



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 122488

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

A61P 35/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2017 08600

(22) Дата подання заявки: 27.01.2016

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: 26.11.2020

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Парижської конвенції: 15152664.7

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Парижської конвенції: 27.01.2015

(33) Код держави-учасниці
Парижської конвенції,
до якої подано
попередню заявку: ЕР

(41) Публікація відомостей
про заявку: 10.05.2018, Бюл.№ 9

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: 25.11.2020, Бюл.№ 22

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ: РСТ/ЕР2016/051672,
27.01.2016

(72) Винахідник(и):
Фрайсмут Міхаель (АТ),
Цебедін-Брандль Єва-Марія (АТ),
Каземі Захра (АТ)

(73) Володілець (володільці):
СІФАРМ САРЛ,
26-28, rue Edward Steichen, 2540
Luxembourg, Luxembourg (LU)

(74) Представник:
Слободянюк Алла Василівна, реєстр.
№25

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:
BROXMEYER HAL E ET AL, "Inhibition of
DPP4/CD26 and dmPGE2 treatment enhances
engraftment of mouse bone marrow
hematopoietic stem cells", BLOOD CELLS,
MOLECULES AND DISEASES, (20140303), vol.
53, no. 1, doi:10.1016/J.BCMD.2014.02.002,
ISSN 1079-9796, pages 34 - 38, XP028664990
[X] 1-4,6,9-15 * the whole document * [I] 5-7
VELEZ DE MENDIZABAL NIEVES ET AL,
"Modelling the Sitagliptin Effect on Dipeptidyl
Peptidase-4 Activity in Adults with
Haematological Malignancies After Umbilical
Cord Blood Haematopoietic Cell
Transplantation", CLINICAL
PHARMACOKINETICS, ADIS INTERNATIONAL
LTD., AUCKLAND, NZ, (20140101), vol. 53, no.
3, ISSN 0312-5963, pages 247 - 259,
XP008176893 [X] 1-4,9-12 * the whole document
*

US 2014/288010 A1, 25.09.2014

WO 2012/095511 A1, 19.07.2012

WO 2009/152186 A1, 17.12.2009

WO 2007/041368 A2, 12.04.2007

K. W. CHRISTOPHERSON, "Modulation of
Hematopoietic Stem Cell Homing and
Engraftment by CD26", SCIENCE, (20040813),
vol. 305, no. 5686, doi:10.1126/science.1097071,
ISSN 0036-8075, pages 1000 - 1003,
XP055102738 [A] 1 * the whole document *

UA 122488 C2

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРИЖИВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

(57) Реферат:

Даний винахід забезпечує нове застосування композиції, який включає щонайменше один інгібітор дипептидилпептидази IV (DPP-IV) для посилення міграції й хоумінга гемопоетичних клітин-попередників у реципієнтів, яким були трансплантовані стовбурові клітини, у якій зазначені гемопоетичні стовбурові клітини й/або клітини-попередники перед трансплантацією обробляють *in vitro* сполуками, які підсилюють приживання, більш конкретно аналогом простагліну, й засобом, який підвищує рівень cAMP.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід пропонує нове застосування композиції, яка включає, щонайменше, один інгібітор дипептидилпептидази IV (DPP-IV) для посилення міграції й хоумінга гемопоетичних клітин-попередників у реципієнтів, яким були трансплантовані стовбурові клітини, у якій зазначені гемопоетичні клітини-попередники були оброблені *in vitro* перед трансплантацією клітин аналогом простагліну для підвищення приживання клітин-попередників. Більш конкретно, попередню обробку перед трансплантацією виконували аналогом простагліну й засобом, який підвищує рівень cAMP.

Попередній рівень техніки

Гемопоетичні стовбурові клітини (HSC) є первинними примітивними клітинами, здатними регенерувати всі продукти крові протягом усього життя індивідуума, урівноважуючи їх самовідновлення з диференціацією в клітини потомства. Відбувається переміщення HSC в місце розташування під час їх розвитку і вони циркулюють в організмі ссавців протягом усього життя входячи в кровоток і виходячи з нього для заняття ніш кісткового мозку на послідовних етапах хоумінга й приживання. Хоумінг є процесом, внаслідок якого донорські стовбурові клітини знаходять свій шлях у кістковий мозок, приживання стовбурових клітин означає їхній ріст у кістковому мозку.

HSC мають терапевтичний потенціал у результаті їх здатності відновлювати клітини крові й імунні клітини в реципієнтів трансплантата. Крім того, HSC мають здатність генерувати клітини інших тканин, таких як мозок, м'язи й печінка. Способи трансплантації аутологічного й алогенного кісткового мозку людини в цей час застосовують як терапію таких захворювань, як лейкемія, лімфома та інші небезпечні для життя захворювання. Аутологічна трансплантація кісткового мозку є стандартною процедурою, яку застосовують для збільшення терапевтичного вікна цитотоксичних препаратів і, таким чином, для забезпечення інтенсивної хіміотерапії з високою дозою (Aksentijevich I, Flinn I (2002) Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. Cancer Biother Radiopharm 17:399-403; Awedan AA (2002) High intensity regimens with autologous hematopoietic stem cell transplantation as treatment of multiple myeloma. Ann Transplant 7:38-43). Однак для цих процедур повинна бути ізольована велика кількість донорського кісткового мозку, щоб забезпечити достатню кількість HSC для приживання.

Спрямована міграція клітин, більш конкретно, хоумінг HSC, регулюється декількома різними внутрішньоклітинними механізмами.

По-перше, описана необхідність в $G\alpha_s$ -переданого сигналу *in vivo* для заповнення ніші кісткового мозку клітинами HSC (Adams GB et al., (2009) Haematopoietic stem cells depend on $G\alpha_s$ -mediated signaling to engraft bone marrow. Nature 459:103-107). Ці результати підтверджують раніше проведені *in vitro* експерименти, які показали, що активація $G\alpha_s$ сприяє виживанню й диференціації гемопоетичних стовбурових клітин (Dexter TM et al., (1985) Inhibitors of cholera toxin-induced adenosine diphosphate ribosylation of membrane-associated proteins block stem cell differentiation. Blood 65:1544-1548, Long MW et al., (1988) Cholera toxin and phorbol diesters synergistically modulate murine hematopoietic progenitor cell proliferation Exp Hematol. 16:195-200). $G\alpha_s$ є з'єднувальною гуаніннуклеотид α -субодиницею гетеротримерного G-білка, який стимулює всі 9 ізоформ зв'язаної з мембраною аденілілциклази ссавців. $G\alpha_s$ може бути постійно активований *ex vivo/in vitro* обробкою клітин холерним токсином. Це відбувається тому, що холерний токсин APD-рибозилує каталітичний аргініновий залишок (R^{186/187/201/202}, точний номер аргініну залежить від варіанта сплайсинга $G\alpha_s$); інтактний залишок аргініну необхідний для GTP-гідролізу й, у результаті, деактивації $G\alpha_s$ (Freissmuth M, Gilman AG (1989) Mutations of $G\alpha$ designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG¹⁸⁷ result in loss of Gtpase activity. J Biol Chem 264:21907-21914). Підвищене приживання дійсно можна спостерігати після попередньої обробки гемопоетичних стовбурових клітин холерним токсином: у кістковому мозку було приблизно у два рази більше (Lin⁺) клітин-попередників, якщо препарат стовбурових клітин був попередньо оброблений холерним токсином (Adams, 2009). По-друге, HSC експресують усі чотири рецептори простагліну E (EP1-4). Попередня обробка гемопоетичних стовбурових клітин (диметильованим) простагліном E2 підсилює їхнє приживання (North TE, et al., (2007) Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. Nature 447:1007-1011, 8; Hoggatt J, et al., (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation (Blood 113:5444-5455). Цей ефект опосередковується канонічною $G\alpha_s$ -залежною передачею сигналів, тому що індукована cAMP активація протеїнкінази A (PKA) діє синергійно з Wnt-залежними сигналами для стабілізації β -катеніну (Goessling W et al. (2009) Genetic interaction of PGE₂ and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. Cell 136:1136-1147).

Крім того, PGE₂ також збільшує мРНК і експресію на поверхні клітин HSC CXCR4, підсилює їхню міграцію до фактора-1 стромальної клітини (SDF-1) *in vitro* і хоумінг до кісткового мозку *in vivo* і стимулює вхід HSC у клітинний цикл і просування через нього.

Спосіб посилення приживання HSC із застосуванням аналога простагліну, необов'язково, у комбінації з форсколіном, описаний в WO2012/095511.

Також відомо, що вісь SDF-1-CXCR4 залучена в хоумінг клітин. SDF-1 відіграє вирішальну роль у регулюванні спрямованої міграції нормальних HSC та їх хоумінга і утримання в кістковому мозку (Kucia et al., Stem Cells, 2005).

Відповідно до WO2009/152186 A1, інгібування CD26 пептидазою (DPPIV, дипептидилпептидази IV) активності може підсилювати міграційну активність, і описане застосування інгібіторів CD26 пептидази для посилення хоумінга й приживання клітин.

WO 2012/074676 описує композицію для консервації печінки, яка містить антагоніст GLP-1 і DPPIV-інгібітор.

Hussain Filza et al. повідомляють про вплив трепростинілу на трансплантацію стовбурових клітин (BMC Pharmacology, vol 11, no. Suppl 2, 2011, p A6).

US 2008/085264 розкриває застосування інгібітору DPP-IV/інгібітору CD26 пептидази в попередній обробці для збільшення ефективності трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Broxmeyer H. et al. забезпечують дослідження трансплантації з гемопоетичними стовбуровими клітинами. (STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2013, vol. 22, suppl. 1, pp. 103-110) і подальше обговорення застосування dmPGE₂ у комбінації із ситагліптіном (Broxmeyer H. and Pelus, L. 2014, Blood Cells, Molecules and Diseases 53, 34-38).

Schwaiger E. et al. розкривають застосування інгібіторів DPP-IV і показують, що присутність даних інгібіторів не призводить до приживання кісткового мозку (Experimental Hematology, 2011, vol. 40, no. 2, pp. 97-106).

Hoggatt J. et al. повідомили про застосування PGE₂ для стимулювання гемопоетичних стовбурових клітин (BLOOD, 2009, vol. 113, no. 22, pp. 5444-5455).

WO 2012/095511 описує обробку гемопоетичних стовбурових клітин трепростинілом і форсколіном.

Локалізація стовбурових клітин після трансплантації є критичним фактором для успішної трансплантації. У цей час, для трансплантації необхідна велика кількість стовбурових клітин, оскільки стовбурові клітини важко приживаються в кістковому мозку, і існує тривалий період аплазії кісткового мозку, що призводить до зниження зрілих клітин крові.

Таким чином, як і раніше існує потреба у забезпеченні способу й схеми обробки, які б ефективно стимулювали HSC для збільшення хоумінга, приживлення й утримання ізольованих HSC у нішах кісткового мозку суб'єктів, які перенесли трансплантацію кісткового мозку та для зменшення кількості HSC, потрібних для трансплантації.

Сутність винаходу

Завдання вирішується за допомогою втілення даного винаходу.

Несподівано було показано, що хоумінг і приживання гемопоетичних стовбурових клітин можуть бути успішно посилені шляхом попередньої обробки *ex vivo* зазначених стовбурових клітин і/або клітин-попередників аналогом простагліну, який стимулює здатність до приживання зазначених клітин, і наступним введенням інгібітору дипептидилпептидази IV (DPP-IV) індивідуумові, якому були трансплантовані зазначені гемопоетичні стовбурові клітини.

Більш конкретно, авторами винаходу було показано, що хоумінг і приживання гемопоетичних стовбурових клітин можуть бути успішно посилені шляхом *ex vivo* попередньої обробки зазначених клітин комбінацією, яка включає, щонайменше, один аналог простагліну, і, щонайменше, один засіб, який підвищує рівень cAMP, і з наступним введенням інгібітору дипептидилпептидази IV (DPP-IV) індивідуумові, якому були трансплантовані зазначені гемопоетичні стовбурові клітини.

Більш конкретно, композиція, запропонована винаходом, включає, щонайменше, один інгібітор дипептидилпептидази IV (DPP-IV) для застосування його для обробки гемопоетичних реципієнтів, яким були трансплантовані стовбурові клітини, у якій зазначені гемопоетичні стовбурові клітини були оброблені *in vitro*, більш конкретно, аналогом простагліну й засобом, який підвищує рівень cAMP, перед трансплантацією.

Більш конкретно, винахід пропонує композицію, яка включає, щонайменше, один інгібітор дипептидилпептидази IV (DPP-IV) для застосування його для обробки гемопоетичних реципієнтів, яким були трансплантовані стовбурові клітини, у якій зазначеним реципієнтам трансплантували гемопоетичні стовбурові клітини, які для посилення приживання були

оброблені *in vitro* аналогом простацикліну й необов'язково, засобом, який підвищує рівень cAMP.

Винахід несподівано продемонстрував, що інкубування ізольованих гемопоетичних стовбурових клітин перед трансплантацією з аналогом простацикліну, необов'язково, разом із засобом, який підвищує рівень cAMP, таким як форсколін, і введення інгібітору DPP-IV незадовго до й після трансплантації зазначених клітин пацієнту, який цього потребує суттєво збільшує ефективність хоумінга й приживання HSC. Це неочікувано, оскільки лише одного інгібування DPP-IV (гліптіном) не досить для посилення трансплантації кісткового мозку в мишачих моделях (Schwaiger E, et al., *Exp Hematol.* 2012 Feb; 40(2):97-106. doi: 10.1016/j.exphem.2011.10.010).

Відповідно до кращого втілення, гемопоетичні стовбурові клітини інкубували з комбінацією аналога простацикліну й сполуками, здатного додатково підвищувати рівень cAMP, більш конкретно, з форсколіном або інгібітором деградації cAMP (інгібітором фосфодієстерази).

Далі, авторами винаходу несподівано було показано на тваринній моделі *in vivo*, що введення інгібітору DPP-IV, більш конкретно, вілдагліптину, після трансплантації зазначених клітин значно збільшує коефіцієнт виживання реципієнтів зазначених гемопоетичних клітин у порівнянні із уведенням аналога простацикліну.

Крім того, автори винаходу показали, що комбіноване введення аналога простацикліну, більш конкретно, трепростинілу та інгібітору DPP-IV, більш конкретно, вілдагліптину, після трансплантації попередньо оброблених трепростинілом і форсколіном гемопоетичних стовбурових клітин є взаємно антагоністичним.

Відповідно до втілення винаходу, для застосування зазначена композиція містить інгібітор DPP-IV, який вибирають з поміж гліптінів, ще більш конкретно, із групи, яка складається із ситагліптину, вілдагліптину, алогліптину, саксагліптину, лінагліптину, анагліптину, тенелігліптину, гемігліптину й дутогліптину або їх функціональних аналогів.

Відповідно до конкретного втілення винаходу, гемопоетичні стовбурові клітини інкубували *in vitro* з аналогом простацикліну, який вибирають із групи трепростинілу, ілопросту, цикапросту й берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей, більш конкретно, зазначений аналог простацикліну є похідним трепростинілу, обраним з поміж групи кислих похідних трепростинілу, проліків трепростинілу, поліморфних модифікацій трепростинілу або ізомерів трепростинілу й безводних поліморфних модифікацій трепростинілу.

Відповідно до втілення, попередню обробку гемопоетичних стовбурових клітин в подальшому проводять у присутності засобу, який підвищує рівень cAMP, більш конкретно, форсколіну.

Даний винахід охоплює застосування інгібітору DPP-IV для обробки обраної групи індивідуумів, тобто індивідуумів, які страждають на захворювання кісткового мозку або на захворювання, пов'язане з кістковим мозком, більш конкретно, захворювання кісткового мозку є лейкоз, мієлодиспластичним синдромом, мієлопроліферативним розладом, апластичною анемією, серповидно-клітинною анемією, порушенням компартменталізації клітин крові, захворюванням кісткового мозку, індукованим хіміотерапією або опроміненням, тих, що перенесли трансплантацію стовбурових клітин, із застосуванням зразків гемопоетичних стовбурових клітин, які були попередньо оброблені *in vitro* аналогом простацикліну й cAMP інгібітором перед трансплантацією.

Ще більш конкретно, порушенням компартменталізації клітин крові може бути, без обмежень, гемоглобінопатія або порушення функції нейтрофільних гранулоцитів, порушення в Т-і/або В-лімфоцитах (наприклад, важкий комбінований імунodefіцит, агамаглобулінемія Брутона).

Відповідно до конкретного втілення винаходу, індивідуумів, яким після трансплантації вводили аналоги простацикліну, не включали в групу індивідуумів для лікування інгібітором DPP-IV.

Відповідно до втілення винаходу, інгібітор DPP-IV був вілдагліптіном, в якому гемопоетичні стовбурові клітини перед трансплантацією були оброблені *in vitro* трепростинілом і форсколіном.

Відповідно до додаткового втілення, інгібітор DPP-IV вводять, щонайменше, за 5, більш конкретно, щонайменше, за 10, більш конкретно, щонайменше, за 15, більш конкретно, щонайменше, за 24 години до трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Уведення інгібітору DPP-IV може здійснюватися протягом періоду, необхідного для достатнього приживання стовбурових клітин у кістковому мозку.

Втілення даного винаходу також охоплює введення інгібітору DPP-IV протягом, щонайменше, 1 дня, щонайменше, 2 днів, щонайменше, 3 днів, щонайменше, 4 днів,

щонайменше, 5 днів, щонайменше, 6 днів, щонайменше, 7 днів, щонайменше, 8 днів, щонайменше, 9 днів, бажано, протягом, щонайменше, 10 днів, бажано протягом, щонайменше, 14 днів, після трансплантації кісткового мозку.

Відповідно до винаходу, композиція може бути введена за допомогою внутрішньовенного або підшкірного введення, або в доступній пероральній формі, обраної із групи, яка включає форми з уповільненим вивільненням, таблетки й капсули.

Винахід також забезпечує спосіб підвищення можливості приживання гемопоетичних клітин, який включає наступні послідовні стадії

- a) забезпечення зразка гемопоетичних стовбурових клітин і/або клітин-попередників,
- 10 b) введення ефективної кількості аналога простацикліну, який підсилює приживання зазначених клітин,
- c) інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання G альфа_s-сигнального шляху в зазначених клітинах,
- d) виділення зазначених клітин,
- 15 e) трансплантація зазначених клітин індивідуумові, який цього потребує,
- f) введення зазначеному індивідуумові ефективної кількості інгібітору DPP-IV.

Винахід більш конкретно забезпечує спосіб підвищення можливості приживання гемопоетичних клітин, який включає наступні послідовні стадії

- a) забезпечення зразка гемопоетичних клітин,
- 20 b) введення ефективної кількості аналога простацикліну та засобу, який підвищує рівень cAMP, які підсилюють приживання зазначених клітин,
- c) інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання G альфа_s-сигнального шляху в зазначених клітинах,
- d) виділення зазначених клітин
- 25 e) трансплантація зазначених клітин індивідуумові, який цього потребує,
- f) введення зазначеному індивідуумові ефективної кількості інгібітору DPP-IV.

Винахід також забезпечує спосіб, у якому зазначені стовбурові клітини одержують із пуповинної крові, донорського кісткового мозку або плаценти.

Винахід також забезпечує спосіб збільшення числа гемопоетичних клітин, які були приживлені в кістковому мозку після трансплантації, який включає стадії *in vitro* контакту гемопоетичних клітин з ефективною кількістю аналога простацикліну, більш конкретно, трепростинілу, більш конкретно, разом із засобом, який підвищує рівень cAMP, більш конкретно, форсколіном, введення преінкубованих клітин індивідуумові, який цього потребує й подальше введення інгібітору DPP-IV, більш конкретно, вілдагліптину, зазначеному індивідуумові незадовго до й/або після введення гемопоетичних клітин.

Відповідно до додаткового втілення винаходу, забезпечується спосіб посилення приживання гемопоетичних стовбурових клітин (HSC) шляхом попередньої обробки *ex vivo* HSC, який включає наступні стадії:

- a) забезпечення зразка, який містить гемопоетичні стовбурові клітини й/або клітини-попередники,
- 40 b) підмішування до зазначеного зразка композиції, яка включає аналог простацикліну, для збільшення можливості приживання стовбурових клітин і/або клітин-попередників, більш конкретно, яка включає аналог простацикліну й засіб, який підвищує рівень cAMP, з одержанням суміші,
- 45 c) інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання G альфа_s-сигнального шляху в зазначених клітинах,
- d) виділення зазначених стимульованих клітин,
- e) трансплантація зазначених клітин індивідуумові
- f) введення інгібітору DPP-IV зазначеному індивідуумові, більш конкретно, шляхом
- 50 внутрішньовенного введення.

Винахід також забезпечує комплект, який включає

- a) певну кількість, щонайменше, одного аналога простацикліну й форсколіну в першій стандартній лікарській формі,
- b) певну кількість, щонайменше, одного інгібітору DPP-IV, обраного з поміж гліптину, у формі
- 55 двох, трьох, чотирьох або більше окремих одиниць компонентів a) і b), більш конкретно, для застосування при лікуванні захворювання кісткового мозку, більш конкретно, такого захворювання кісткового мозку, як лейкомія, порушення компартменталізації клітин крові й захворювання кісткового мозку, індуковане хіміотерапією або опроміненням.

Короткий опис креслень

Фіг. 1: Преінкубація гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників мишей і людини в присутності трепростинілу й форсколіну підсилює їхню міграцію в напрямку до SDF-1/CXCL12

Фіг. 2: Інгібування CXCR 4-антагоністом AMD3100 SDF-1/CXCL 12-індукованої міграції мишачих гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників, які були стимульовані в присутності із трепростинілом і форсколіном,

Фіг. 3: Вілдагліптин підсилює міграцію гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном, у напрямку до SDF-1/CXCL12

Фіг. 4: Вілдагліптин і трепростиніл підсилює хоумінг гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном, але взаємно антагоністичні при комбінуванні *in vivo*

Фіг. 5: Комбіноване введення трепростинілу й вілдагліптину летально опроміненим мишам-реципієнтам BALB/c, яким були введені за допомогою ін'єкції гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники, попередньо оброблені *in vitro* комбінацією трепростинілу й форсколіну, було менш ефективним з погляду підвищення виживання цих мишей у порівнянні з уведенням *in vivo* або вілдагліптину, або трепростинілу окремо.

Фіг. 6: Експресія простаноїдного рецептора (A, B) у мишачих і людських гемопоетичних стовбурових клітинах і клітинах-попередниках (HSPCs). РНК ізолювали з мишачих (A) і людських HSPCs (B) і піддавали зворотній транскрипції. РНК, отримана з мишачих мозкових клітин (змішана культура нейронів і гліальних клітин) і клітинних ліній людини PC3 і HCT116, використовувалась як позитивний контроль. ПЛР-залежну ампліфікацію проводили, застосовуючи праймери, перераховані в таблиці 1. Амплікон для всіх E-простаноїдних рецепторів (від EP1 до EP4), I-простаноїдний рецептор (IP) і D-простаноїдний рецептор-1 (DP1) електрофоретично розділяли на агарозному гелі й візуалізували шляхом фарбування бромистим етидієм. Смуга, позначена H₂O позначає контроль, у якому ампліфікація була проведена без попередньої зворотної транскрипції. мРНК, яка кодує GAPDH, ампліфікували як внутрішній еталон.

Фіг. 7: Порівняння трепростиніл- і dmPGE2-індукованого накопичення cAMP у людських HSPCs.

Фіг. 8: Попередня обробка мишачих і людських HSPCs трепростинілом і форсколіном не індукує апоптоз і не змінює прогресію клітинного циклу або здатність клітин до диференціації. Людські HSPCs інкубували з 10 мкм трепростинілом і 30 мкм форсколіном протягом 1-ї години. Надалі, (A, B) індукцію апоптозу й (C, D) прогресію клітинного циклу оцінювали за допомогою проточного цитометричного аналізу. Ніякої різниці в апоптичних клітинах або в розподілі клітин відповідно до фаз G0/1, S і G2 не було виявлено між необробленими й обробленими клітинами (однофакторний ANOVA). (E, F). Дані є середнім \pm SEM (n=3).

Фіг. 9: Попередня обробка *in vitro* трепростинілом і форсколіном підсилює експресію CXCR4 (A і B) і CD26/DPPIV (B).

Фіг. 10: Попередня обробка *in vitro* трепростинілом і форсколіном підсилює дію SDF-1 через CXCR4.

Фіг. 11: *In vivo* уведення CXCR 4-антагоніста (AMD3100) скасовує позитивний ефект трепростинілу на виживання мишей-реципієнтів. Мишачі HPSCs попередньо обробляли *in vitro* трепростинілом і форсколіном як зазначено в легенді до Фігури 4 і вводили за допомогою ін'єкції (2×10^5 на мишу) летально опроміненим мишам-реципієнтам. Надалі їх розділяли на дві групи. Мишей, виділених у групу 1 (n=10), додатково піддавали обробці *in vivo* трепростинілом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 год.}^{-1}$), у той час як миші в групі 2 (n=10) одержували як трепростиніл ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 год.}^{-1}$), так і AMD3100 ($3,3 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 год.}^{-1}$) шляхом підшкірної ін'єкції кожні 8 годин протягом 10-ти днів. Різниця між двома кривими виживання була статистично значимою ($P=0,007$, балка-ранговий критерій).

Фіг. 12: Обробка *in vivo* мишей-реципієнтів окремо вілдагліптином і трепростинілом, але не їхньою комбінацією, підсилює хоумінг HSPCs, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном.

Фіг. 13: Уведення *in vivo* окремо інгібітору DPP-IV вілдагліптину, підсилює позитивний ефект обробки *in vitro* HSPCs трепростинілом і форсколіном на виживання мишей-реципієнтів.

Докладний опис винаходу

Забезпечення способів й засобів для посилення хоумінга й приживання HSC в оточенні кісткового мозку має серйозні біологічні й медичні наслідки. Локалізація стовбурових клітин з наступною трансплантацією має велике значення для клінічних процедур, оскільки в цей час величезна кількість стовбурових клітин потрібна для клінічної трансплантації, що зумовлює потребу більшої кількості донорських клітин. Такі способи також є дуже корисними, оскільки

значне число аутологічних донорських трансплантатів містять недостатню кількість стовбурових клітин, або HSC. Аналогічно, пацієнти часто не можуть знайти гістосумісних донорів, підкреслюючи необхідність мати способи і композиції для зменшення числа HSC, необхідних для успішної трансплантації. Можливість поліпшувати здатність до хоумінгу й приживлення HSC in vitro або ex vivo дозволяє відбирати менше клітин від донорів, тим самим зменшуючи час і дискомфорт, пов'язаний зі відбором стовбурових клітин кісткового мозку/ периферійних стовбурових клітин, і збільшення кількості донорів, що бажають дати HSC.

Даний винахід забезпечує нове застосування інгібіторів дипептидилпептидази IV (DPP-IV) у лікуванні пацієнтів, які були піддані трансплантації гемопоетичних клітин-попередників за умови, що зазначені стовбурові клітини, застосовані для трансплантації, інкубували, щонайменше, з одним аналогом простацикліну для підвищення приживання клітин, більш конкретно, із засобом, який підвищує рівень cAMP, перед уведенням або поверненням зазначених клітин в організм індивідуума.

Гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники, більш конкретно, мишачі й людські гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники (HSPCs) експресують кілька простаноїдних рецепторів (тобто, EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, IP і DP1, Фігура 6). Відомо, що трепростиніл специфічно активує всі Gs-з'єднані рецептори, тобто рецептори EP₂, EP₄, IP і DP1, у той час як dmPGE2 також стимулює рецептори EP₃. Автори винаходу показали, що трепростиніл стимулює cAMP у гемопоетичних клітинах-попередниках. У людських гемопоетичних стовбурових клітинах і клітинах-попередниках, крива концентрація-відповідь для трепростинілу була більш ніж на два порядки між 10 і 90 % від відповіді. Це узгоджується з активацією декількох стимулюючих рецепторів. Трепростиніл-індуковане cAMP-накопичення може бути підвищене при комбінуванні з форсколіном, прямим активатором аденілатциклази.

Гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники можуть бути оброблені комбінацією трепростинілу й форсколіну без будь-якого помітного впливу на їхню життєздатність та їх здатність надалі пройти асиметричний розподіл клітин і диференціацію в еритроїдну й гранулоцитарну/моноцитарну лінію диференціювання. Таким чином, число клітин, необхідних для трансплантації буде значно нижчим в порівнянні із клітинами, необхідними для трансплантації без попередньої обробки аналогом простацикліну й форсколіном.

Попередня обробка гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників комбінацією трепростинілу й форсколіну підсилює приживання кісткового мозку в опромінених організмах.

Додаткова обробка реципієнта трепростинілом in vivo додатково підсилює приживання кісткового мозку.

Зазначені інгібітори DPP-IV більш конкретно вибирають із групи гліптинів.

Як це застосовується в даному документі й у формулі винаходу, форма однини, наприклад "а", "an" і "the" включає форму однини, якщо тільки контекст явно не вказує інше.

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

Трепростиніл є синтетичним й метаболічно стабільним аналогом простацикліну. Трепростиніл представлений на ринку як Remodulin™. Трепростиніл є (1R, 2R, 3aS, 9aS)-[[2,3,3a, 4,9,9a-гексагідро-2-гідрокси-1-[(3S)-3-гідроксиоктил]-1H-бенз[*f*] інден-5-іл]окси]оцтової кислоти моноватрієву сіль.

Ілопрост представлений на ринку як "Ilomedine" і є 5-[(E)-(1S, 5S, 6R, 7R)-7-гідрокси-6[(E)-(3S, 4RS)-3-гідрокси-4-метил-1-октен-6-иніл]-бі-цикло[3,3,0]октан-3-іліден]пентановою кислотою.

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

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

Відповідно до даного винаходу термін "аналоги простацикліну" включає функціональні похідні й функціональні аналоги зазначених речовин.

Терміни "аналог" або "похідне" відносяться до хімічної молекули, яка подібна до інших хімічних речовин за структурою й функціями, часто відрізняючись за структурою на один елемент або групу, які можуть відрізнитися шляхом зміни більш ніж однієї групи (наприклад, 2, 3, або 4 груп), якщо вона зберігає ту ж функцію, що й батьківська хімічна сполука. Такі модифікації є звичайними для кваліфікованих фахівців, і включають, наприклад, додаткові або заміщені хімічні групи, такі як складні ефіри або амідні кислоти, захисні групи, такі як бензильна група для спирту або тіола, і трет-бутоксикарбонільні групи для аміну. Також включені модифікації алкільних бічних ланцюгів, таких як алкільні замісники (наприклад, метильні, диметильні, етильні тощо), модифікації на рівні насиченості або ненасиченості бічних ланцюгів і додавання модифікованих груп, таких як заміщені фенільні й феноксильні групи. Похідні також

можуть включати кон'югати, такі як біотинові або авідинові групи, ферменти, такі як пероксидаза хрину та подібні до них, і радіо-мічені, біолюмінесцентні, хемілюмінесцентні або флуоресцентні групи. Крім того, групи можуть бути додані до засобів, описаних у даному документі, для зміни їх фармакокінетичних властивостей, таких як для посилення напіврозпаду *ex vivo*, або для посилення їх здатності проникати в клітини, серед інших бажаних властивостей. Проліки, щодо яких відомо, що вони підсилюють численні бажані якості фармацевтичних препаратів (наприклад, розчинність, біодоступність, легкість виробництва тощо), також включені.

Термін "похідне" також включає зміни, внесені в вихідну молекулу, включаючи доповнення, видалення й/або заміщення, які забезпечують для функціонально еквівалентні або функціонально поліпшені молекули.

Відповідно до конкретного втілення винаходу, похідне трепростинілу вибирають із групи кислих похідних трепростинілу, проліків трепростинілу, поліморфних модифікацій трепростинілу, безводних поліморфних модифікацій трепростинілу або ізомерів трепростинілу.

Аналогічно, ілопрост, цикапрост або берапрост можуть бути похідними із групи кислих похідних, отриманих з них проліків, поліморфних модифікацій або ізомерів.

Відповідно до конкретного втілення винаходу, два, більш конкретно, три або більше різних аналогів простацикліну можуть бути застосовані в способі запропонованому винаходом. Альтернативно можуть бути застосовані чотири, п'ять або шість або ще більше різних аналогів простацикліну.

Більш конкретно, на додачу до аналога простацикліну, може бути застосований (диметильований) простагландин E2.

16,16-диметил PGE₂ є конкурентним інгібітором гідрокси-PGDH, але він не є субстратом для ферменту. Через його стійкість до метаболізму під дією гідрокси-PGDH, він має продовжений час напіврозпаду *in vivo*. 16,16-диметил-PGE₂ діє як агоніст на більшість підтипів рецепторів EP. К_d активації ізольованих EP₂ рецепторів становить приблизно 1 нМ.³ 16,16-диметил-PGE₂ застосовують для збереження властивостей самовідновлення, запобігаючи диференціації гемопоетичних стовбурових клітин при експансії в культурі.^{4,5}

DPP-IV є неklasичною сериновою, мембранозв'язаною амінодипептидазою, яка видаляє дипептиди Хаа-Про з аміно-кінця поліпептидів і білків. Всередині кісткового мозку, DPP-IV локалізована в спеціалізованих мікродоменах на мембранах строми сполучної тканини.

Гліптини є класом селективних гіпоглікемічних засобів, які інгібують DPP-IV, яка застосовується, в основному, при лікуванні цукрового діабету. Гліптини допомагають знизити постпрандіальну глюкозу шляхом інгібування розщеплення глюкагоноподібного пептиду 1 (GLP-1), який підсилює секрецію інсуліну, синтезованого клітинами стінки кишківника у відповідь на прийом їжі.

Гліптини, втілені в даному винаході, більш конкретно вибирають із групи, яка складається із ситагліптину, вілдагліптину, алогліптину, саксагліптину, лінагліптину, анагліптину, тенелігліптину, гемігліптину або дутогліптину й будь-яких інших гліптинів, які, як було показано, є потужними інгібіторами очищеної, розчинної дипептидилпептидази або дипептидилпептидази клітинної поверхні.

Більш конкретно, введення інгібітору DPP-IV індивідуумові може бути здійснене до, під час або після введення HSC, які були попередньо оброблені відповідно до винаходу.

Відповідно до винаходу, терміни "обробка", "попередня обробка" або "інкубація" можуть бути застосовані як взаємозамінні. Терміни застосовують у відношенні до ізольованих гемоетичних стовбурових клітин, які приведені в контакт із аналогом простацикліну й засобом, який підвищує рівень cAMP.

Ще більш конкретно, це означає, що зразок, який містить гемопоетичні стовбурові клітини, змішують, щонайменше, з одним аналогом простацикліну й, щонайменше, з одним засобом, який підвищує рівень cAMP, з одержанням суміші, інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання G альфа_s-сигнального шляху в зазначених клітинах.

Відповідно до конкретного втілення, композиція для застосування може містити трепростиніл разом із одним з поміж наступних: ілопрост, берапрост або цикапрост, і засобом, який підвищує рівень cAMP, більш конкретно, форсколіном. Альтернативно, трепростиніл може бути змішаний у комбінації з більше, ніж одним, наприклад, із двома, трьома, чотирма або п'ятьма іншими аналогами простацикліну, наприклад, без обмежень, з ілопростом, берапростом або цикапростом або їх фізіологічно прийнятними солями в комбінації із засобом, який підвищує рівень cAMP, більш конкретно, з форсколіном.

Відповідно до застосування винаходу, інгібітор DPP-IV є вілдагліптином і гемопоетичні стовбурові клітини перед трансплантацією обробляють *in vitro* трепростинілом і форсколіном.

Відповідно до альтернативного способу, інгібітор DPP-IV вибирають з поміж ситагліптину, алогліптину, саксагліптину й лінагліптину, анагліптину, тенелігліптину, гемігліптину й дутогліптину й гемопоетичні стовбурові клітини перед трансплантацією обробляють *in vitro* трепростинілом і форсколіном.

5 Відповідно до додаткового альтернативного способу інгібітор DPP-IV вибирають з поміж ситагліптину, вілдагліптину, алогліптину, саксагліптину й лінагліптину, анагліптину, тенелігліптину, гемігліптину й дутогліптину й гемопоетичні стовбурові клітини перед трансплантацією обробляють *in vitro* ілопростом і форсколіном.

10 Відповідно до додаткового альтернативного способу інгібітор DPP-IV вибирають з поміж ситагліптину, вілдагліптину, алогліптину, саксагліптину й лінагліптину, анагліптину, тенелігліптину, гемігліптину й дутогліптину й гемопоетичні стовбурові клітини перед трансплантацією обробляють *in vitro* берапростом і/або цикапростом і форсколіном.

Відповідно до конкретного втілення для попередньої обробки стовбурових клітин можуть бути застосовані засіб, який підвищує рівень циклічного AMP (сAMP), або, як альтернатива, ліганд до рецептора простагландину EP. Приклади засобів, які підвищують рівень сAMP, включають, без обмежень, дибутирил-сAMP (DBсAMP), форболовий ефір, форсколін, скларелін, 8-бром-сAMP, холерний токсин (СТ), амінофілін, 2,4-динітрофенол (DNP), норадреналін, епінефрин, ізопротеренол, ізобутилметил-ксантин (IBMX), кофеїн, теофілін (диметилксантин), допамін, роліпрам, простагландин E₁, простагландин E₂, гіпофізарний аденілатциклаза-активуючий поліпептид (PACAP) і вазоактивний кишковий поліпептид (VIP), серед інших, відомих у даній галузі техніки, можуть бути додані до інкубації до стовбурових клітин або до суміші стовбурові клітини/трепростиніл або стовбурові клітини/трепростиніл, ілопрост, цикапрост і/або берапрост. Приклади засобів, які підвищують рівень сAMP, також включають сAMP і аналоги сAMP, такі як sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS), серед іншого.

25 Форсколін є найкращим для включення в композицію.

Кількість аналога простацикліну залежить від способу одержання стимульованих HSC.

Дуже конкретно, для застосування відповідно до винаходу, ефективна концентрація трепростинілу перебуває в діапазоні від 0,1 мкМ до 100 мкМ, більш конкретно, від 1 мкМ до 50 мкМ, більш конкретно, від 5 мкМ до 25 мкМ, більш конкретно, приблизно 10 мкМ.

30 Відповідно до винаходу, термін "приблизно" включає відхилення чисельного значення не більше ніж на 10 %, більш конкретно, не більше ніж на 5 %, ще більш конкретно, не більше ніж на 1 %. Як приклад, термін "приблизно 10 мкМ", таким чином, визначає діапазон від 9 до 11 мкМ, більш конкретно, від 9,5 до 10,5 мкМ, більш конкретно, від 9,9 до 1,1 мкМ.

Відповідно до додаткового конкретного втілення винаходу, оптимальний діапазон концентрацій для аналога простацикліну відповідає від 10- до 30-разовому перевищенню його EC₅₀ для стимуляції накопичення сAMP у зазначених клітинах.

Відповідно до конкретного втілення винаходу, співвідношення аналога простацикліну й форсколіну приблизно може становити 1:3. HSC, оброблені форсколіном і аналогами простацикліну, можуть бути очищені перед повторною імплантацією, однак, дані HSC також можуть бути реімплантовані без подальших етапів очищення, оскільки невеликі кількості форсколіну можуть бути присутніми, але не спричиняти ніяких негативних побічних ефектів.

Відповідно до конкретного аспекту, концентрація засобу, який підвищує рівень сAMP, більш конкретно, форсколіну, який застосовується для інкубування стовбурових клітин, може становити між 1 мкМ і 100 мкМ, більш конкретно, між 10 мкМ і 50 мкМ, приблизно 30 мкМ.

45 Інгібітор DPP-IV уводять, щонайменше, за 5, більш конкретно, щонайменше, за 10, більш конкретно, щонайменше, за 15, більш конкретно, щонайменше, за 24 години до трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Альтернативно, інгібітор DPP-IV може бути введений пацієнтові предопераційно, тобто за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 днів до проведення трансплантації, і/або після операції, тобто, щонайменше, через 5, більш конкретно, щонайменше, через 10, більш конкретно, щонайменше, через 15, більш конкретно, щонайменше, через 24 години після трансплантації, аж до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше днів.

Більш конкретно, вілдагліптин може бути введений індивідуумові в кількості від 50 до 200 мг/день, більш конкретно, від 75 до 150 мг/день, більш конкретно, приблизно 100 мг/день.

55 Більш конкретно, ситагліптин може бути введений індивідуумові в кількості від 50 до 200 мг/день, більш конкретно, від 75 до 150 мг/день, більш конкретно, приблизно 100 мг/день.

Більш конкретно, саксагліптин може бути введений індивідуумові в кількості приблизно від 2,5 до 10 мг/день, більш конкретно, приблизно 5 мг/день.

60 Більш конкретно, лінагліптин може бути введений індивідуумові в кількості приблизно від 2,5 до 10 мг/день, більш конкретно, приблизно 5 мг/день.

Більш конкретно, алогліптин може бути введений індивідуумові в кількості приблизно від 12,5 до 50 мг/день, більш конкретно, приблизно 25 мг/день.

Спосіб запропонований винаходом бажано забезпечує стимульовані стовбурові клітини, які можна безпосередньо вводити індивідуумам і які надалі стимулюють хоумінг і приживання зазначених клітин.

"Індивідуум" у широкому сенсі означає включення будь-якої тварини, більш конкретно, ссавців, більш конкретно, людей, яким трансплантують стовбурові клітини, попередньо оброблені відповідно до винаходу.

HSC, оброблені гліптином і аналогом простагліну, можуть бути очищені до повторної трансплантації, однак, дані HSC також можуть бути повторної трансплантовані без подальших етапів очищення.

Період часу, необхідний для стимулювання G-альфа_s-сигнального шляху в зазначених клітинах, можуть бути визначено відповідно до відомих способів, наприклад, шляхом застосування вимірювань cAMP, серед яких є багато варіантів: RIA, резонансний перенос енергії флуоресценції (FRET) з EPAC (epac1) (Ponsiouen B. et al., EMBO reports, 5, 12, 1176-1180 (2004)), радіохімічні способи тощо. Стимульовані клітини, у яких протікає G-альфа_s-сигнальний шлях, можуть бути обрані або дискриміновані або ізольовані з нестимульованих клітин способами, відомими в даній галузі техніки, таким як cAMP-репортер на основі FRET.

Період часу, який необхідний для інгібування пептидазної активності CD26 і ефективний для посилення міграційної відповіді на SDF-1 у зазначених клітинах, може бути визначений відповідно до відомих способів, наприклад, шляхом флуорометричного визначення розщеплення Ала-Про-7-амідо-трифторметилкумарину. Альтернативно, інгібування розщеплення природних субстратів, таких як CXCL12 або GLP-1 можна контролювати за допомогою HPLC або ELISA.

Відповідно до втілення винаходу, час інкубації для відповідних клітини приблизно становить від 30 хв. до 24 годин, бажано, приблизно від 1 години до 12 годин, бажано, приблизно від 1 години до 4 годин.

Відповідно до додаткового втілення, *in vitro* час інкубації для попередньої обробки HSC аналогом простагліну й засобом, який підвищує рівень cAMP, щонайменше, дорівнює 10 хвилинам, більш конкретно, щонайменше, 20 хвилинам, щонайменше, 30 хвилинам, щонайменше, 40 хвилинам, щонайменше, 50 хвилинам, щонайменше, 60 хвилинам.

Відповідно до додаткового аспекту винаходу, щонайменше, 1×10^5 донорських клітин/мл інкубували з аналогом простагліну й засобом, який підвищує рівень cAMP, при приблизно 37 °C.

cAMP-залежний шлях є шляхом істотного сприяння приживленню гемопоетичних стовбурових клітин. Авторами винаходу було показано, що аналог простагліну може запускати підвищення cAMP у гемопоетичних стовбурових клітинах. Це досягається шляхом активації декількох рецепторів, тобто IP- і EP-рецепторів, таким чином, приводячи до посилення G альфа_s-сигнального шляху. Відповідно, такі аналоги простаглінів як трепростиніл, ілопрост, цикапрост або берапрост, більш ефективно підвищують рівні cAMP.

Термін "гемопоетичні стовбурові клітини" (HSC) або більш загальний термін "стовбурові клітини" слід розуміти як еквівалентні терміни в описі даного винаходу, і, загалом вони відносяться або до плюрипотентних, або до мультипотентних "стовбурових клітин", які призводять до появи типів клітин крові, які включають мієлоїдну (наприклад, моноцити й макрофаги, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, еритроцити, мегакаріоцити/тромбоцити, деревоподібні клітини) і лімфоїдну лінії диференціювання (наприклад, Т-клітини, В-клітини, NK-клітини), та інші, відомі в даній галузі техніки.

"Стовбурові клітини" звичайно характеризуються за їхньою здатністю до формування декількох типів клітин (тобто мультипотентні) і за їхньою здатністю до самовідновлення. Однак також можуть бути включені олігопотентні й уніпотентні клітини-попередники.

Термін "клітина-попередник" включає таку біологічну клітину, яка, як стовбурова клітина, має тенденцію до диференціації в конкретний тип клітин, але вже більш специфічний, ніж в стовбурових клітин і підштовхується до диференціації у свою клітину-«мішень». Клітини-попередники є ранніми нащадками стовбурових клітин, які можуть диференціюватися з формуванням одного або більше типів клітин. Найважливіша відмінність між стовбуровими клітинами й клітинами-попередниками полягає в тому, що стовбурові клітини можуть реплікуватися нескінченно, у той час як клітини-попередники можуть ділитися тільки обмежене число раз. Більшість клітин-попередників описують як олігопотентні, їх можна порівняти з дорослими стовбуровими клітинами. Мова йде про те, що, що клітини-попередники перебувають на наступній стадії клітинної диференціації. Вони перебувають в "посередині" між

стовбуровими клітинами й повністю диференційованими клітинами. Тип потенціалу, який вони мають, залежить від типу їх "батьківських" стовбурових клітин, а також від їхньої ніші. Клітини-попередники можуть переміщатися по організму й мігрувати в напрямку до тканини, де вони необхідні. Багато властивостей є загальними для дорослих стовбурових клітин і клітин-попередників.

Клітини-попередники виявляються у дорослих організмах, і вони діють як система репарації організму. Вони поповнюють спеціальні клітини, але також підтримують кров, шкіру й кишкові тканини. Їхнім також можна виявити в ембріональній тканині, що розвивається, підшлункової залози.

Термін "гемопоез", загалом, відноситься до процесу клітинної диференціації або формування спеціалізованих клітин крові з HSC. Під час розвитку, гемопоез транслюкується з печінки ембріона в кістковий мозок, який потім залишається місцем гемопоеза протягом дорослого життя. Після локалізації в кістковому мозку, HSC не розподіляються випадковим чином по всій порожнині кістки. Скоріше, HSC звичайно перебувають у безпосередній близькості від ендостіальних поверхонь. Більш зрілі стовбурові клітини збільшують свою кількість в міру збільшення відстані від поверхні кістки.

Гемопоетичні тканини містять клітини з можливістю довгочасної й короточасної регенерації, а також комітування мультипотентних, олігопотентних й уніпотентних клітин-попередників.

Кістковий мозок, більш конкретно, може бути зразком який містить HSC.

HSC можуть бути отримані за допомогою відомих методик з будь-якого джерела, про яке відомо, що воно містить HSC, більш конкретно, з периферійної крові, пуповини або пуповинної крові, плаценти й кісткового мозку. Альтернативно, можливі також такі джерела, як фетальна печінка, фетальна селезінка й аорта-гонада-мезонефрос тварин. HSC, джерелом походження яких є людина, кращі для способів і композицій запропонованих винаходом.

Наприклад, HSC можуть бути знайдені в кістковому мозку дорослих, включаючи стегнову кістку, тазостегновий суглоб, ребра, грудину й інші кістки. HSC можуть бути отримані безпосередньо шляхом витягу з тазостегнового суглоба, із застосуванням голки й шприца, або із крові, часто з наступною попередньою обробкою цитокинами, такими як G-CSF (гранулоцитарні колонієстимулюючі фактори), які спонукають клітини до вивільнення з компартмента кісткового мозку.

HSC можуть бути ідентифіковані відповідно до певних фенотипових або генотипових маркерів. Наприклад, HSC можуть бути ідентифіковані за їхніми малими розмірами, відсутністю маркерів лінії диференціювання (lin), слабким фарбуванням (бічна популяція) вітальними барвниками, такими як родамін 123 (ρ^{10}) або Хьохст 33342, і наявністю різних антигенних маркерів на їхній поверхні, багато з яких належать до серій кластерів диференціювання (наприклад, CD5, CD11b, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4, Ter-119 і c-Kit). HSC в основному негативні щодо маркерів, які звичайно застосовують для виявлення комітування лінії диференціювання, і, таким чином, їх часто позначають як lin(-) клітини. Більшість людських HSC можуть бути охарактеризовані як CD5⁺, CD45R (B220)⁺, CD11⁺, GR-1⁺, CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{low}, c-Kit/CD117⁺ і lin(-). Однак, не всі стовбурові клітини охоплені цими комбінаціями, оскільки деякі HSC є CD347⁺ і CD38⁺. Також деякі дослідження показують, що раннім стовбуровим клітинам може не вистачати c-Kit на клітинній поверхні.

Для очищення lin(-) HSC за допомогою проточної цитометрії, або FACS, може бути застосована панель антитіл до маркерів лінії диференціювання зрілої крові для виснаження lin(+) клітин або пізніх мультипотентних клітин-попередників (MPP), включаючи, наприклад, антитіла до CD3 епсилон, 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 серед інших, відомі в даній галузі техніки. Додаткові способи очищення відомі в даній галузі техніки, наприклад, способи, у яких застосовують конкретний підпис "молекул активації сигнального шляху лімфоцитів" (SLAM), родини молекул клітинної поверхні.

HSC чи то з пуповинної крові, кісткового мозку, периферійної крові або з інших джерел, можна вирощувати або розмножувати в будь-якому придатному, комерційно доступному або приготованому на замовлення середовищі, із сироваткою або без неї. HSC, джерелом походження яких є людина, є кращим втіленням винаходу. Наприклад, у певних втіленнях, у вільному від сироватки середовищі може бути застосований альбумін і/або трансферин. Крім того, можуть бути включені цитокини, такі як ліганд Flt-3, фактор стовбурових клітин (SCF) і, серед іншого, тромбопоетин (TPO). HSC також можна вирощувати в посудинах, таких як біореактори. Придатні для ex vivo розмноження HSC можуть також включати HSC-підтримуючі клітини, такі як стромальні клітини (наприклад, лімфоретикулярні стромальні клітини), які

можуть бути отримані, наприклад, при дезагрегації лімфоїдної тканини, і які, як було показано, сприяють *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo* підтримці, росту й диференціації HSC, а також їх потомства.

Термін "пуповинна кров" або "пупочна пуповинна кров", загалом, відноситься до відносно невеликої кількості крові (аж до приблизно 180 мл) Від новонародженої дитини, яка вертається до неонатального кровообігу. Пуповинна кров багата на HSC, і її можна одержувати й зберігати для наступного застосування відповідно до відомих у даній галузі техніки методик.

Терміни "*ex vivo*" або "*in vitro*" відносяться до дій, які відбуваються поза організмом, таких як експериментування або вимірювання, виконані в або на живій тканині в штучному середовищі поза організмом, бажано, з мінімальною зміною природних умов. У певних втіленнях, такі тканини або можуть бути зібрані й заморожені, і пізніше розморожені для *ex vivo* обробки. Експерименти або процедури із тканинною культурою, які тривають довше кількох днів, із застосуванням живих клітин або тканини, як правило, розглядаються як "*in vitro*", хоча цей термін може бути застосований як взаємозамінний з *ex vivo*. Посилання на "*ex vivo* введення", "*ex vivo* обробка" або "*ex vivo* терапевтичне застосування", загалом, відносяться до медичних процедур, під час яких один або кілька органів, клітин або тканин, отриманих з живого або недавно померлого суб'єкта, необов'язково, очищених/збагачених, піддають обробці або процедурі для обробки стовбурових клітин або клітин-попередників (наприклад, *ex vivo* стадія введення, яка включає інкубування клітин з композицією запропонованою даним винаходом для посилення потенціалу приживання HSC), і потім уведенню тому ж або іншому індивідуумові після даної необов'язкової обробки або процедури.

Кількість інгібітору DPP-IV, уведена індивідуумові, залежить від характеристик даного суб'єкта, таких як загальний стан здоров'я, вік, стать, маса тіла й легкість перенесення лікарських препаратів, а також ступінь, сила й тип реакції на трепростиніл і/або клітинний трансплантат.

Індивідууми, яким трансплантують стовбурові клітини, можуть страждати на будь-яке захворювання кісткового мозку, тобто захворювання, у яких нормальна архітектура кісткового мозку витісняється злоякісними новоутвореннями, серповидноклітинну анемію, мієлодиспластичний синдром, мієлопроліферативний розлад, апластичну анемію або інфекцію, які призводять до зниження продукування клітин крові й тромбоцитів крові. Зазначеними захворюваннями кісткового мозку можуть бути, наприклад, лейкемія, порушення компартменталізації клітин крові або необхідність у трансплантації кісткового мозку після хіміотерапії або лікування опроміненням.

Ще більш конкретно, порушення компартменталізації клітин крові може бути гемоглобінопатією, такою як таласемія, порушенням функції нейтрофілів-гранулоцитів, порушенням функції нейтрофілів-гранулоцитів, порушенням в Т- і/або В-лімфоцитах, наприклад, важким комбінованим імунodefіцитом, агамаглобулінемією Брутона.

Застосування для лікування індивідуумів, які страждають на захворювання кісткового мозку, наприклад, внаслідок хіміотерапії або опромінення і які, отже, проходять трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин шляхом уведення одного або більше інгібіторів DPP-IV протягом обмеженого періоду часу після трансплантації кісткового мозку охоплюється даним винаходом.

Щонайменше, один аналог простацикліну разом з одним або більшою кількістю засобів, які підвищують рівень cAMP, для попередньої обробки ізольованих стовбурових клітин, і один або більше інгібіторів DPP-IV пацієнтам із трансплантатами, можуть бути застосовані для підвищення приживання людських HSC під час трансплантацій кісткового мозку або при відновленні кісткового мозку шляхом застосування HSC. Прискорене приживання скорочує період, протягом якого суб'єкти піддаються потенційно смертельним інфекціям, кровотечам та іншим серйозним ускладненням. Тому, аналог простацикліну в комбінації із гліптіном повинен бути корисним терапевтичним варіантом для попередньої обробки донорського кісткового мозку для посилення приживання кісткового мозку (тобто за рахунок зменшення числа необхідних клітин і скорочення тривалості аплазії кісткового мозку).

Безперервна обробка (лікування) суб'єктів протягом декількох днів після трансплантації кісткового мозку інгібітором DPP-IV приводила до поліпшеного клінічного результату шляхом поліпшення приживання (тобто, за рахунок зменшення числа необхідних клітин і скорочення тривалості аплазії кісткового мозку).

Таким чином, відповідно до конкретного втілення, обробку проводять, щонайменше, протягом одного дня, більш конкретно, п'яти днів після трансплантації, ще більш конкретно, протягом, щонайменше, 10 днів, ще більш конкретно протягом, щонайменше, 14 днів після трансплантації.

Інгібітор DPP-IV може бути введений суб'єктові за допомогою будь-якого режиму, який є відомим і може бути застосований й в даній галузі техніки. Ще більш конкретно, забезпечують ентеральне, внутрішньовенне або підшкірне введення.

Внутрішньовенне введення є кращим способом введення.

5 Однак інгібітор DPP-IV може перебувати в доступній перорально формі, обираючи із групи форм із пролонгованим вивільненням, таблеток або капсул.

Винахід також забезпечує комплект, який включає

- певну кількість, щонайменше, одного аналога простагліну й форсколіну у першій стандартній лікарській формі,

10 - і певну кількість, щонайменше, одного інгібітору DPP-IV, обраного з поміж гліптину, у формі двох, трьох, чотирьох або більше окремих одиниць компонентів а) і b), більш конкретно, для застосування для лікування захворювання кісткового мозку, більш конкретно, захворювання кісткового мозку є лейкемією, порушенням компартменталізації клітин крові, захворюванням кісткового мозку, індукованим хіміотерапією або опроміненням.

15 Винахід, крім того, охоплює упаковання, яке включає запропонований винаходом набір разом з інструкцією із застосування.

Вищенаведений опис буде більш повно зрозумілим з посиланням на наступні приклади. Такі приклади, однак, просто є репрезентативними способами здійснення на практиці одного або більше втілень даного винаходу, і їх не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу.

20 Приклади:

Приклад 1:

Аналіз *in vitro* міграції

Мишачі гемопоетичні клітини-попередники попередньо обробляли *in vitro* комбінацією 10 мкМ трепростинілу (Trep) і 30 мкМ форсколіну (Fsk) ("Sigma Aldrich", Відень, Австрія) або розчинником протягом 1-ї години при 37 °C в середовищі для стовбурових клітин, яке містить фактор росту [(StemSpan™ (SFEM) (Stemcell technologies, США) (50 нг/мл фактора мишачих стовбурових клітин (SCF), 50 нг/мл ліганда fms-подібної тирозинкінази-3 (Flt3), 50 нг/мл інтерлейкіну 11 (IL11) і 150 нг/мл мишачого інтерлейкіну 3 (il3)], придбаного в компанії "Peprotech" (Лондон, Великобританія)). Після цього клітини промивали й ресуспендували при 30 2×10^6 клітини/мл у середовищі.

Суспензію клітин (0,1 мл, яка містить 2×10^5 клітин) додавали у верхню камеру вставки Transwell™ (діаметр пор – 5 мкМ). Нижню камеру заповнювали середовищем або середовищем, яке містить 100 нг/мл мишачого стромального фактора-1 (SDF-1=CXCL12). Клітинам дозволяли мігрувати протягом 4-х год. при 37 °C. Надалі, число клітин, видалених з 35 нижньої камери, визначали за допомогою лічильника клітин. Число клітин, що мігрували, виражали у відсотках від загального числа клітин, поміщених у верхню камеру.

Клітини CD34+ пуповинної крові людини підтримували в середовищі для стовбурових клітин [X-VIVO™ 15 ("Lonza", Швейцарія), доповненому 50 нг/мл людських Flt3, 50 нг/мл людського тромбопоетина й 50 нг/мл людських (SCF), придбаних у компанії "Peprotech" (Лондон, 40 Великобританія)]. Аналіз міграції проводили, як описано для мишачих клітин, за винятком того, що рекомбінантний людський SDF-1 додавали в нижню камеру. Наведені дані є середнім \pm SEM з 3 незалежних експериментів, виконаних у трьох повторностях. Статистично значимі відмінності були оцінені за допомогою однобічного аналізу ANOVA, а потім за допомогою множинних порівнянь Даннетта (*, $p < 0,05$).

45 Дані наведено на Фігурі 1.

Приклад 2:

Інгібування CXCR4 антагоністом AMD3100 SDF-1/CXCL12-індукованої міграції мишачих гемопоетичних клітин-попередників, які були стимульовані в присутності трепростинілу й форсколіну

50 Гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники преінкубували із трепростинілом (10 мкМ; T) і форсколіном (30 мкМ; F) протягом 1 год. при 37 °C, промивали й ресуспендували за щільності клітин, яка дорівнювала 2×10^6 клітин/мл. Суспензію клітин (2×10^5 клітин в 0,1 мл) додавали у верхню камеру вставки Transwell™, яка містила середовище з 10 мкМ CXCR4 антагоніста AMD3100 (10 мкМ) і без нього. Середовище в нижній камері містило 100 нг/мл 55 мишачих SDF-1. Інкубацію продовжували протягом 4 год. при 37 °C; після цього клітини, видалені з нижньої камери, підраховували, як зазначено в легенді до Фіг. 1. Наведені дані є середнім \pm SEM їх трьох незалежних експериментів, виконаних у трьох повторностях. Статистично значимі відмінності оцінювали за допомогою однофакторного ANOVA, а потім за допомогою множинних порівнянь Даннетта (***, $p < 0,001$).

CXCR4 антагоніст AMD3100 інгібує SDF-1/CXCL 12-індуковану міграцію мишачих гемопоетичних клітин-попередників, які були стимульовані в присутності трепростинілу й форсколіну.

Дані наведено на Фігурі 2.

5 Приклад 3:

Вілдагліптин підсилює SDF-1/CXCL12-індуковану міграцію гемопоетичних клітин-попередників, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном.

Мишачі гемопоетичні клітини-попередники (mHPC; ліва панель) і людські CD34+ клітини, отримані з пуповинної крові (права панель) преінкубували за відсутності або в присутності трепростинілу (10 мкМ; T) і форсколіну (30 мкМ; F) протягом 1-ї години. Після цього, суспензію клітин (2×10^5 клітини в 0,1 мл) додавали у верхні камери вставок Transwell™, які містили середовище з 30 нМ вілдагліптину або без нього (Vil). Середовище в нижній камері за необхідності містило 100 нг/мл мишачих або людських SDF-1. Інкубацію продовжували протягом 4-х годин при 37 °C; після цього клітини, видалені з нижньої камери, підраховували, як зазначено в легенді до Фіг. 1. Наведені дані є середнім \pm SEM із трьох незалежних експериментів, виконаних у трьох повторностях. Статистично значимі відмінності були оцінені за допомогою однобічного аналізу ANOVA, а потім за допомогою множинних порівнянь Даннетта (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Дані наведені на Фігурі 3.

20 Приклад 4:

Аналіз in vivo хоумінга

Вілдагліптин і трепростиніл підсилювали хоумінг гемопоетичних клітин-попередників, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном, але були взаємно антагоністичні при комбінуванні in vivo.

25 Мишачі гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники ізолювали з 8-тижневих BALB/c мишей-донорів (15 мишей) за допомогою магнітного сортування клітин, застосовуючи антитіла, специфічні до лінії диференціювання, які зберігають клітини мієлоїдної, еритроїдної, мегакаріоцитарної і лімфоїдної лінії диференціювання і мікробусин MACS ("Milteny Biotec", Бергш-Гладбах, Німеччина) відповідно до інструкцій виробника. sca1+, c-Kit+, клітини негативної лінії диференціювання (Lin-) преінкубували за відсутності (контроль розчинником = необроблені клітини) і в присутності комбінації трепростинілу (10 мкМ) і форсколіну (30 мкМ) (= обробленими клітини) протягом 1-ї години.

30 (Необроблені й оброблені) гемопоетичні стовбурові клітини-попередники (1×10^6 клітин) надалі вводили за допомогою ін'єкції через хвостову вену летально (9 г) опроміненим мишам-реципієнтам BALB/c. Миші-реципієнти не одержували ніякої додаткової обробки (стовпчики, позначені як необроблені клітини й оброблені клітини) або мишам вводили за допомогою ін'єкції трепростиніл (3 мкг/8 год.; стовпчики, позначені як "in vivo trep"), вілдагліптин (10 мкг/кг/24 год.; стовпчики, позначені як "in vivo vil") або комбінацію трепростинілу й вілдагліптину (стовпчики, позначені як "in vivo trep+vil"), починаючи за 24 год. перед трансплантацією кісткового мозку.

40 Здатність клітин до хоумінгу в кістковий мозок оцінювали через 20 годин за допомогою аналізу колонієутворення. Стегна й великі гомілкові кістки промивали PBS для збору клітин кісткового мозку. Еритроцити видаляли буфером для лізису еритроцитів ("Stemcell technologies", США). Решту клітин ресуспендували в напіврідкому середовищі на основі метилцелюлози (MethoCult, "stemcell technologies", США). Кожну умову оцінювали в трьох повторностях. Специфічні фактори росту додавали для підтримування формування обох колонієутворюючих одиниць, грануло-моноцитів (CFU-GM) і колонієутворюючих одиниць еритроцитів (CFU-E), тобто, еритропоетин 3 Од./мл, IL3 10 нг/мл, IL7 10 нг/мл, GM-CSF 10 нг/мл. Культури підтримували протягом 6-ти днів при 37 °C у зволоженій атмосфері, яка містила 5 % CO₂. Після цього, число колоній підраховували під мікроскопом. За визначенням ці колонії виникали з тих клітин, які вводили за допомогою ін'єкції і які мігрували в кістковий мозок, тому що ендogenous кістковий мозок мишей-реципієнтів був зруйнований опроміненням. Відповідно, ніяких колоній не одержують, якщо висівали кістковий мозок опромінених мишей, яким не вводили за допомогою ін'єкції гемопоетичні клітини-попередники, (негативний контроль).

55 Очевидно, що (i) in vitro преінкубація із трепростинілом і форсколіном підсилювала хоумінг (порівн. стовпчики, позначені як необроблені й оброблені),

(ii) обробка мишей-реципієнтів тільки трепростинілом і/або тільки вілдагліптином не сприяє хоумінгу (порівн. другий стовпчик "необроблені" зі стовпчиками 3-5, позначеними як «+ in vivo trep», «+in vivo vil», «+in vivo trep+vil»),

(iii) обробка мишей-реципієнтів, яким вводили за допомогою ін'єкції оброблені клітини або із трепростинілом, або з вілдагліптіном, сприяла хоумінгу (порівн. шостий стовпчик "необроблені" зі стовпчиками 7 і 8, позначеними як «+ in vivo trep», «+in vivo vil»), але

(iv) дана комбінація (останній правий стовпчик, позначений як «+in vivo trep+vil») був менш ефективним, ніж введений окремо (стовпчики 7 і 8, позначені як «+ in vivo trep», «+ in vivo vil»). Таким чином, при комбінуванні in vivo, трепростиніл і вілдагліптин поводяться взаємно антагоністично.

Вілдагліптин і трепростиніл підсилюють хоумінг гемопоетичних клітин-попередників, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном, але поводяться взаємно антагоністично при комбінуванні in vivo. Дані наведено на Фігурі 4.

Приклад 5:

Аналіз in vivo приживання

Комбіноване введення трепростинілу й вілдагліптину летально опроміненим мишам-реципієнтам BALB/c, яким вводили за допомогою ін'єкції гемопоетичні клітини-попередники, попередньо оброблені in vitro комбінацією трепростинілу й форсколіну, були менш ефективними щодо підвищення виживання цих мишей, у порівнянні з уведенням in vivo окремо або вілдагліптину, або трепростинілу.

Гемопоетичні клітини-попередники ізолювали з кісткового мозку мишей-донорів (BALB/c), як зазначено в легенді до Фіг. 4. Клітини обробляли in vitro 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном або розчинником протягом 1-ї години при 37 °C. Після промивання, $0,2 \times 10^6$ гемопоетичних клітин-попередників негативної лінії диференціювання вводили за допомогою ін'єкції через хвостову вену летально опроміненим (9 Gy) мишам-реципієнтам BALB/c (10/групу). Якщо не було попередньої обробки in vitro комбінацією трепростинілу й форсколіну, то дане число гемопоетичних клітин-попередників було занадто малим, щоб урятувати тварин-реципієнтів. Відповідно, група мишей, які одержували клітини, які не були попередньо оброблені, вмерла протягом першого тижня (чорна лінія, CTRL). Обмеженої кількості гемопоетичних стовбурових клітин, було досить для того, щоб урятувати 50 % мишей, які одержували попередньо оброблені клітини, а потім були оброблені трепростинілом (3 мкг/8 год. s.c. протягом 10-ти днів; червона крива, позначена як in vitro, попередньо оброблені клітини + in vivo обробка мишей-реципієнтів трепростинілом). Найбільш ефективним був режим ін'єкції попередньо оброблених гемопоетичних клітин-попередників з наступним уведенням вілдагліптину (10 мг/24 год. s.c.): усі миші (тобто, 10 з 10) вижили (крива, позначена як in vitro, попередньо оброблені клітини + in vivo обробка мишей-реципієнтів вілдагліптіном). Навпаки, миші, які одержували комбінацію трепростинілу (3 мкг/8 год.) і вілдагліптину (10 мг/кг/24 годин) мали гірший результат з поміж усіх мишей-реципієнтів, які одержували попередньо оброблені клітини: тільки 2 з десяти мишей вижили (сіра лінія, позначена як in vitro, попередньо оброблені клітини + in vivo обробка мишей-реципієнтів комбінацією трепростинілу й вілдагліптину). Ін'єкції лікарських препаратів (тобто, уведення трепростинілу й/або вілдагліптину шляхом підшкірних ін'єкцій) починали негайно після трансплантації гемопоетичних клітин-попередників і продовжували протягом 10-ти днів. Усі криві значно відрізнялися одна від одної (лог-ранговий критерій).

Комбіноване введення трепростинілу й вілдагліптину летально опроміненим мишам-реципієнтам BALB/c, яким вводили за допомогою ін'єкції гемопоетичні клітини-попередники, попередньо оброблені in vitro комбінацією трепростинілу й форсколіну, були менш ефективними щодо підвищення виживання даних мишей, у порівнянні з уведенням in vivo окремо або вілдагліптину, або трепростинілу. Дані наведено на Фігурі 5.

Приклад 6:

Ми досліджували умови, за яких дія трепростинілу й форсколіну було додатково підвищена. Ці умови були засновані на спостереженні того, що дія комбінації трепростинілу й форсколіну була опосередкована, щонайменше, частково за рахунок індукції CXCR 4-рецептора (тобто, рецептора для хемокіну, стромального фактора-1=SDF1=CXCL12). Крім того, ми порівняли ефект диметил-PGE2 і трепростинілу на накопичення cAMP людськими HSPCs.

Матеріали й методи

Виділення гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників мишей і людини.

Десять мишей (C57BL/6 або Balb/C) забивали шляхом зміщення шийних хребців. Довгі кістки задніх кінцівок (тобто, стегнову кістку й велику гомілкову кістку) вивільняли від м'язів і сполучної тканини й промивали середовищем RPMI, застосовуючи шприц і 27½ G голку. Суспензію клітин вивільняли від видимої сполучної тканини, збирали й переносили в центрифужні пробірки. Клітини збирали центрифугуванням (1,200 rpm/~100 g протягом 5 хв.) і ресуспендували в 3 мл буферу для лізису еритроцитів (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH доводили до 7,2-

7,4). Суспензію клітин інкубували протягом 2-х хв. при 20 °C з наступним охолодженням протягом 4-х хв. на кризі. Після цього, RPMI (10 мл) додавали й клітини збирали центрифугуванням і підраховували. Типовий вихід клітин дорівнював 3×10^7 /мишу.

Клітини ресуспендували в крижаному PBS (фосфатний буферний сольовий розчин), який містить 2 % FCS (фетальної телячої сироватки) за щільності клітин, яка дорівнювала $2,5 \times 10^8$ клітини/мл, до яких додавали коктейль біотинільованих антитіл ("Lineage Cell Depletion Kit" від компанії "Miltenyi Biotec"), який містить специфічні до ліній диференціювання антитіла, спрямовані проти CD5, CD45R (B220), CD11b, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4 і Ter-119 у співвідношенні 0,1 мл розчину антитіл на 10^8 клітин. Клітини інкубували протягом 20 хв. на кризі з антитілами й осаджували центрифугуванням. Після ресуспендування ($3,3 \times 10^8$ клітин/мл), другі покриті антибіотином мікробусини MicroBeads (0,2 мл/ 10^8 клітин, які постачаються в наборі ("Lineage Cell Depletion Kit" від компанії "Miltenyi Biotec"), додавали до суспензії клітин, і суміш інкубували протягом 15-ти хв. на кризі. Після цього, зразок розбавляли в MACS-буфері (30 мл), клітини збирали центрифугуванням і ресуспендували в 6 мл MACS-буфери. Дану суспензію наносили на попередньо упаковані колонки LS, які містили феромагнітні бусини, покриті сумісним із клітинами пластиком матеріалом. Як правило, застосовували три колонки (2 мл клітинної суспензії/колонку). Елюат містив клітини, негативні за маркерами лінії диференціювання (Lin⁻ клітини), у той же час клітини з комітованою лінією диференціювання, залишалися на колонці. Клітини осаджували центрифугуванням і ресуспендували в 2 мл PBS. Типовий вихід дорівнював 7×10^5 lin⁻ клітин/мишу.

Людські гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники (HSPCs) збирали з пуповини здорових донорів: зразки пуповинної крові (≈ 50 мл) збирали під час здорових доношених пологів. CD34⁺ клітини ізолювали, застосовуючи магнітно-активований сортувальник клітин (MACS) із прямого CD34 набору для виділення клітин-попередників (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit) ("Miltenyi Biotec") і розмножували, як описано (3). Коротко, пуповинну кров розбавляли таким же об'ємом фосфатного буферного сольового розчину (PBS); дану суспензію (25 мл) наносили на LymphoPrep™ (щільність середовища одержують за допомогою Nycomed, який містить суміш триацетату натрію й полісахаридів). Пробірки центрифугували в бакет-роторі протягом 30 хв. при 355 g. Шар, який містив мононуклеарні клітини, збирали, розбавляли в PBS (до 50 мл) і центрифугували при 400 g протягом 8 хв. для видалення залишкового LymphoPrep™. Еритроцити видаляли шляхом лізису в буфері, який містить 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ і 0,1 mM EDTA (pH доводили до 7,2-7,4 за допомогою HCl) протягом 10 хв. при 4 °C. Число мононуклеарних клітин визначали й доводили до 2×10^8 клітини/мл в MACS-буфері, який був оснащений набором для виділення. Додавали коктейль для позитивної селекції EasySep® (0,1 мл/мл суспензії клітин), суспензію інкубували протягом 15 хв. за кімнатної температури й додавали магнітні наночасточки EasySep® (50 мкл/мл). Після додаткової інкубації протягом 10 хв. за кімнатної температури, суспензію клітин розбавляли до 2,5 мл додаванням середовища. Пробірку поміщали в магніт на 5 хв. і потім збирали клітини. Цю стадію повторювали 5 разів. Збагачені клітини розмножували протягом 6-ти днів (тобто, два подвоєння популяції) у суспензійних культурах, що містили вільне від сироватки середовище X-VIVO15 ("BioWhittaker"), доповнену GlutaMAX (2,5 mM; "Gibco/Invitrogen") і пеніциліном/стрептоміцином (P/S; 125 Од./мл кожного) і Flt3L, SCF і TPO (кожний у концентрації 50 нг/мл). Типові виходи дорівнювали 9×10^5 CD34⁺ клітин/зразок пуповинної крові, які були розморожено з одержанням $3,5 \times 10^6$ клітин. Усі процедури проводили відповідно до керівних принципів інституціональної наглядової ради Медичного університету Відня для даних досліджень. Інформовану згоду забезпечували відповідно до Декларації Гельсінських принципів.

Проточна цитометрія

Чистоту препаратів мишачих і людських гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників (HSPC) оцінювали за допомогою проточної цитометрії. Антитіла, застосовані для фарбування маркерів клітинної поверхні, були отримані з наступних джерел: панелі антитіл мишачих ліній диференціювання були від "Becton Dickinson Biosciences" (BD 559971, що містить у біотинільованій формі анти-CD3ε, анти-CD11b, анти-CD45R, анти-Ly-6G/Ly-6c, анти-Ter-119), афінно-очищені щурячі анти-мишачі антитіла до CD16/CD32 (мишачі Fcγ_{II/III} блоковані, BD 553142) і флуоресцентний барвник стрептавідин-алоцикоцианін-Cy7 (стрептавідин APC-Cy7, BD554063) були також від "Becton Dickinson Biosciences". Фікоеритрин (PE)-Cy7-мічені анти-мишачі антитіла до Ly6A/E (=антиген-1 стовбурових клітин = Sca1) PE-Cy7 (номер за каталогом 25-5981-82) і PE-Cy5 анти-мишачі антитіла до CD117 (c-Kit) (номер за каталогом 15-1171-81) були від "eBiosciences".

Безпосередньо після MACS, 1×10^6 клітин позитивних (Lin⁺) і негативних (Lin⁻) ліній диференціювання переносили в пробірки FACS (сортувальник клітин з активованою

флуоресценцією) і зберігали на кризі в 50 мкл PBS. У цей час наступні антитіла, придатні для FACS, розбавляли (1:50) і змішували в PBS: очищених анти-CD16/CD32 (для блокування Fc-рецепторів), біотинільовані анти-CD3ε, біотинільовані анти-CD11b, біотинільовані анти-CD45R, біотинільовані анти-Ly-6G/Ly-6C і біотинільовані анти-Ter-119, стрептавідин-мічені APC-Cy7, PE-Cy 7-мічені анти-Sca-1, PE-Cy 5-мічені анти-c-Kit. Даний майстер-мікс (50 мкл) додавали до кожного зразка, які потім перемішували за допомогою м'якого струшування на вортексі й інкубували при 4 °C у темряві протягом 15 хв. Після цього, клітини збирали центрифугуванням, промивали в 2 мл PBS і ресуспендували в PBS. Зразки аналізували в FACS Canto II ("Becton Dickinson"). Процедуру стробування виконували в такий спосіб: канали для живих клітин установлювали шляхом запису прямого й бічного розкиду. Живі клітини додатково розрізняли виходячи з експресії маркерів лінії диференціювання (тобто, CD11b, CD45R, Ly-6G/Ly-6C, Ter-119). Це дозволило визначити канали для Lin⁻ клітин, які були додатково проаналізовані на експресію Sca-1 і c-Kit.

Проточну цитометрію також застосовували для спостереження за експресією CXCR4 і CD26/DPPIV (дипептидилпептидази-IV) людськими HSPCs. Експресію CXCR4 і CD26/DPPIV вимірювали після обробки 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном протягом 2 год., 4 год. і 6 год. Після інкубації, людські CD34⁺ клітини промивали й фарбували антитілами ("eBioscience") до CXCR4 і CD26 відповідно до інструкцій виробника й кількісно оцінювали за допомогою аналізу FACS. Три незалежні експерименти виконували окремо, і потім визначали середнє даних для статистичного аналізу. Дані представлені як середнє ± SEM, і порівняння проводили із застосуванням однофакторного аналізу ANOVA.

Аналіз [³H] накопичення cAMP

Людські гемопоетичні CD34⁺ стовбурові клітини й клітини-попередники (HSPCs, 4×10⁵/мл) спочатку преінкубували протягом 16 год. за відсутності й у присутності 100 нг/мл коклюшного токсину ("Sigma-Aldrich") у середовищі X-VIVO15, доповненому факторами росту з наступним метаболічним міченням аденін-нуклеотидного пулу протягом додаткового 4-годинного інкубаційного періоду в [³H]аденіні ("Perkin Elmer", 1 мкКі/мл) у середовищі X-VIVO15, доповненому факторами росту й 10 мкг/мл аденозиндезамінази ("Roche"). Після цього, клітини обробляли 1 або 10 мкМ трепростинілом, 1 або 10 мкМ диметил-PGE2 (dmPGE2), форсколіном (30 мкМ) або комбінацією форсколіну й простагландинів протягом 30 хв. Клітини потім осаджували (5 хв. при 100 g), середовище відкидали й осад лізували в крижаній 2,5 % перхлорній кислоті (0,9 мл), яка містила 0,1 мм cAMP, тримали на кризі протягом 1-ї години й нейтралізували 4,2 М КОН (0,1 мл). ATP і cAMP розділяли за допомогою послідовної хроматографії на колонках, які містили Dowex AG50-X8 і нейтральний оксид алюмінію (3).

Життєздатність клітин, розподіл за клітинним циклом й утворення колоній

Людські або мишачі HSPCs інкубували в присутності носія або комбінації 10 мкМ трепростинілу й 30 мкМ форсколіну при 37 °C протягом 1-ї години й 24-х годин. Після промивання PBS при 4 °C, клітини фарбували на зовнішній фосфатиділсерин за допомогою набору "PE Annexin-V Apoptosis Detection Kit I®" відповідно до протоколу виробника або на вміст ДНК за допомогою PI (50 мкг·мл⁻¹ в PBS) протягом 40 хв. при 37 °C. Дані, отримані за допомогою проточної цитометрії, аналізували за допомогою програмного забезпечення FACS Diva software®. Утворення колоній мишачих HSPCs визначали в такий спосіб: після інкубації протягом 1-ї години в присутності 10 мкМ трепростинілу й 30 мкМ форсколіну, клітини ресуспендували в середовищі MethoCult®, яке містить GM-CSF і IL-3 (10 нг·мл⁻¹ кожного) для утворення CFU-GM і 3 Од. мл⁻¹ EPO і IL-3 для CFU-E, і культивували при 37 °C і 5 % CO₂ протягом 7-10 днів. Число колоній підраховували під світловим мікроскопом.

Аналіз міграції

Мишачі гемопоетичні стовбурові клітини й клітини-попередники (HSPCs) негативної лінії диференціювання з кісткового мозку мишей-донорів BALB/c і людські CD34⁺HSPCs, ізольовані з пуповинної крові, стимулювали комбінацією 10 мкМ трепростинілу й 30 мкМ форсколіну протягом 1 години або в середовищі для мишачих стовбурових клітин (SFEM™; 50 нг·мл⁻¹ кожного фактора росту; SCF, Flt3, IL11 і 150 нг мл⁻¹ IL3) або в середовищі для людських стовбурових клітин (X-VIVO™ 15, 50 нг·мл⁻¹ кожного з TPO, FL3 і SCF). Після промивання, суспензію клітин (2×10⁶ клітин в 0,1 мл) поміщали у верхню камеру Transwell™ (діаметр – 6,5 мм, розмір пор – 3 мкм). Нижню камеру заповнювали 300 мкл середовища, що містила фактори росту й 100 нг·мл⁻¹ SDF-1. Там, де вказано, як верхня, так і нижня камери були доповнені 30 нМ вілдалгіптіном. Хемотаксис до SDF-1 визначали після 4 год. інкубації при 37 °C. HSPCs, які мігрували в нижню камеру, підраховували в лічильнику клітин. Аналізи виконували у трьох повторностях.

Аналіз хоумінга

HSPCs негативної лінії диференціювання ізолювали із цілих клітин кісткового мозку мишей-донорів B6.SJL-PtcrAPep3B/Boyl (CD45.1+), застосовуючи мікробусини MACS (дивися вище). Клітини *in vitro* обробляли 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном або контрольним розчинником протягом 1-ї години при 37 °C. Після промивання, 0,2×10⁶ клітин CD 45.1+ негативної лінії диференціювання вводили за допомогою ін'єкції летально опроміненим (10 Gy) мишам-реципієнтам C57Bl/6 (CD45.2+). Миші-реципієнти також були підшкірно оброблені *in vivo* або трепростинілом (0,15 мг кг 8 год.⁻¹), вілдагліптином (10 мг·кг⁻¹) або комбінацією обох лікарських препаратів. Контрольним мишам вводили за допомогою ін'єкції такий же об'єм носія. Цілі клітини кісткового мозку ізолювали з мишей-реципієнтів через 16 год. після трансплантації. Після лізису еритроцитів, клітини фарбували на маркери CD45.1. і CD45.2. Пропорцію клітин CD45.1+ і CD45.2+ у кістковому мозку визначали за допомогою проточної цитометрії.

Трансплантація кісткового мозку:

Ізогенних мишей-реципієнтів (C57BL/6 або BALB/c) піддавали летальному опроміненню. Якщо їх не лікували за допомогою внутрішньовенного введення гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників (HSPCs), то такі миші вмирали протягом перших двох тижнів. HSPCs клітини Lin⁻ (Sca1⁺ і c-Kit⁺) одержували, як зазначено вище, і попередньо обробляли *ex vivo* за відсутності й у присутності комбінації 10 мкМ трепростинілу + 30 мкМ форсколіну (FSK) протягом 1 год. при 37 °C. Після цього, клітини (1-5×10⁵/мишу) вводили за допомогою ін'єкції через хвостову вену. Кількість лейкоцитів визначали за допомогою FACS, зразки крові відбирали кожні 3-5 днів, починаючи від дня 9 (де кількість клітин крові дорівнювала ~1 г/л. У деяких випадках, мишей (25-30 г) також обробляли (i) трепростинілом (0,15 мг кг 8 год.⁻¹) і вілдагліптином (10 мг кг⁻¹ 12 год.⁻¹) або комбінацією обох препаратів, що вводяться підшкірно кожні 8 год. протягом 10-ти днів.

Виділення РНК із гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників і полімеразна ланцюгова реакція:

РНК ізолювали з мишачих і людських гемопоетичних стовбурових клітин і клітин-попередників (3×10⁶ клітин), зі змішаної (тобто нейрональної і гліальної) культур, отриманих з кори головного мозку мишей, із клітинної лінії раку передміхурової залози людини PC3 і клітинної лінії карциноми товстої кишки людини HCT116 (як позитивний контроль), застосовуючи 2 мл Trizol® ("Invitrogen"). Гомогенізовані зразки інкубували протягом 5 хв. за кімнатної температури для повної дисоціації нуклеопротеїнових комплексів. Хлороформ (0,4 мл) додавали до лізату клітин і пробірку енергійно струшували вручну протягом 15 секунд. Після інкубації протягом 3-х хв. за кімнатної температури, зразок центрифугували при 12000 g протягом 15 хв. при 4 °C. Після центрифугування, суміш розділяється на нижню червону, фенол-хлороформну фазу, інтерфазу й безбарвну верхню водну фазу. Водну фазу (РНК) переносили у свіжу пробірку, і РНК осаджували шляхом змішування з 1 мл ізопропіловим спиртом. Після інкубації за кімнатної температури протягом 10 хв., зразок центрифугували при 12000 g протягом 10 хв. при 4 °C. Супернатант видаляли й гель-подібний осад РНК промивали один раз 2 мл 75 % етанолу. Зразок перемішували на вортексі й центрифугували при 7500 g протягом 5 хв. при 4 °C. Осад РНК висушували на повітрі протягом 10 хв. і розчиняли в 80 мкл (високоочищеної) води, пропускаючи розчин кілька разів крізь наконечник піпетки, та інкубували протягом 10 хв. при 55 °C (зберігали при -20 °C).

РНК (1 мкг) піддавали зворотній транскрипції до кДНК за допомогою набору "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" ("Fermentas") у присутності 1 мкл оліго (dT)18 праймера, 4 мкл 5x реакційного буфера, 1 мкл інгібітору РНКаз "RiboLock™" (20 Од./мкл), 2 мкл 10 mM dNTP Mix, 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid™ H Minus M-MuLV (200 Од./мкл) і очищеної води до загального об'єму, який становить 12 мкл, протягом 60 хв. при 42 °C з наступною інкубацією протягом 5 хв. при 70 °C.

Ампліфікацію фрагментів рецепторів людських простагландинів і CXCR4 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виконували з 1 мкл кДНК, 1 мкл 10 mM dNTPs, 1 мкл прямого праймера [10 мкМ], 1 мкл зворотного праймера [10 мкМ], 4 мкл буфера GoTaq® Buffer [5x], 0,2 мкл полімерази GoTaq® і очищеної води до кінцевого об'єму, який становить 20 мкл (11,8 мкл). Суміш спочатку інкубували при 95 °C протягом 5 хв. із наступними 40 циклами (45 с денатурації при 95 °C, 30 с відпалювання при 57 °C, 45 с видовження при 72 °C) і кінцевим видовженням протягом 5 хв. при 72 °C. ПЛР-продукти розділяли на 2 %-них агарозних гелях.

Таблиця 1

Застосовані праймери (прямі й зворотні):

hep1 f	GAGAGCCAGGGCGCAGT (SEQ ID NO 1)	mep4 f	TCTCTGGTGGTGCTCATCTG (SEQ ID NO 15)
hep1 r	GCAAGGGCTCATGTCAGG (SEQ ID NO 2)	mep4 r	TGCAAATCTGGGTTTCTGCT (SEQ ID NO 16)
mep1 f	AGCAGGAGCCAAGTTCCAG (SEQ ID NO 3)	hcxcr4 f	AGGAAGCTGTTGGCTGAAAA (SEQ ID NO 17)
mep1 r	CATCCGCTAGGCTCAGGTTA (SEQ ID NO 4)	hcxcr4 r	CTCACTGACGTTGGCAAAGA (SEQ ID NO 18)
hep2 f	CCACCTCATTCTCCTGGCTA (SEQ ID NO 5)	mcxcr4 f	AGGTGCAGGTAGCAGTGACC (SEQ ID NO 19)
hep2 r	TTTCCTTTTCGGGAAGAGGTT (SEQ ID NO 6)	mcxcr4 r	ACTCACACTGATCGGTTCCA (SEQ ID NO 20)
mep2 f	TTATGACCATCACCTTCGCC (SEQ ID NO 7)	mpi f	GGGCACGAGAGGATGAAGT (SEQ ID NO 21)
mep2 r	TAAAAACCGAAGAGCTCGGA (SEQ ID NO 8)	mpi r	GATGGCCTGAGTGAAGCCT (SEQ ID NO 22)
hep3 f	AGCGACCATTGGAAAGATG (SEQ ID NO 9)	hpi f	GTGTGCTCCCTGCCTCTC (SEQ ID NO 23)
hep3 r	TGATGTGATCCTGGCAGAAA (SEQ ID NO 10)	hpi r	GGGGTTGAAGGCGTAGAAG (SEQ ID NO 24)
mep3 f	TGGATCCCTGGGTTTATCTG (SEQ ID NO 11)	m PGRD f	AAGGCTCCATAGTACGCACG (SEQ ID NO 25)
mep3 r	GGGAAACAGGTACTGCAATGA (SEQ ID NO 12)	m PGRD r	CTCAGACTACAGGCACGGGT (SEQ ID NO 26)
hep4 f	TTACTCATTGCCACCTCCCT (SEQ ID NO 13)	h PGRD f	CGGAGGTCTTCTGCTTCTTC (SEQ ID NO 27)
hep4 r	CGCTCCAAACTTGGCTGATA (SEQ ID NO 14)	h PGRD r	CACTATGTGTTCTCTGCCCG (SEQ ID NO 28)

Результати

Трепростиніл- і dmPGE2-індуковане накопичення циклічного AMP людськими гемоетичними стовбуровими клітинами й клітинами-попередниками

Після метаболічного мічення $[^3\text{H}]$ аденіном, людські HSPCs стимулювали трепростинілом (Треп, 10 мкМ), dmPGE2 (10 мкМ) або форсколіном (Fsk, 30 мкМ), комбінацією трепростинілу (10 мкМ) або dmPGE2 (10 мкМ) з форсколіном (30 мкМ) як зазначено в розділі Матеріали й методи. Де зазначені, HSPCs були попередньо оброблені коклюшним токсином (PTX) протягом 16-ти год. перед стимуляцією. Дані є результатами трьох незалежних експериментів, виконаних в трьох повторностях, планки похибки указують s.e.m. У присутності 30 мкМ форсколіну, 10 мкМ трепростиніл був більш ефективним, ніж 10 мкМ dmPGE2 ($P=0,03$; критерій Уїлкоксона). Ця різниця нівелювалась шляхом попередньої обробки коклюшним токсином (ns, незначущий). Дані наведені на Фігурі 7.

Пул аденінових нуклеотидів у людських CD34+ гемопоетичних стовбурових клітинах і клітинах-попередниках (HSPCs) був метаболічно позначений $[^3\text{H}]$ аденіном, і їхню відповідь на трепростиніл і на диметил-PGE2 (dmPGE2) досліджували в присутності й за відсутності 30 мкМ форсколіну. Як видно з Фіг. 7, трепростиніл був значно більш ефективним, ніж dmPGE2, незалежно від того, чи стимулювали клітини за відсутності або в присутності форсколіну. Цей дитерпен зв'язується в розщепленні псевдосубстрата між каталітичними доменами C1 і C2 аденілілциклази й робить різні ізоформи ферменту більш чутливими до стимулюючого G-білку G α s (5-7). Знижену ефективність dmPGE2 можна раціоналізувати, беручи до уваги те, що dmPGE2 також є повним агоністом на Gi-з'єднаному рецепторі EP3 (8,9) і, отже, викликає як Gs-залежну стимуляцію аденілілциклази через рецептори EP2 і EP4, так і супроводжуюче інгібування через Gi-з'єднані EP3-рецептори. Коклюшний токсин скасовує взаємодію Gi-з'єднаних рецепторів з Gi (і спорідненими G-білками, такими як Go і Gt) шляхом ADP-рибозилування залишку цистеїну чотирьох амінокислот, вилучених з C-кінця G α i-субодиниці. Відповідно, HSPCs преінкубували протягом 16 год. у присутності коклюшного токсину. Дана

попередня обробка підсилювала відповідь на dmPGE2 (порівняй 6^{ий} і 9^{ий} стовпчик на Фіг. 7), так що не було істотної різниці між відповіддю cAMP, викликану трепростинілом + форсколіном, і відповіддю cAMP, викликану dmPGE2 + форсколін (порівняй 8^{ий} і 9^{ий} стовпчик на Фіг. 7). Це підтверджує, що існує основна відмінність у дії dmPGE2 і трепростинілу на людських HSPCs:

5 dmPGE2 залучає Gi-з'єднаний рецептор, а трепростиніл – ні.

Попередня обробка HSPCs трепростинілом і форсколіном не змінює життєздатність клітин, прогресію клітинного циклу або здатність клітин до диференціації.

Постійне підвищення cAMP може викликати апоптоз у гемопоетичних клітинах (10). Підвищене приживання dmPGE2-оброблених HSC пов'язане із впливом на виживання, проліферацію й хоумінг клітин (11). Трепростиніл і dmPGE2 відрізняються за своєю здатністю залучати до участі G-білки: dmPE2-індукований рекрутинг Gi може мати особливе значення, оскільки передача сигналів через Gi може привести до активації ліпідкінази PI3-кінази й розташованої далі на шляху передачі сигналу кінази AKT, яка стимулює проліферацію й виживання клітин (12,13). Таким чином, ми досліджували, чи забезпечує *in vitro* обробка

15 людських HSPCs комбінацією 30 мкМ форсколіну й 10 мкМ.

Попередня обробка мишачих і людських HSPCs трепростинілом і форсколіном не індукує апоптоз і не змінює прогресію клітинного циклу або здатність до диференціації. Людські HSPCs інкубували з 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном протягом 1-ї години. Надалі, (A, B) індукцію апоптозу й (C, D) прогресію клітинного циклу оцінювали за допомогою проточного цитометричного аналізу. Наведені типові оригінальні зображення (A, C, ліва панель), і дані, отримані в трьох незалежних експериментах, були підсумовані (B, D, права панель). Ніякої різниці в апоптичних клітинах або в розподілі клітин відповідно до фаз G0/1, S і G2 не було виявлено між необробленими й обробленими клітинами (однофакторний ANOVA). (E, F). Мишачі HSPCs ізолювали з кісткового мозку, попередньо обробляли й ресуспендували в метилцелюлозному середовищі, яке містило фактори росту, необхідні для підтримування диференціації й росту колонієутворюючих одиниць грануло-моноцитарної (CFU-GM) і еритроцитарної лінії диференціювання (BFU-E). Після 10 днів число колоній підраховували під світловим мікроскопом і спостерігали за формою й морфологією колоній. Показані репрезентативні мікрофотографії й кількісна оцінка за трьома незалежними експериментами.

30 Дані є \pm SEM (n=3).

(Дані наведені на Фіг. 8)

Трепростиніл робить клітини більш сприйнятливими до апоптозу (Фіг. 8, A і B) або перешкоджає їхньому вступу в клітинний цикл і прогресуванню через клітинний цикл (Фігура 8, C і D) або змінює здатність мишачих HSPCs давати початок специфічним лініям диференціювання (Фігура 8, E і F). Як проілюстровано вихідними гістограммами (Фіг. 8A) і підсумовано на Фігурі 8B, наявність життєздатних, ранніх апоптичних і мертвих клітин була співрозмірною, і число аннексин-в-позитивних клітин не збільшувалося при *in vitro* обробці 30 мкМ форсколіном і 10 мкМ трепростинілом. Аналогічно, розподіл у клітинному циклі асинхронного зростаючих необроблених людських HSPCs і HSPCs, які підтримувались у присутності трепростинілу й форсколіну, був співрозмірним, незалежно від того, експонували HSPCs протягом 1-ї години або 24 годин (порівняй Фіг. 8C для типових оригінальних гістограмм і Фіг. 8D для усереднених даних). Важливо відзначити, що нам також не вдалося виявити будь-якого впливу трепростинілу й форсколіну на формування мієлоїдних і еритроїдних колоній: мишачі HSPCs ізолювали з кісткового мозку, інкубували протягом 1-ї години в присутності трепростинілу й форсколіну й ресуспендували в метилцелюлозі, яка містила середовище з факторами росту, необхідними для підтримування диференціації й росту колонієутворюючих одиниць CFU-GM і BFU-E. Після 10 днів, морфологія (Фіг. 8E) і число колоній були порівнянні (Фіг. 8F).

Трепростиніл стимулює міграцію людських і мишачих HSPCs у напрямку до SDF-1/CXCL-12

Як уже згадувалося вище, більш інтенсивне приживання dmPGE2-оброблених HSC було пов'язане із впливом на виживання, проліферацію й хоумінг клітин (10). У наших експериментальних умовах, *in vitro* обробка мишачих і людських HSPCs трепростинілом і форсколіном підвищувала відновлення кісткового мозку (дивися нижче й Фіг. 13), але не змінювала життєздатності клітин або прогресію клітинного циклу *in vitro* (порівняй з Фігурою 8).

SDF-1/CXCR4 вісь відіграє важливу роль у хоумінгу HSCPs у нішу кісткового мозку. Таким чином, ми припустили, що корисна дія трепростинілу виникає в результаті підвищеного приживання HSPCs через SDF-1/CXCR 4-опосередковані ефекти.

Наступні дані наведені на Фігурі 9: *In vitro* попередня обробка трепростинілом і форсколіном підсилює експресію CXCR4 (A & B) і CD26/DPPIV (B). (A) РНК ізолювали з людських HSPCs, які інкубували за відсутності (необроблені) або в присутності комбінації 10 мкМ трепростинілу й 30 мкМ форсколіну (Треп+Fsk) протягом 1-ї години. РНК, отримана із клітинної лінії людських PC3,

відігравала роль позитивного контролю. Після зворотної транскрипції, здійснювали PCR-залежну ампліфікацію, із застосуванням праймерів, наведених в таблиці 1. Амплікони для CXCR4 електрофоретично розділяли на агарозному гелі й візуалізували фарбуванням етидіумбромідом. мРНК, яка кодує β -актин, ампліфікували як внутрішній контроль. Дані є типовими даними двох додаткових експериментів з аналогічними результатами. (В, С) людські CD34+ клітини (В) і mHSPCs інкубували або з 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном, або з контрольними носіями (необробленими) протягом 2 год., 4 год. і 6 год. Надалі, зразки аналізували на наявність експресії CXCR4 (В) і CD26 (Fic) за допомогою FACS. Наведені дані є відсотком позитивних клітин в ≥ 3 незалежних експериментах (середнє \pm SEM; * $P < 0,05$ проти необробленого контролю, ANOVA)

Це припущення досліджували в такий спосіб: (i) попередня стимуляція людських HSPCs трепростинілом і форсколіном підвищувала рівні мРНК CXCR4 (Фіг. 9А). Це також переводилося в підвищену експресію білка CXCR4 (Фіг. 9В). Цікаво, що це також супроводжувалося підвищенням активності CD26/DPPIV (дипептидилпептидази-IV), ферменту, який руйнує ліганд CXCR4SDF-1/CXCL12 (показано для мишачих HSPCs на Фіг. 9С). (ii) Активація CXCR4 призводить до підвищеної міграції людських (Фіг. 10А) і мишачих HSPCs у напрямку до SDF-1 (Фіг. 10В), відповідно. (iii) Ця спрямована міграція була специфічною, тому що вона блокувалася селективним CXCR 4-антагоністом плериксафор/AMD3100 (Фіг. 10С). Аналогічно, базальна міграція (тобто, випадкова міграція за відсутності SDF-1) не підвищувалася шляхом попередньої обробки HSPCs трепростинілом і форсколіном (порівняй перший і третій стовпчик на Фіг. 10 А і В).

Фігура 10 демонструє наступні дані: In vitro попередня обробка трепростинілом і форсколіном підсилює дію SDF-1 через CXCR4. Свіжеізольовані мишачі й людські HPSCs попередньо оброблені in vitro або носієм (незафарбовані стовпчики), або 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном (Треп+Fsk, зафарбовані стовпчики) протягом 1 год. при 37 °C з наступними стадіями промивання. Суспензію (2×10^5 клітин в 0,1 мл середовища, яке містить фактори росту) людських (А) або мишачих HSPCs (В, С) додавали у верхню камеру Transwell™ і дозволяли мігрувати в напрямку до SDF-1 (100 нг/мл у нижній камері) протягом 4 год. Клітини, які мігрували через 5-мкм фільтр, підраховували. HSPCs також інкубували за відсутності й у присутності 10 мкМ AMD3100 (С). Дані є середнім \pm SEM їх трьох незалежних експериментів, виконаних у трьох повторностях. Статистичне порівняння здійснювали за допомогою ANOVA, з наступним порівнянням за допомогою множинних порівнянь Т'юкі. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Блокування CXCR4 послабляє позитивний ефект трепростинілу на трансплантацію кісткового мозку

Антагонізм AMD3100 відтворювали in vivo: кістковий мозок летально опромінених мишей-реципієнтів відновлювали за допомогою попередньо оброблених трепростинілом і форсколіном мишачих HSPCs, і мишам надалі вводили підшкірно оптимальну дозу трепростинілу протягом 10-ти днів. Супутнє введення AMD3100 ($3,3 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 год.}^{-1}$) притупляло корисну дію трепростинілу, так що всі миші-реципієнти, зрештою, вмирали від недостатності кісткового мозку (Фігура 11). Таким чином, разом узяті, спостереження вказують на механічний зв'язок між трепростинілом-індукованим накопиченням cAMP, підвищеною експресією CXCR4 і посиленою передачею сигналів CXCR4 у трепростинілом-оброблених HSPCs. Крім того, вони також документують той факт, що дія трепростинілу залежить від CXCR4: якщо передача сигналів за допомогою CXCR4 блокована, то кістковий мозок не приживається, і всі тварини гинуть.

Інгібування CD26/DPPIV вілдагліптіном підсилює хоумінг і відновлення кісткового мозку під дією HPSCs тільки при послідовному, але не при супутньому введенні трепростинілу

Відомо, що деякі хемокіни руйнуються під дією CD26/DPPIV (дипептидилпептидази-IV). Це також справедливо для SDF-1/CXCL12. Враховуючи дані про те, що дія трепростинілу опосередковує – щонайменше, частково – індукцією CXCR4 і залежить від CXCR4. Відповідно, посилена дія SDF-1/CXCL12, як очікується, буде корисною. У цьому контексті варто врахувати, що обробка трепростинілом і форсколіном також індукувала експресію CD26, який істотно не виявляється в нестимульованих HSPCs, але був виявлений в більш ніж 10 % HSPCs, стимульованих трепростинілом і форсколіном (Фіг. 9С). Деякі інгібітори DPP-IV доступні, їх фармакологія в людини є добре зрозумілою, їх вводили мільйонам пацієнтів протягом багатьох років при лікуванні діабету типу II. Фактично, переважна більшість пацієнтів переносить інгібітори DPP-IV без небезпечних побічних ефектів.

Враховуючи, що інгібітори DPP-IV можуть бути придатним партнером в комбінації із трепростинілом, ми досліджували, чи підсилює інгібітор DPP-IV вілдагліптин дію трепростинілу. Це вперше було випробувано в підході, у якому вимірювали здатність уведених шляхом ін'єкції

HSPCs до хоумінгу в кістковому мозку: HSPCs, отримані з кісткового мозку мишей-донорів CD 45.1⁺, вводили за допомогою ін'єкції ізогенним CD45.2 реципієнтам. Тварин забивали через 16 год. і кількість CD45.1⁺ клітин, видалених з їхнього кісткового мозку, визначали кількісно за допомогою FACS.

5 Дані експерименти показали, що

(i) тільки попередня обробка HSPCs комбінацією трепростинілу+форсколін *in vitro* не достатня для одержання статистично значимого підвищення хоумінгу (порівняй третій стовпчик і перший стовпчик на Фіг. 12).

10 Фіг. 12 показує, що *in vivo* обробка мишей-реципієнтів вілдагліптіном і трепростинілом окремо, але не їх комбінацією, підсилює хоумінг HSPCs, які були преінкубовані із трепростинілом і форсколіном. Мишачі HSPCs, ізольовані з кісткового мозку CD 45.1⁺ мишей-донорів, попередньо обробляли або носієм ("необроблені клітини"), або трепростинілом і форсколіном ("оброблені клітини") і трансплантували (2×10^5 клітини на мишу) летально опроміненим мишам-реципієнтам C57Bl/6 (CD45.2⁺) шляхом ін'єкції у хвостову вену. Потім мишей-реципієнтів розділяли на 7 груп. Миші в групах 1 і 2 мали тільки необроблені контрольні клітини, крім того мишей у групі 2 обробляли *in vivo* вілдагліптіном (Vil, 10 мг кг⁻¹/день). Миші, виділені в групу 3, одержували тільки *in vitro* оброблені клітини, мишей у групі 4, крім того, піддавали *in vivo* обробці трепростинілом (Trep, 0,15 мг кг⁻¹ 8 год.⁻¹). Мишам, віднесеним до групи 5, проводили комбіновану *in vivo* обробку трепростинілом (0,15 мг кг⁻¹ 8 год.⁻¹) і AMD3100 (3,3 мг кг⁻¹ 8 год.⁻¹). Миші в групі 5 одержували *in vivo* як трепростинілу (0,15 мг кг⁻¹ 8 год.⁻¹), так і вілдагліптин (10 мг кг⁻¹/день), і, нарешті, миші в групі 6 одержували *in vivo* вілдагліптин. Здатність CD45.1⁺ клітин до хоумінгу в кістковий мозок оцінювали через 16 год., аналізуючи кістковий мозок реципієнтів за допомогою FACS. Дані представлені як середнє \pm SEM (n=3). Статистичні порівняння проводили за допомогою тесту ANOVA з наступним багаторазовим порівнянням Т'юкі. Комбінація *in vitro* попередня обробка + *in vivo* вілдагліптин (останній стовпчик, «+ *in vivo* (Vil)») статистично значимо відрізнялася від усіх інших обробок (**, p< 0,01). 4-ий стовпчик («+*in vivo* Trep») статистично значимо відрізнявся від перших трьох стовпчиків, 5-ого («+*in vivo* (Trep+AMD 3100)» і 6-ого стовпчика («+*in vivo* (Trep+Vil)») (*, p<0,05).

30 Попередні спостереження показали, що *in vitro* попередня обробка за допомогою dmPE2 підвищувала хоумінгу HSPCs (11). Таким чином, дані результати знову підкреслюють різницю між преінкубацією HSPCs в dmPGE2 (11) і в комбінації трепростинілу і форсколін.

(ii) попередня обробка HSPCs комбінацією трепростинілу+форсколін *in vitro* підсилювала їх хоумінг у кістковий мозок мишей-реципієнтів, за умови, що дані миші-реципієнти також були оброблені трепростинілом *in vivo* (порівняй четвертий стовпчик і третій стовпчик, Фіг. 12).

35 (iii) підвищений хоумінг, який виник у результаті послідовної *in vitro* попередньої обробки (трепростинілу+форсколін) з наступним *in vivo* введенням трепростинілу був нівельований, якщо мишам-реципієнтам вводили CXCR4 антагоніст AMD3100/плериксафор (порівняй четвертий стовпчик і п'ятий стовпчик, Фіг. 12). Це спостереження узгоджується з висновками, викладеними вище й на Фіг. 9, 10 і 11, на яких показано, що дія трепростинілу залежить від індукції CXCR4.

40 (iv) *in vivo* введення одного вілдагліптину мишам-реципієнтам, які одержували необроблені HSPCs, не підвищує хоумінгу (порівняй другий стовпчик і перший стовпчик, Фіг. 12).

(v) введення вілдагліптину *in vivo* мишам-реципієнтам, які одержували попередньо оброблені трепростинілом+форсколіном HSPCs, і яким надалі вводили трепростинілу *in vivo*, нівельувало ефект трепростинілу на хоумінг (порівняй четвертий стовпчик і шостий стовпчик, Фіг. 12).

45 (vi) найбільш виражене посилення хоумінгу спостерігали, якщо HSPCs попередньо обробляли *in vitro* комбінацією трепростинілу й форсколіну й мишам-реципієнтам вводили вілдагліптин; хоумінг після даного режиму перевищував усі інші, включаючи ін'єкцію попередньо оброблених трепростинілом+форсколіном HSPCs з наступним введенням трепростинілу *in vivo* (порівняй сьомий стовпчик і четвертий стовпчик, Фіг. 12) або з наступним введенням трепростинілу й вілдагліптину *in vivo* (порівняй сьомий стовпчик і шостий стовпчик, Фіг. 12).

Інгібування CD26/DPPIV вілдагліптіном підсилює відновлення кісткового мозку під дією трепростинілу+форсколін HSPCs тільки при послідовному введенні.

55 Летально опромінених BALB/c мишей лікували шляхом введення внутрішньовенної ін'єкції 2×10^5 Lin⁻, c-Kit⁺, Sca1⁺ HSPCs. За цих умов, число HSPCs обмежували так, що всі тварини, яким вводили за допомогою ін'єкції необроблені HSPCs, загинули (суцільна лінія на Фіг. 13). Навпаки, 60 % тварин виживали, якщо HSPCs були попередньо оброблені комбінацією трепростинілу й форсколіну *in vitro* і тваринам-реципієнтам вводили трепростинілу протягом 10-ти днів (трикутники/точкові пунктирні лінії на Фіг. 13). Вживання мишей-реципієнтів було збільшене до 60 100 %, якщо HSPCs попередньо обробляли комбінацією трепростинілу й форсколіну *in vitro* і

тваринам-реципієнтам вводили вілдагліптин протягом 10-ти днів (кружки/пунктирна лінії на Фіг. 13). Однак, комбіноване введення трепростинілу й вілдагліптину приводило до вираженого взаємного антагонізму: переважна більшість реципієнтів гинула, якщо їм вводили за допомогою ін'єкції HSPCs, попередньо оброблені комбінацією трепростинілу й форсколіну *in vitro*, і потім вводили трепростиніл і вілдагліптин (квадрати/точкові пунктирні лінії на Фіг. 13). Ці спостереження узгоджуються з результатами аналізу хоумінга, продемонстрованими на Фіг. 13; інакше кажучи, два незалежні підходи задокументували взаємний антагонізм трепростинілу й вілдагліптину при введенні одночасно *in vivo*, але синергізм при застосуванні в правильній послідовності у часі, тобто *in vitro* попередня обробка HSPCs трепростинілом + форсколіном з наступним *in vivo* уведенням вілдагліптину мишам-реципієнтам.

Блокада CXCR4 за допомогою антагоністів AMD3100/плериксафору послабляє сприятливі ефекти вілдагліптину на виживання мишей-реципієнтів, але AMD3100/плериксафор як такі також підсилюють виживання:

Робоча гіпотеза, покладена в основу цього проекту, стверджує, що введення вілдагліптину мишам-реципієнтам, що одержували HSPCs, попередньо оброблені комбінацією форсколіну+трепростинілу, через руйнування SDF-1/CXCL12, інгібується й, таким чином, передача сигналів через активований CXCR4 підвищується. Якщо це має місце, то дія вілдагліптину повинна бути ослаблена одночасним уведенням AMD3100/плериксафора. Експеримент виконували із сьомою групами мишей-реципієнтів BALB/c (5/група). Кілька таких груп служили внутрішніми контролюми, які були включені для перевірки того, що попередні результати відтворюються. Усе миші одержували HSPCs, які були попередньо оброблені комбінацією трепростинілу й форсколіну *in vitro* перед їх ін'єкцією через хвостову вену. Число HSPCs було обмеженим (2×10^5 /мишу в BALB/c), так щоб єдиної ін'єкції попередньо оброблених HSPCs було не досить для порятунку реципієнтів. Стан мишей-реципієнтів, яким вводили ін'єкції вілдагліптину, був кращим; їх виживання було вищим, ніж у групі, якій вводили трепростиніл (дані з Фіг. 11, дивися нижче). Крім того, тваринам, яким вводили комбінацію трепростинілу й вілдагліптину, ставало гірше; таким чином, ці спостереження відтворюють результати, показані на Фіг. 13. Виживання реципієнтів, які одержували комбінацію вілдагліптину й AMD3100/плериксафор, було нижчим, ніж у тварин, оброблених тільки вілдагліптином. Таким чином, дія вілдагліптину може, щонайменше, частково, бути пояснена посиленням передачі сигналів SDF-1/CXCL12 через CXCR4. Слід підкреслити, що всі умови тестування були паралельними, отже, порівняння є правомірним.

Висновки:

Основні результати можна резюмувати в такий спосіб:

(i) трепростиніл відрізняється від dmPGE2, оскільки трепростиніл активує G_s -з'єднані простаноїдні рецептори в (мишачих і людських) HSPCs, dmPGE2 також активує G_i -з'єднані EP3 рецептори, які також присутні на HSPCs. Відповідно, обробка *in vitro* трепростинілом (у комбінації з форсколіном) не підсилює ні проліферацію й виживання HSPCs *in vitro* (Фіг. 8), ні їх хоумінг у кістковий мозок *in vivo* (Фіг. 11). Це суперечить опублікованим даним для dmPGE2 (11). Хоумінг підвищується тільки в тому випадку, якщо тварин-реципієнтів безупинно обробляють трепростинілом *in vivo* (Фіг. 12).

(ii) Дія трепростинілу, щонайменше, частково, залежить від індукції CXCR4 (Фіг. 9) і приводить до посиленої передачі сигналів SDF-1/CXCL12 через CXCR4. Це було зафіксовано *in vitro*, шляхом демонстрації підвищеної міграції (хемотаксису) HSPCs, попередньо оброблених трепростинілом + форсколін, у напрямку до SDF1 (Фіг. 10A, B), шляхом блокування цього ефекту за допомогою антагоніст CXCR4 AMD3100/плериксафора (Фіг. 10C), і *in vivo* демонстрацією інгібування AMD3100/плериксафора для трепростиніл-індукованого підвищеного хоумінга (Фіг. 12) і приживання кісткового мозку/виживання мишей-реципієнтів (Фіг. 11).

(iii) Інгібування CD26/DPP-IV саме як таке не впливає на хоумінг HSPCs у кістковий мозок, але синергізується трепростинілом, за умови, що HSPCs спочатку піддають впливу трепростинілу й форсколіну *in vitro*, і потім вілдагліптину *in vivo* (Фіг. 12). Якщо ці дві сполуки вводять одночасно *in vivo*, має місце взаємний антагонізм. Цей синергізм і взаємний антагонізм був відтворений у незалежних експериментах, у яких тестували приживання HSPCs, а не їх хоумінг, тобто здатність HSPCs відновлювати кістковий мозок у летально опромінених мишах-реципієнтах і, таким чином, щоб підтримувати їхнє виживання (Фіг. 13).

Фігура 13 показує, що *in vivo* уведення одного інгібітору DPP-IV вілдагліптину підсилює позитивний ефект *in vitro* обробки HSPCs трепростинілом і форсколіном на коефіцієнт виживання в мишей-реципієнтів. Мишачі HSPCs, ізолювані з мишей-донорів BALB/c, обробляли *in vitro* 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном або носієм (суцільна лінія) протягом 1 години при 37 °C. Після промивання, 2×10^5 клітин вводили за допомогою ін'єкції летально

опроміненим (10 Gy) мишам-реципієнтам BALB/c. Група мишей, що одержувала оброблені носієм HSPCs, не одержувала будь-якої додаткової обробки *in vivo* і відігравала роль контролю на опромінення (суцільна лінія, $n=19$): усі вони загинули через недостатність кісткового мозку. Інша група мишей (точкові пунктирні лінії/трикутники; $n=20$) одержувала HSPCs, попередньо оброблені 10 мкМ трепростинілом і 30 мкМ форсколіном, а також вони були оброблені *in vivo* трепростинілом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 год.}^{-1}$). Наступна група мишей (точкові пунктирні лінії/квадрати; $n=20$) знову одержувала *in vitro* HSPCs, попередньо оброблені форсколіном + трепростинілом, і була додатково оброблена *in vivo* і трепростинілом ($0,15 \text{ мг кг}^{-1} \text{ 8 год.}^{-1}$), і вілдагліптіном (10 мг/кг/24 год.). Нарешті, група мишей (пунктирні лінії/кружечки; $n=20$) одержувала *in vitro* HSPCs, попередньо оброблені форсколіном + трепростинілом і була оброблена *in vivo* вілдагліптіном ($10 \text{ мг кг}^{-1} \text{ у день}$). *In vivo* обробку здійснювали шляхом підшкірних ін'єкцій, їх ініціювали безпосередньо після трансплантацією й продовжували протягом 10-ти днів. Криві виживання порівнювали за допомогою балка-рангового критерію; різниця між трьома умовами обробки була статистично значимою ($p<0,01$).

Це несподіване відкриття важко зрозуміти, але воно підкреслює важливість послідовності сигналів: трепростиніл-зумовлений G_s -залежний сигнал повинен передувати G_i/G_q -залежному сигналу, генерованому SDF-1/CXCL12 через CXCR4.

(iv) *In vivo* AMD3100/плериксафор протидіють позитивному ефекту як від уведення трепростинілу, так і вілдагліптину. Цей антагонізм повинен був бути передбаченим, оскільки трепростиніл індукує CXCR4, а вілдагліптин блокує фермент, який руйнує SDF-1/CXCL12. Таким чином, обидві маніпуляції приводять до посиленої передачі сигналів через CXCR4, яка блокується AMD3100/плериксафором. Це спостереження підкреслює важливість забезпечення правильних сигналів для трансплантованих HSPCs у послідовному порядку (дивися вище point (iii)). Крім того, ми відзначали раніше, що *in vivo* крива доза-відповідь для трепростинілу була дзвоноподібною, тобто більш високі дози менш ефективно сприяли приживленню кісткового мозку, ніж стандартна доза, застосована в даних експериментах. Це може бути пов'язане з наявністю рецепторів EP4 на клітинах, які вистилають внутрішньокісткову нішу, стимулювання яких може протидіяти діям простагландинів на приживання HSPCs (15). Аналогічно, можна припустити, що SDF1/CXCL12 також впливає на внутрішньокісткову нішу, яке може як сприяти, так і перешкоджати відновленню кісткового мозку залежно від контексту передачі сигналів.

Виходячи з цих даних, можна зробити висновок про те, що

(i) *in vitro* попередня обробка HSPCs комбінацією трепростинілу й форсколіну може бути скомбінована з *in vivo* уведенням або трепростинілу, або вілдагліптину для посилення відновлення кісткового мозку.

(ii) одночасне застосування комбінації обох сполук (тобто трепростинілу й вілдагліптину) призводить до взаємного антагонізму й, таким чином, має менше значення. Однак можна припустити, що послідовний режим, при якому вілдагліптин і трепростиніл уводять по черговому, може бути корисним.

Посилання

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

2. Whittle BJ, Silverstein AM, Mottola DM, Clapp LH (2012) Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, Treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostinil is a potent DP1 and EP2 agonist. *Biochem. Pharmacol.* 84:68-75.

3. Taschner S, Koesters C, Platzer B, Jorgl A, Ellmeier W, Benesch T, Strobl H (2007) Down-regulation of R α expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors. *Blood* 109:971-979.

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

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

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

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

8. Woodward DF, Jones RL and Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* 63:471-538.

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

10. Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H and Zamboni AC (2012) Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* 204:277-287.

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

12. Jia S, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Should individual PI3 kinase isoforms be targeted in cancer? *Curr Opin Cell Biol.* 21:199-208.

13. Zhang J, Zou F, Tang J, Zhang Q, Gong Y, Wang Q, Shen Y, Xiong L, Breyer RM, Lazarus M, Funk CD, Yu Y (2013) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes injury-induced vascular neointimal hyperplasia through the E-prostanoid 3 receptor. *Circ Res.* 113:104-114.

14. Kang Y, Chen BJ, Deoliveira D, Mito J, Chao NJ (2010) Selective enhancement of donor hematopoietic cell engraftment by the CXCR4 antagonist AMD3100 in a mouse transplantation model. *Plos One* 28:5(6):e11316.

15. Hoggatt J, Mohammad KS, Singh P, Hoggatt AF, Chitteti BR, Speth JM, Hu P, Poteat BA, Stilger KN, Ferraro F, Silberstein L, Wong FK, Farag SS, Czader M, Milne GL, Breyer RM, Serezani CH, Scadden DT, Guise TA, Srouf EF and Pelus LM (2013) Differential stem-and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E2. *Nature* 495:365-369.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування композиції, яка включає інгібітор дипептидилпептидази IV (DPP-IV) віддагліптин, в лікуванні реципієнтів, яким були трансплантовані гемопоетичні стовбурові клітини, які оброблені *in vitro* перед трансплантацією аналогом простагліну, вибраним з групи трепростенілу, ілопросту, цикапросту і берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей, і засобом, що підвищує рівень cAMP, форсколіном для посилення приживання, через щонайменше 1 день після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

2. Застосування композиції за п. 1, яке **відрізняється** тим, що вказаний аналог простагліну є трепростинілом, переважно похідним трепростенілу, вибраним з групи кислих похідних трепростинілу, проліків трепростинілу, поліморфних модифікацій трепростинілу або ізомерів трепростинілу.

3. Застосування композиції за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що інгібітор вводять щонайменше за 5, більш конкретно щонайменше за 10, більш конкретно щонайменше за 15, більш конкретно щонайменше за 24 години до трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

4. Застосування композиції за будь-яким з пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що інгібітор вводять через щонайменше 2, більш конкретно щонайменше 3, більш конкретно щонайменше 4 дні після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

5. Застосування композиції за будь-яким з пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що використовується для лікування індивідуума, який страждає на захворювання кісткового мозку.

6. Застосування композиції за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що захворюванням кісткового мозку є лейкемія, порушення компартменталізації клітин крові, захворювання кісткового мозку, індуковане хіміотерапією або опроміненням.

7. Застосування композиції за п. 6, яке **відрізняється** тим, що зазначене порушення компартменталізації клітин крові є гемоглобінопатією, порушенням функції нейтрофілів гранулоцитів або порушенням в Т- і/або В-лімфоцитах.

8. Спосіб підвищення можливості приживання гемопоетичних клітин, який включає наступні послідовні стадії:

а) забезпечення зразка гемопоетичних стовбурових клітин або клітин-попередників;

б) введення ефективної кількості аналога простагліну, вибраного з групи трепростенілу, ілопросту, цикапросту і берапросту або їх фармацевтично прийнятних солей, і засобу, який підвищує рівень cAMP, форсколіну у зазначених клітинах;

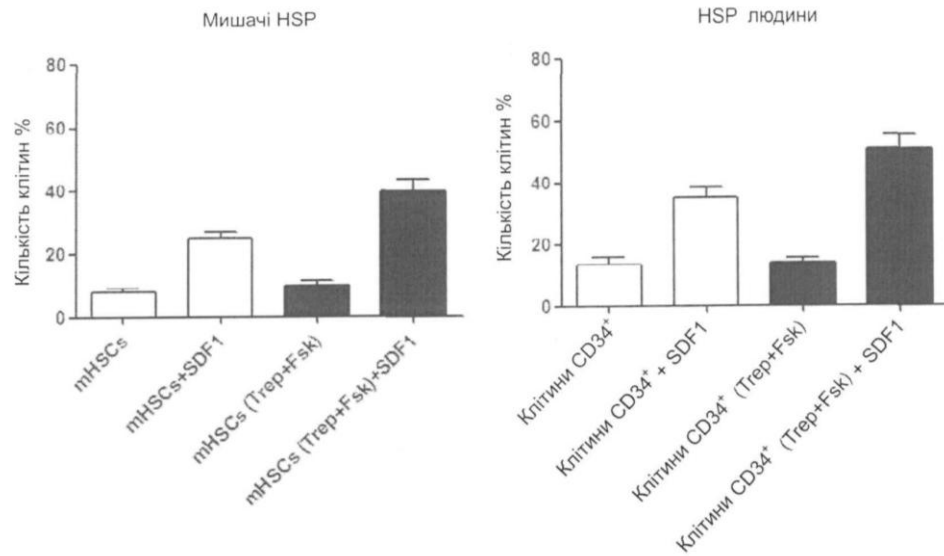
в) інкубування зазначеної суміші протягом періоду часу, достатнього для стимулювання G альфа-залежного сигнального шляху в зазначених клітинах;

г) виділення зазначених клітин;

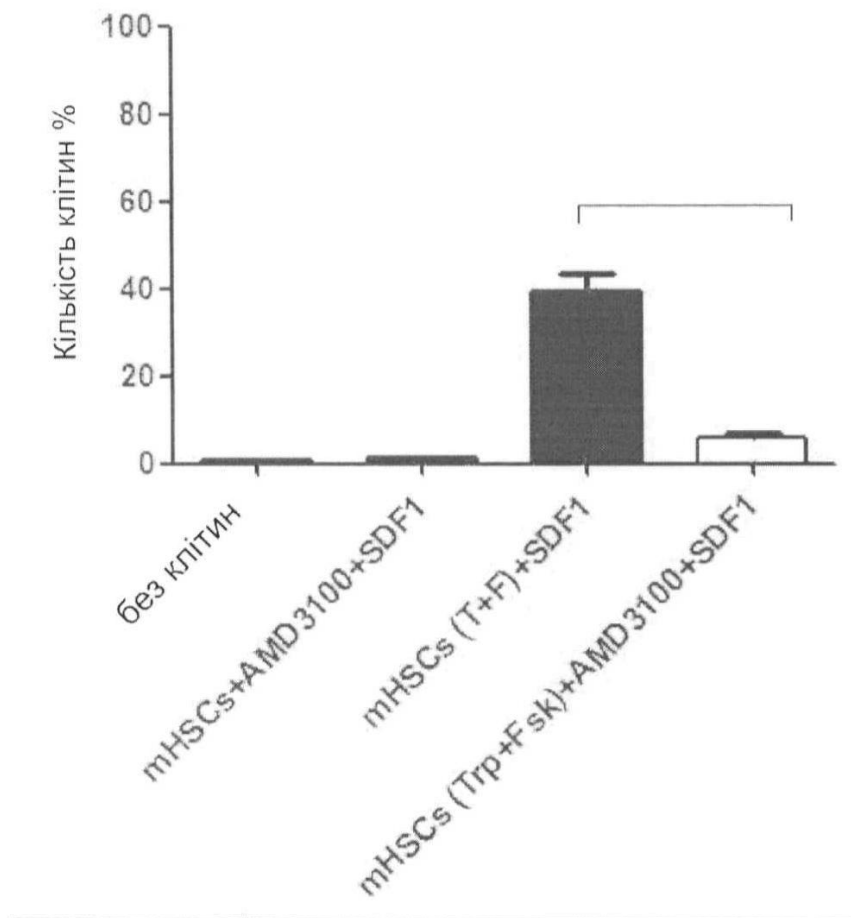
д) трансплантація зазначених клітин індивідуумові, який цього потребує;

f) введення зазначеному індивідуумові ефективної кількості інгібітора DPP-IV відагліптину.

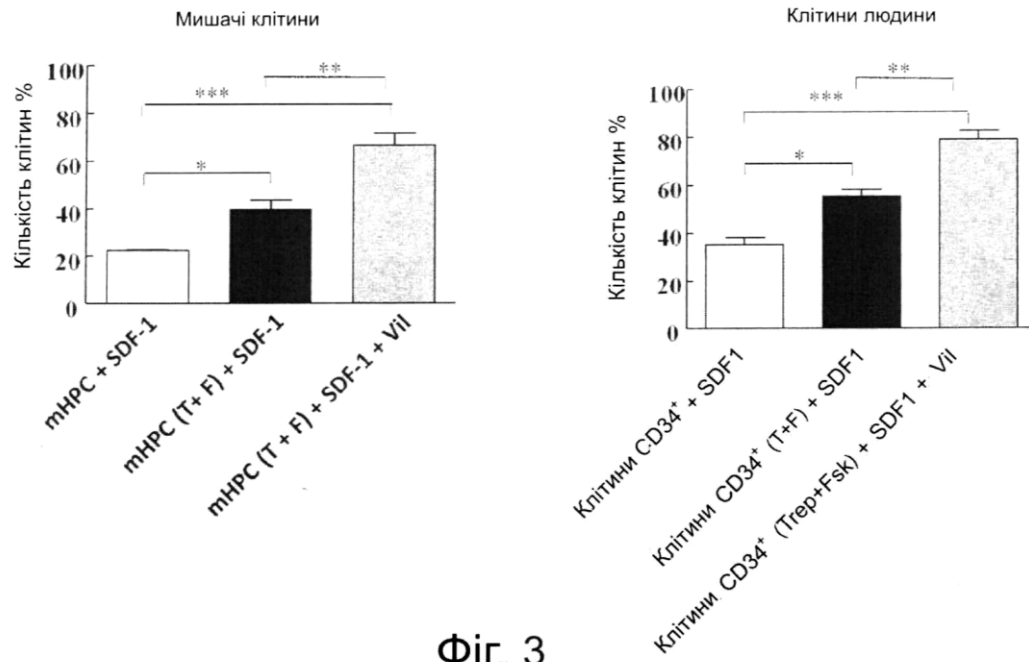
9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що зазначені стовбурові клітини або клітини-попередники одержують із пуповинної крові, донорського кісткового мозку або плаценти.



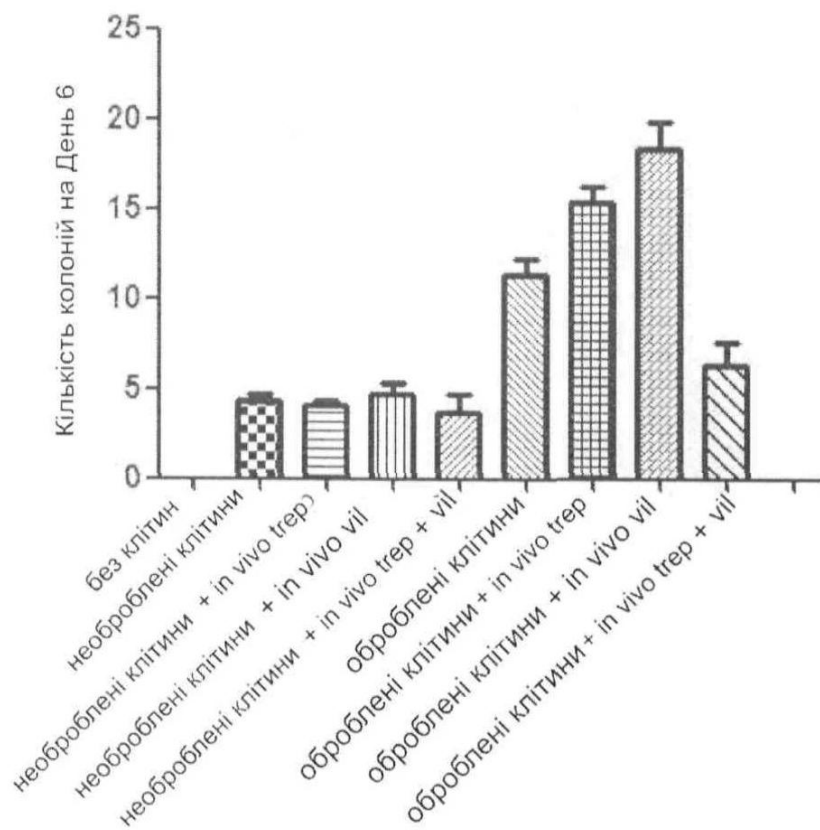
Фіг. 1



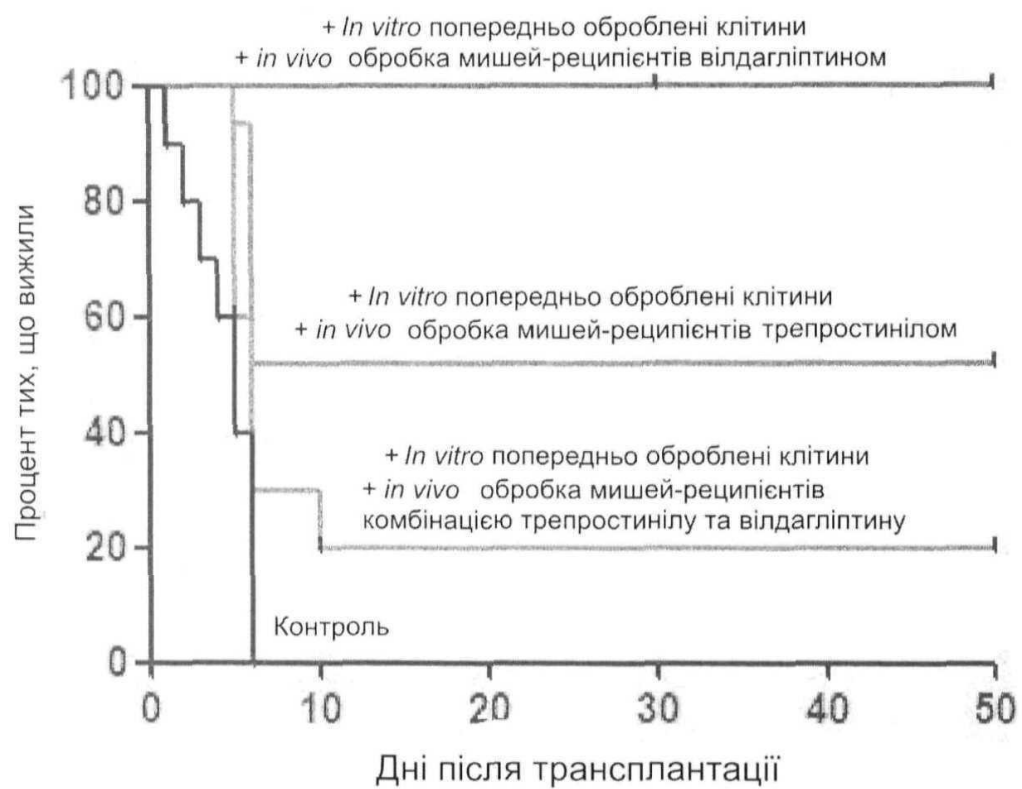
Фіг. 2



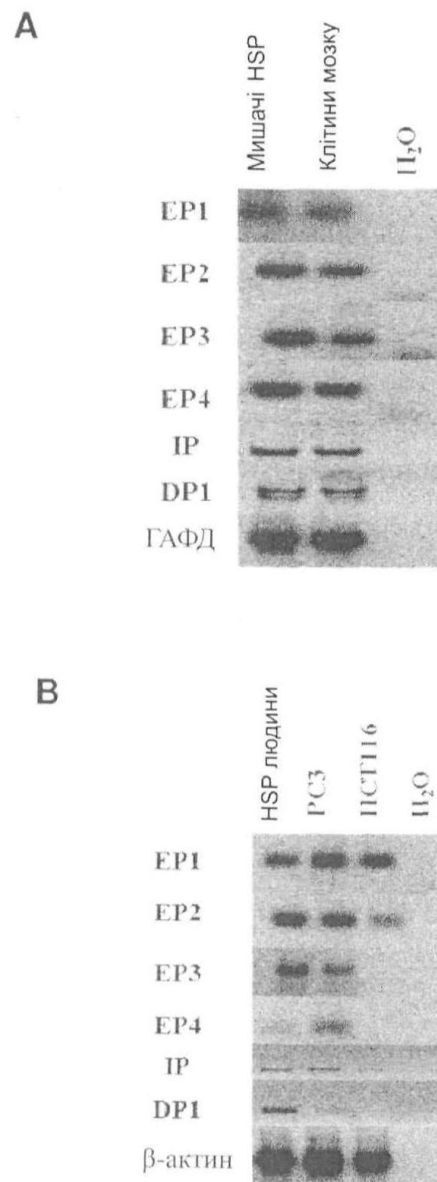
Фіг. 3



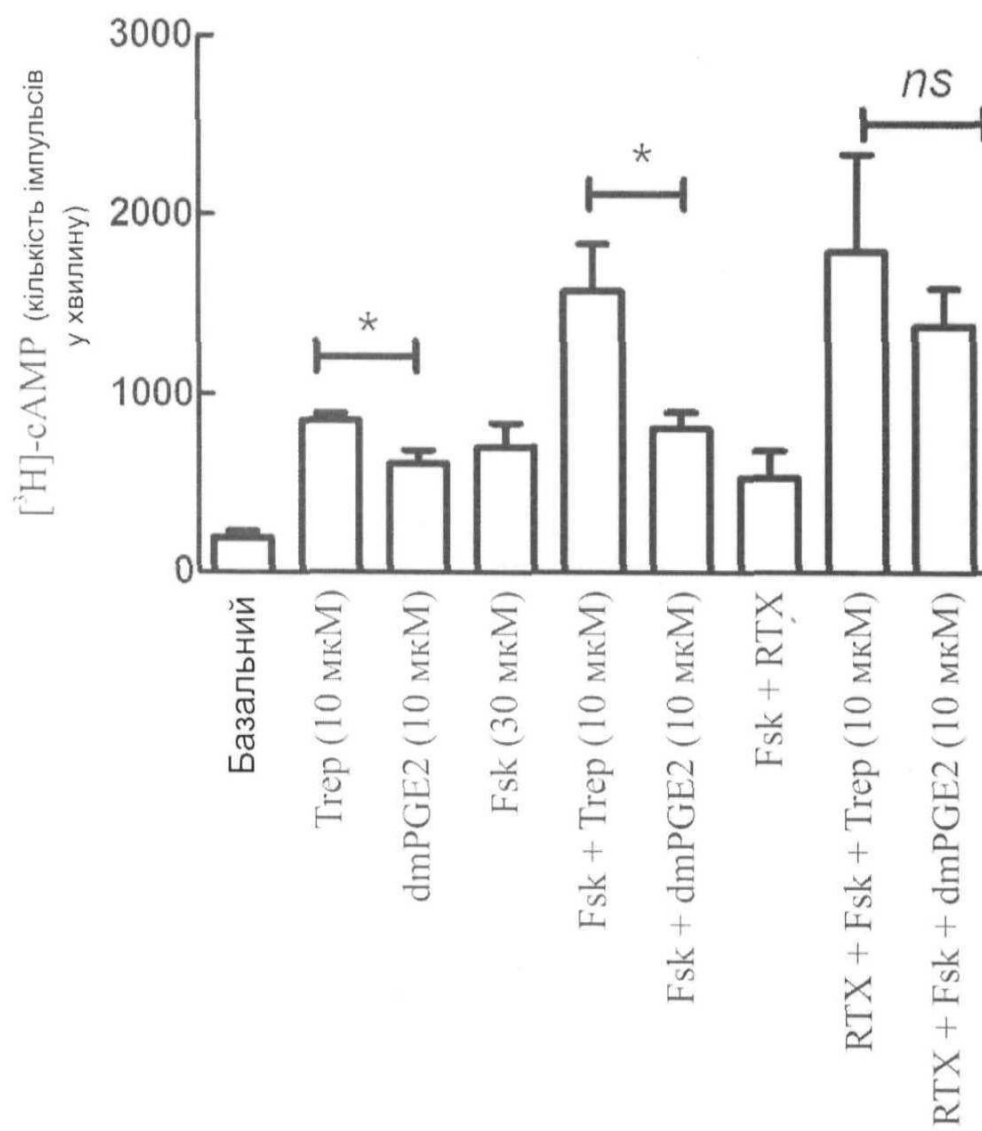
Фіг. 4



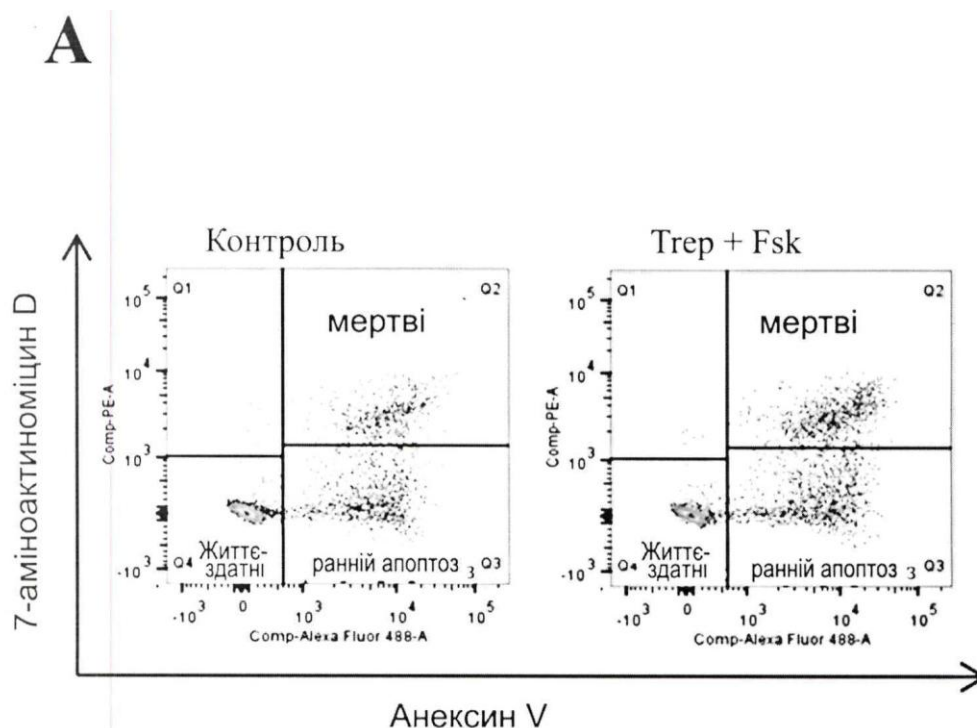
Фіг. 5



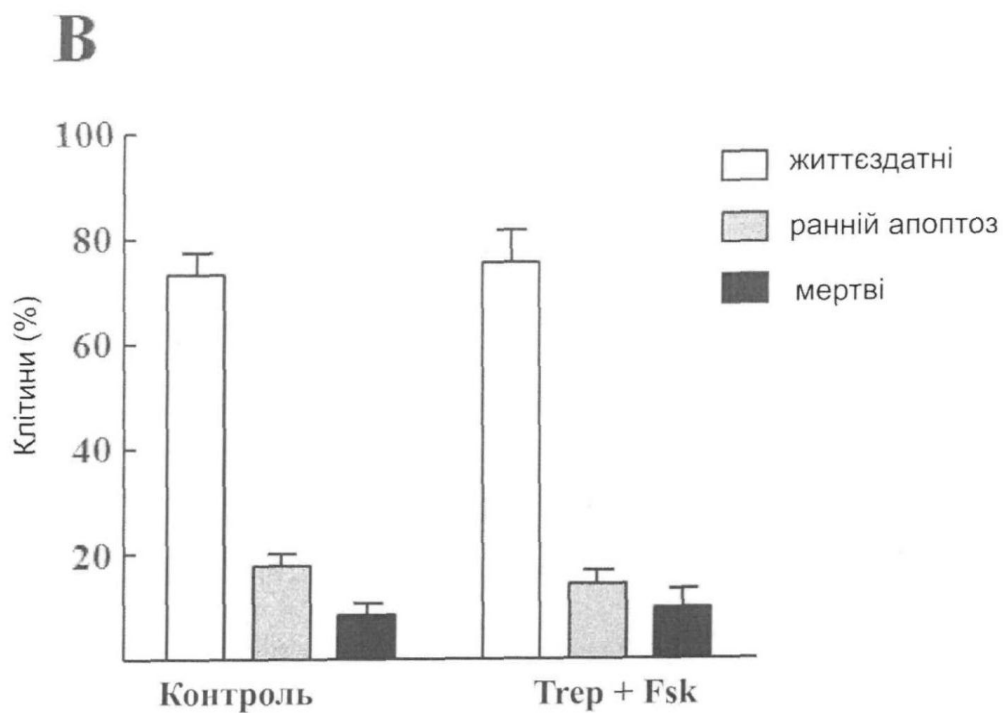
Фіг. 6



Фіг. 7



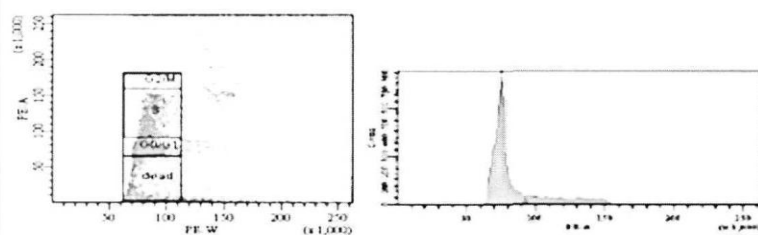
Фіг. 8



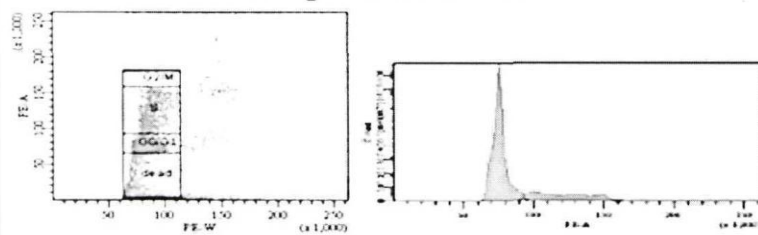
Фіг. 8 (продовження)

C

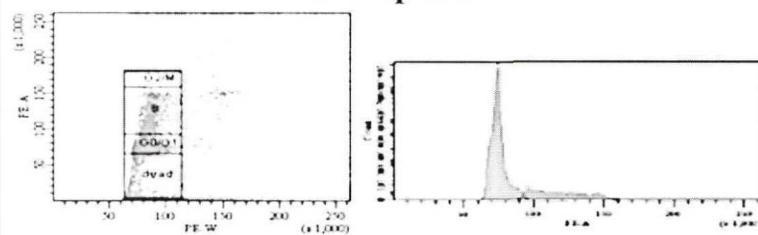
Контроль



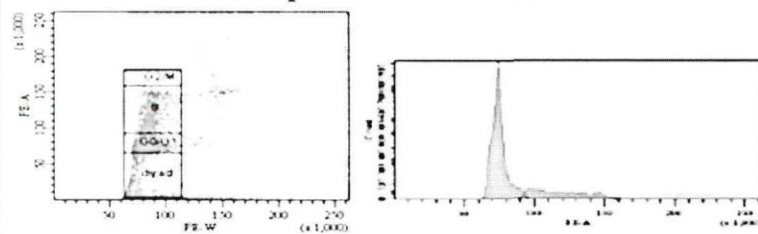
Trep + Fsk 1 година



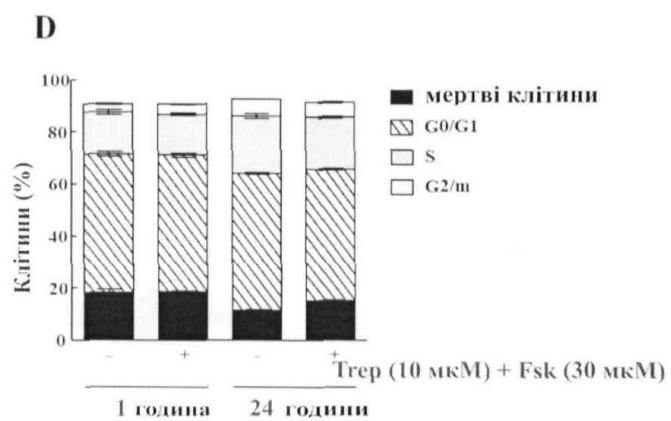
Контроль



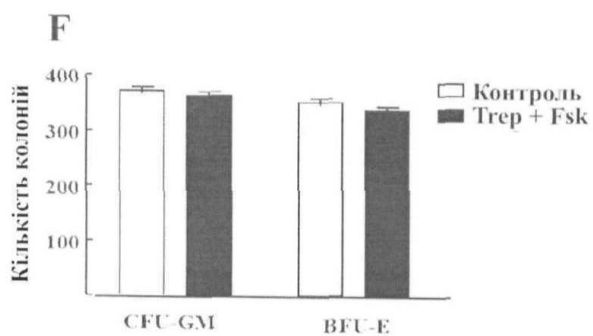
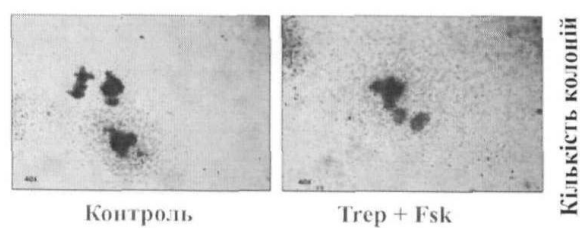
Trep + Fsk 24 години



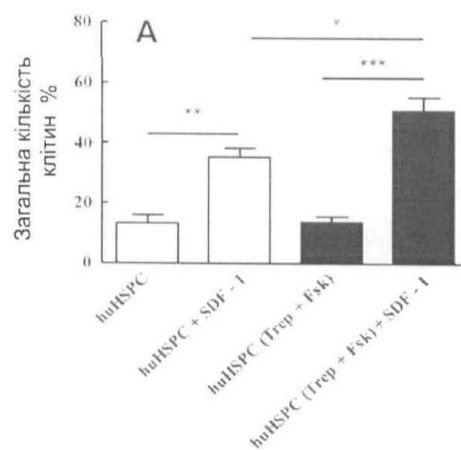
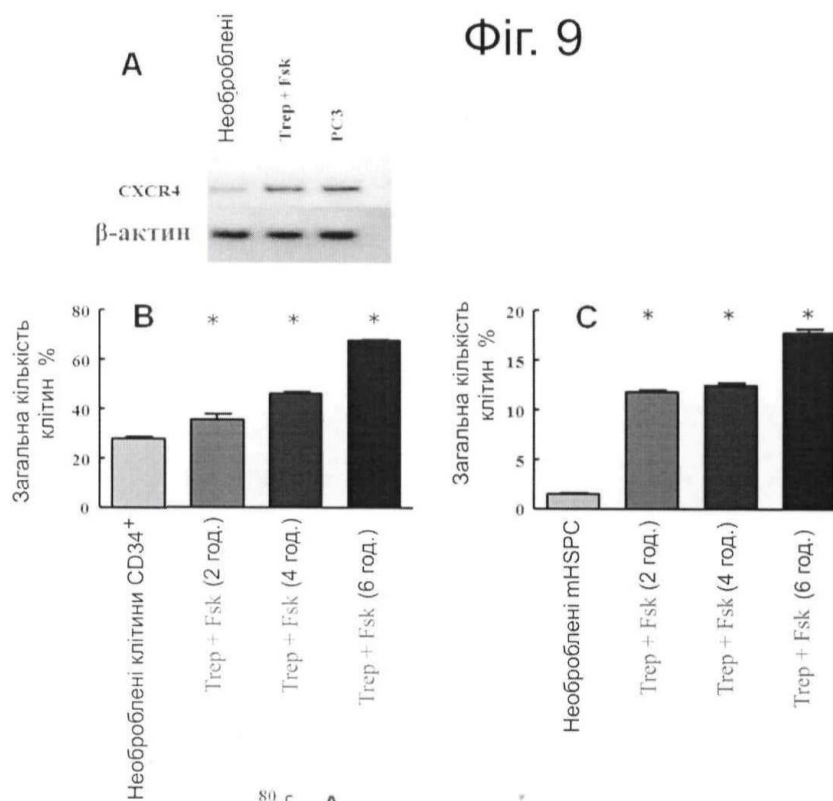
Фіг. 8 (продовження)



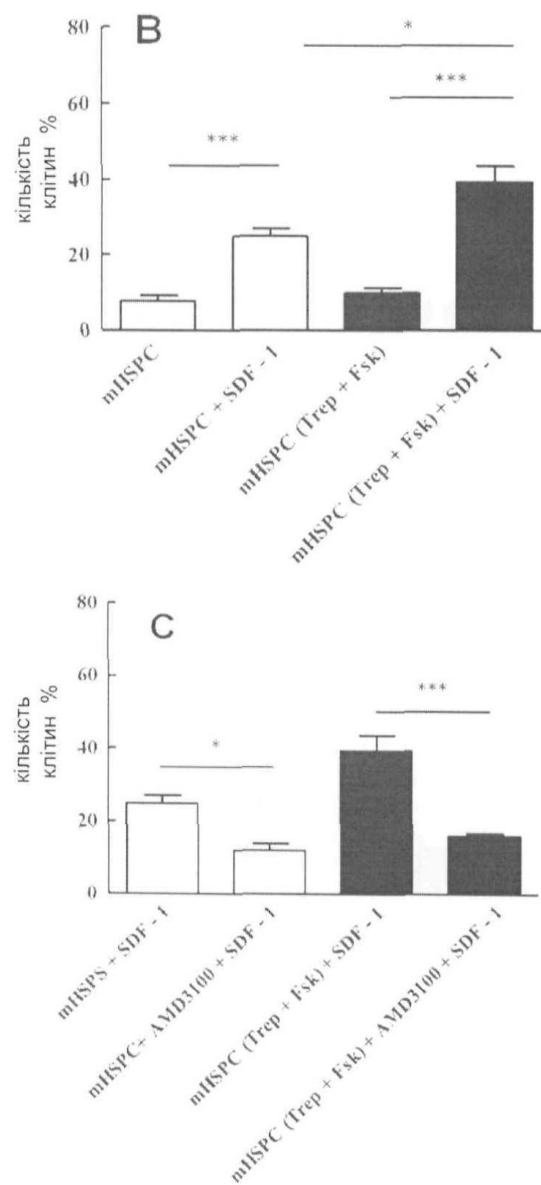
E



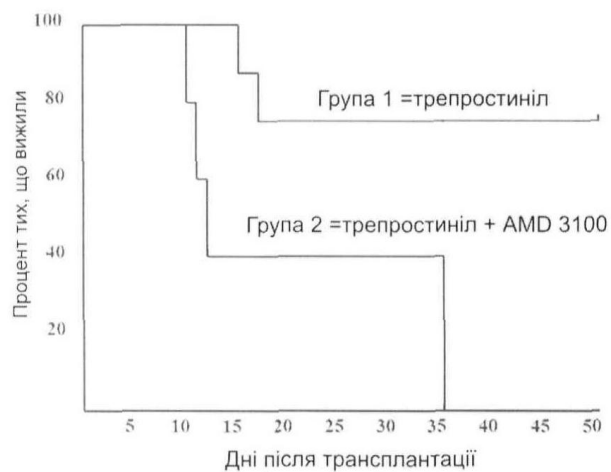
Фіг. 8 (продовження)



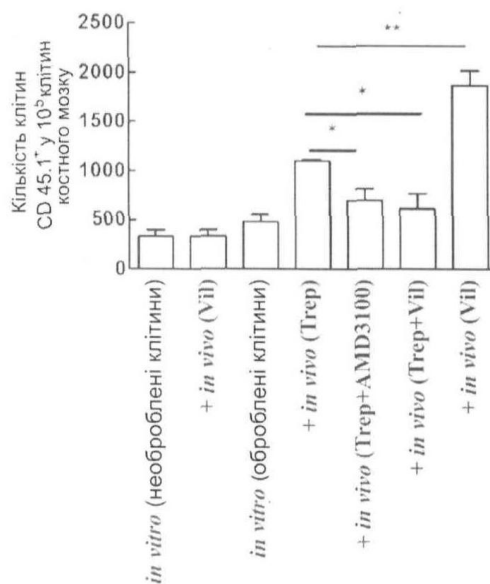
Фіг. 10



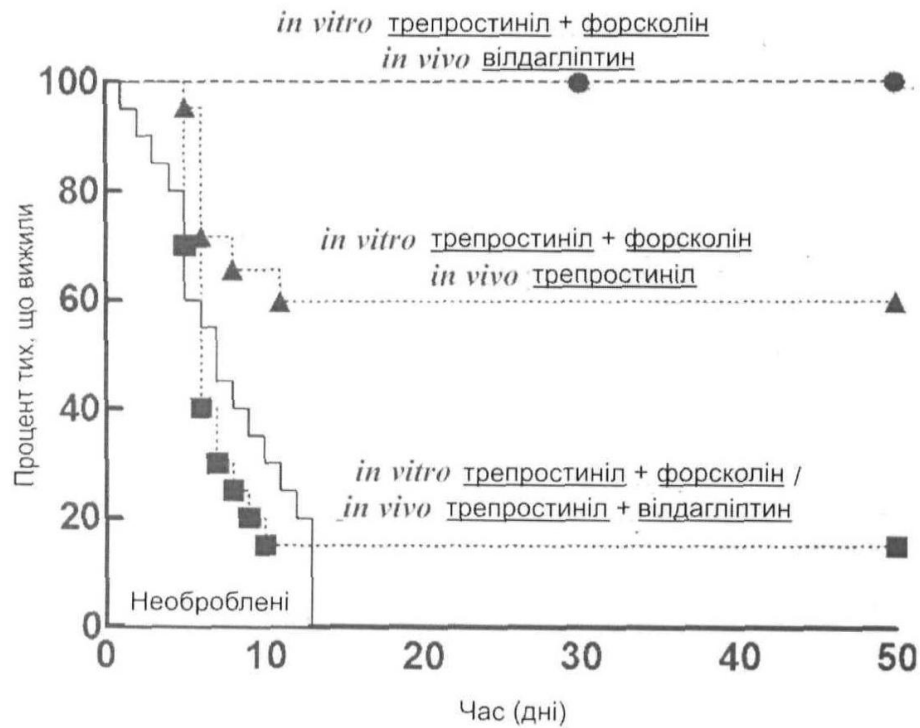
Фіг. 10 (продовження)



Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13