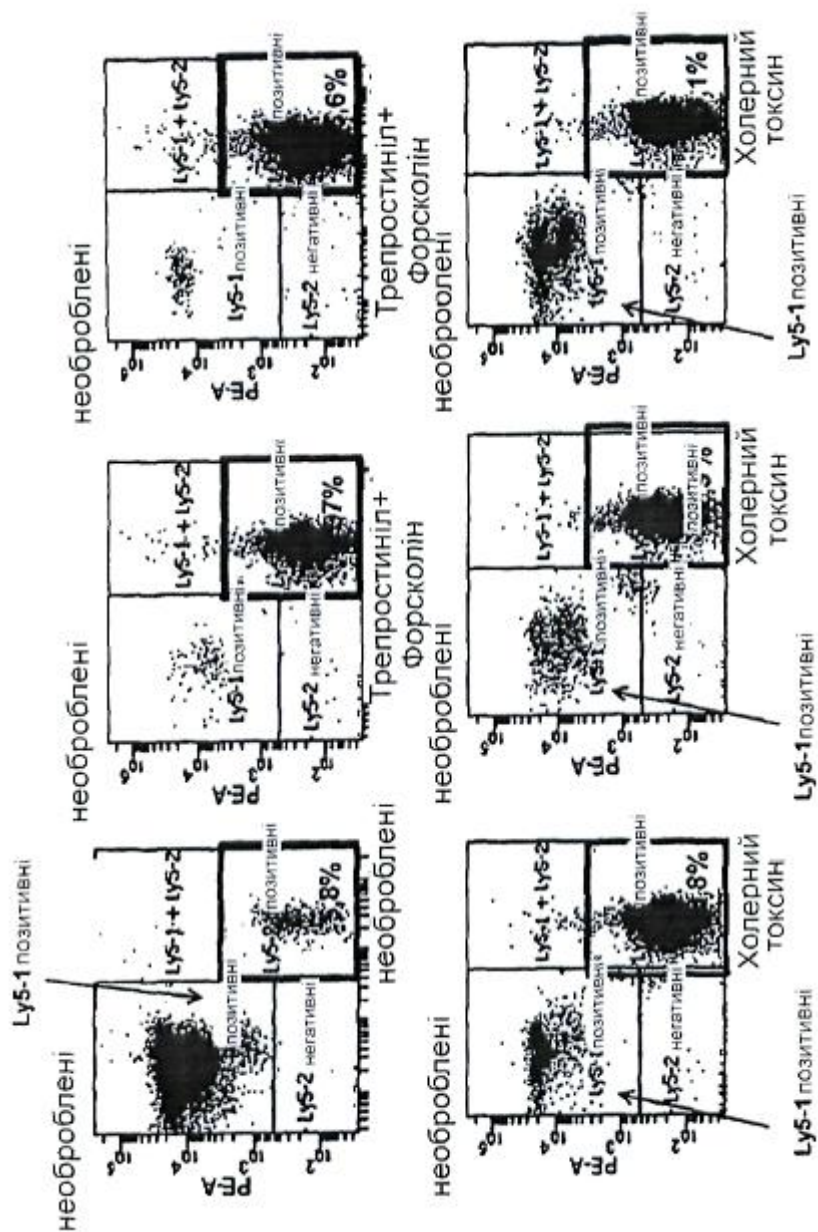
Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



8
011.