

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 622**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5585 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012 PCT/EP2012/050484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12095511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012 E 12700137 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2663313**

54 Título: **Método para mejorar el injerto de células madre hematopoyéticas**

30 Prioridad:

13.01.2011 EP 11150835

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

13.12.2018

73 Titular/es:

**SCIPHARM S.À R.L. (100.0%)
7, Fausermillen
6689 Mertert, LU**

72 Inventor/es:

**FREISSMUTH, MICHAEL;
ZEBEDIN-BRANDL, EVA-MARIA;
BERGMAYR, CHRISTIAN y
HUSSAIN, FILZA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 622 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar el injerto de células madre hematopoyéticas

Antecedentes de la invención

5 La presente invención proporciona un nuevo método para aumentar el injerto de células madre hematopoyéticas mediante un tratamiento previo *ex-vivo* que comprende las etapas de obtener una muestra que contiene células madre hematopoyéticas y añadir un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, para obtener una mezcla, incubar dicha mezcla durante un período de tiempo suficiente para estimular la señalización a través de G-alfa en dichas células y opcionalmente aislar dichas células estimuladas.

10 Además, se proporciona una composición que comprende Treprostinil junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, para uso en el tratamiento de individuos que se someten a un trasplante de células madre hematopoyéticas.

15 Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células primitivas capaces de regenerar todos los productos sanguíneos durante la vida de un individuo, compensando su propia regeneración con la diferenciación de su progenie. Las HSC varían su ubicación durante el desarrollo y circulan durante toda la vida en los mamíferos, moviéndose dentro y fuera del torrente sanguíneo para ocupar nichos en la médula ósea en etapas secuenciales de migración, injerto y retención. La migración es el proceso mediante el cual las células madre del donante encuentran el camino hacia la médula ósea, el injerto de células madre significa su crecimiento en la médula ósea.

20 Las células madre hematopoyéticas tienen potencial terapéutico como resultado de su capacidad para restaurar la sangre y las células inmunes en receptores trasplantados. Además, las HSC tienen el potencial de regenerar células para otros tejidos, como cerebro, músculo e hígado. Los métodos de trasplante autólogos y alogénicos en seres humanos se usan actualmente como terapias para enfermedades como leucemia, linfomas y otras enfermedades fatales. Se debe aislar una gran cantidad de médula ósea del donante en estos procedimientos para asegurar que hay suficientes HSC para el injerto.

25 Las células madre hematopoyéticas necesitan una señal transducida por $G\alpha_s$ *in vivo* para repoblar el nicho en la médula ósea (1). Estos hallazgos recientes confirman experimentos anteriores *in vitro*, que mostraron que la activación de $G\alpha_s$ promueve la supervivencia y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (2,3). $G\alpha_s$ es la subunidad α , que se une al nucleótido de guanina, de la proteína G heterotrimérica, que estimula las 9 isoformas de la adenilil ciclasa de mamíferos unidas a membrana. La $G\alpha_s$ se puede activar *in vivo* o *in vitro* mediante el tratamiento con la toxina colérica, porque la toxina colérica ribosila mediante el ADP el resto de arginina catalítico ($R^{186/187/201/202}$; el número preciso de argininas depende de la variante de corte y empalme de $G\alpha_s$); se requiere un resto de arginina intacto para la hidrólisis del GTP y la desactivación de $G\alpha_s$ (4). La mejora del injerto se puede observar también después del tratamiento previo de las células madre hematopoyéticas con toxina colérica: se encontró aproximadamente el doble de células precursoras (Lin^-) en la médula ósea si el preparado de células madre se había tratado previamente con toxina colérica (1).

35 Sin embargo, la toxina colérica podría ser muy inconveniente para la preparación de células madre para pacientes que son trasplantados con médula ósea. La toxina colérica (CT), especialmente el grupo pentamérico de su subunidad B no tóxica (CTB) es un adyuvante de mucosas que tiene fuertes propiedades inmunomoduladoras tanto *in vivo* como *in vitro* y es uno de los inmunógenos de mucosas más potentes. La toxina colérica y la CTB estimulan una fuerte respuesta intestinal de anticuerpos tipo IgA y memoria inmunológica a largo plazo. Basado en esto, CTB se ha convertido en un componente importante en vacunas orales desarrolladas recientemente contra el cólera y la diarrea causadas por la *E. coli* enterotoxigénica. La fuerte inmunogenicidad de CT y CTB puede explicarse de forma genérica por su habilidad para unirse a receptores de superficie de la mucosa intestinal.

45 Adicionalmente, durante el curso natural de la infección, la parte B pentamérica de la molécula de la toxina se une a la superficie de las células epiteliales intestinales y se endocita rápidamente junto con la subunidad A. Una vez endocitada, la subunidad A con actividad catalítica se separa de la parte B pentamérica y entra en la célula a través de un poro que forma la subunidad B. Una vez dentro de la célula, ribosila de forma permanente la subunidad $G\alpha_s$ de la proteína G heterotrimérica, lo que da como resultado la producción constitutiva de AMPc. Esto lleva a su vez a la secreción de H_2O , Na^+ , K^+ y HCO_3^- en la luz del intestino delgado, dando como resultado una deshidratación rápida y otros factores asociados con el cólera. La mayoría de las células captan la toxina colérica si se inyecta de forma intravenosa (sólo células como las de la barrera hematoencefálica están protegidas por barreras específicas). De esta forma, se aumentará el AMPc en la mayoría de las células del cuerpo y causará un amplio espectro de efectos secundarios (que van desde la taquicardia a la vasodilatación, temblores musculares, hiperglucemia, etc.).

55 Así, estos efectos hacen que la toxina colérica no sea apta para el uso en humanos con respecto a la estimulación de las células madres hematopoyéticas.

Sin embargo, la relevancia terapéutica de la estimulación de células madre es importante cuando se realizan trasplantes de médula ósea heterólogos (es decir, células madre hematopoyéticas obtenidas de donantes

inmunocompatibles) y es un procedimiento estándar que se usa para el tratamiento de personas que padecen leucemia, para el tratamiento de personas que presentan defectos genéticos en el compartimento hematopoyético (p.ej. hemoglobinopatías como la talasemia; defectos en la función de los granulocitos neutrófilos, etc.).

5 También es importante puesto que el trasplante de médula ósea autólogo es un procedimiento estándar que se usa para aumentar la ventana terapéutica de drogas citotóxicas y así permitir la quimioterapia de alta intensidad de dosis (5,6).

10 Las células madre hematopoyéticas expresan los cuatro receptores de tipo E para prostaglandinas (EP1-4). El tratamiento previo de células madre hematopoyéticas con la prostaglandina E2 (dimetilada) aumenta su injerto (7,8). La señalización canónica dependiente de G_{α_s} media este efecto, porque la activación de la proteína quinasa A (PKA) inducida por AMPc actúa de forma sinérgica con las señales dependientes de Wnt para estabilizar a la catenina β (9).

Según Otsuka et al., la implantación de células mononucleares (MNCs) de médula ósea autóloga (BM) se podría aumentar por Beraprost sódico en un modelo de conejo. El objetivo del estudio fue el mantenimiento del desarrollo arterial en la isquemia periférica y de miocardio. Sin embargo, las células madre hematopoyéticas son un tipo específico de células dentro de las células de médula ósea (16).

15 En Madonna et al. se describe una combinación de terapia con células madre y tratamientos farmacológicos, en donde se prueba la prostaciclina en un modelo de injerto de ADSC en miocardio tras su administración intracoronaria (17).

En Ishii M. et al. se expone que la liberación mantenida de prostaciclina aumentó la función proangiogénica de células madre mesenquimales y el crecimiento de células musculares en tejido isquémico (18).

20 WO2006/017169 describe un sensor para implante con un recubrimiento biocompatible para controlar el crecimiento del tejido que puede contener, entre otros, análogos de prostaciclina.

En Crutchley D. et al. (19), se describe el efecto inhibitorio del Cicaprost o el Iloprost en la síntesis del factor tisular, el factor de necrosis tumoral y la interleuquina- 1β en células THP1 humanas.

25 La localización de las células madre tras el trasplante es un determinante crítico para el éxito del trasplante. Actualmente, se necesita un número grande de células madre para el trasplante porque las células madre no se injertan de forma exitosa en la médula ósea y hay un periodo largo de aplasia de la médula ósea que da como resultado una disminución de las células sanguíneas maduras.

Así pues, aún es una necesidad no alcanzada la provisión de métodos y composiciones para estimular las HSC para aumentar la migración, injerto y retención en nichos de la médula ósea de estas HSC aisladas en sujetos que reciben trasplantes de médula ósea.

30 El problema se soluciona con las realizaciones de la presente invención.

Descripción de la invención

Se ha demostrado de forma sorprendente que los análogos sintéticos de prostaciclina I2 (PGI_2) como por ejemplo el Treprostinil, Iloprost, Beraprost y Cicaprost son capaces de aumentar los niveles de AMPc en células madre hematopoyéticas lo que da como resultado el aumento de injerto de células madre en médula ósea.

35 Un análogo de prostaciclina como el Treprostinil ofrece varias ventajas frente a la prostaglandina E2:

(i) Es un análogo estable de prostaciclina/ PGI_2 , que estimula también los receptores EP2 y EP4 (10). Por ello, tiene el potencial de estimular múltiples receptores acoplados a G_s mientras que no activa receptores EP3 inhibidores (es decir, acoplados a G_i), que inhiben la acumulación de AMPc. La dimetil- PGE_2 es un agonista completo para este último (1). En cambio, el Treprostinil sólo es un agonista de baja afinidad para los receptores EP3.

40 (ii) Dado que son más estables metabólicamente que las prostaciclina naturales, Treprostinil, Iloprost, Beraprost y Cicaprost pueden provocar efectos más duraderos si se aplican *in vivo* y por ello promueven injertos de médula ósea más eficientes.

(iii) Se tolera bien la administración prolongada o repetida de un análogo de prostaciclina, específicamente de Treprostinil, Iloprost, Beraprost y Cicaprost.

45 La presente invención proporciona un método nuevo para aumentar el injerto de células madre hematopoyéticas mediante un tratamiento previo *ex vivo* que comprende las etapas de

a. añadir al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente inespecífico, activante de AMPc, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, a una muestra que contiene células madre hematopoyéticas,

50 b. obtener una mezcla por incubación de dicha mezcla durante un periodo de tiempo suficiente para estimular la señalización a través de G_{α_s} en dichas células y, de forma opcional

c. aislar y opcionalmente purificar dichas células estimuladas.

Según una realización de la invención, el análogo de prostaciclina se selecciona del grupo del Treprostinil, Iloprost, Beraprost y Cicaprost o de sales de las mismas, farmacéuticamente aceptables.

5 Según el método de la invención, también se puede proporcionar una mezcla de células madres estimuladas o no estimuladas.

La muestra es médula ósea específicamente. Las células madre pueden provenir de forma general de cualquier fuente conocida, específicamente, pueden ser HSC aisladas de sangre periférica, de sangre de cordón umbilical o de médula ósea.

10 Según la invención, Treprostinil puede ser un derivado seleccionado del grupo de derivados ácidos, profármacos, polimorfos o isómeros.

De forma similar, Iloprost, Cicaprost o Beraprost pueden ser derivados del grupo de derivados ácidos, profármacos, polimorfos o isómeros, de ahora en adelante.

Según la realización de la invención, a la muestra se le añade al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente inespecífico, activante de AMPc, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina.

15 Según una realización específica de la invención, se proporciona una composición que comprende un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, para uso en el tratamiento de individuos que padecen enfermedades de la médula ósea que pueden recibir un trasplante de células madre hematopoyéticas.

20 Según una realización específica de la invención, el análogo de prostaciclina de la composición se selecciona del grupo del Treprostinil, Iloprost, Cicaprost o Beraprost o de sales de las mismas farmacéuticamente aceptables.

Según una realización preferida, la composición comprende Treprostinil.

Los individuos padecen, específicamente, leucemia, un defecto del compartimento de células sanguíneas, trasplante de médula ósea después de quimioterapia o de radioterapia.

25 Según una realización adicional de la invención, el defecto del compartimento de células sanguíneas es una hemoglobinopatía o un defecto en la función de granulocitos neutrófilos. La composición de la invención se puede usar también para el tratamiento de individuos que padecen una enfermedad de la médula ósea que reciben un trasplante de células madre hematopoyéticas, mediante la administración de un análogo de prostaciclina durante siete días, al menos, después del trasplante de médula ósea. Se usa específicamente un análogo de prostaciclina seleccionado entre el grupo del Treprostinil, Iloprost, Cicaprost y Beraprost, más específicamente, Treprostinil.

30 Según una realización adicional, se proporciona una composición que comprende un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina y células madre hematopoyéticas estimuladas.

35 Según una realización adicional, se proporciona una composición que comprende Treprostinil o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable junto con un agente inespecífico, activante de AMPc, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina y células madre hematopoyéticas estimuladas.

Las composiciones de la invención comprenden además forskolina o toxina colérica específicamente para uso en animales o estudios con animales.

Las composiciones de la invención pueden ser composiciones farmacéuticas.

40 La composición de la invención se puede administrar por todas las vías conocidas en la técnica, específicamente, está preparada para administración intravenosa o subcutánea.

El análogo de prostaciclina se puede proporcionar en una fórmula oralmente disponible seleccionada del grupo de fórmulas, comprimidos o cápsulas de liberación prolongada.

45 La cantidad de análogos de prostaciclina depende de la aplicación terapéutica o del método para preparar las HSC estimuladas. Muy específicamente, para aplicaciones terapéuticas, la cantidad efectiva de Treprostinil es de al menos 1,0 ng/kg de peso corporal.

Figuras:

Figura 1: caracterización de la población celular Lin⁺ retenida por las esferas magnéticas. El eje x (etiquetado como APC-C7-A) indica la fluorescencia registrada para la combinación de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de linaje: CD3ε para células T, CD45R (B220) para células B, CD11b y Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) para el linaje mielóide

(monocitos/granulocitos), Ter-119 para el linaje eritroide. El eje y indica la fluorescencia registrada para el anticuerpo frente al receptor para factor para célula madre murino c-Kit. Es evidente que el cuadrante superior izquierdo (que indica c-Kit⁺ y células negativas para marcadores de linaje) no contiene células.

5 Figura 2: caracterización de la población celular Lin⁻ que no se une a las esferas magnéticas. Como en la figura 1, el eje x (etiquetado APC-C7-A) denota la fluorescencia registrada mediante la mezcla de anticuerpos directamente en contra de marcadores linaje.: CD3ε para células T, CD45R(=B220) para células B, CD11b y Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) para el linaje mielóide (monocítico/granulocítico, Ter-119 para el linaje eritroide. El eje y indica la fluorescencia registrada para el anticuerpo frente al receptor para factor para célula madre murino c-Kit. Es evidente que el cuadrante inferior (que indica c-Kit⁺ y células positivas para marcadores de linaje) no contiene células y que las células se encuentran de forma predominante en el cuadrante izquierdo superior, donde se esperan las células positivas para c-Kit y negativas para los marcadores de linaje.

15 La figura 3 muestra la caracterización de las poblaciones celulares Lin⁺ (Figura 3A) y Lin⁻ (Figura 3B) para la presencia de Sca-1 y c-Kit. Los paneles 3A y 3B muestran las células retenidas por las esferas magnéticas (caracterizadas en la figura 1) y que aparecieron en la citometría de flujo (caracterizadas en la figura 2). Se marcaron como se describe en la sección de métodos y se analizaron para la presencia de c-Kit (PerCP-Cy5-5-A, eje y) y de Sca-1 (PE-Cy7-A, eje x) simultáneamente. Es evidente que las células de linaje positivo analizadas en el panel A se localizan en el cuadrante inferior izquierdo; es decir, que están desprovistas de c-Kit y Sca-1. En cambio, las células del panel B están predominantemente en los cuadrantes superiores, es decir, que o bien tienen niveles altos de c-Kit (cuadrante superior izquierdo) o bien de ambos, c-Kit y Sca-1 (cuadrante superior derecho), como se espera para las poblaciones de células madre hematopoyéticas y de progenitores no comprometidos.

20 Figura 4: Acumulación de AMP cíclico en células madre hematopoyéticas (Lin⁻, c-Kit⁺, Sca-1⁺) tras la estimulación con forskolina, Treprostinil, Iloprost, Beraprost o la combinación de forskolina y prostanoïdes. Se incubaron células Lin⁻ (7x10⁵ por ensayo) en presencia de adenina[³H] para el marcaje metabólico previo de la reserva de nucleótidos de adenina como se describe en Métodos. Se incubaron las células en ausencia (columna izquierda, designada como 0) o presencia de los compuestos indicados. Se purificó el AMPc[³H] acumulado por cromatografía secuencial en columnas de Dowex AG50-X8 y de alúmina y se cuantificó mediante recuento por centelleo líquido. Los datos representan las medias ± desviación típica (SD; n=4).

25 Figura 5: Curva de concentración-respuesta para la acumulación de AMPc producida por el Treprostinil en células madre hematopoyéticas (Lin⁻, c-Kit⁺, Sca-1⁺). Las condiciones del ensayo fueron las descritas para la figura 4. Los datos representan las medias ± SD (n=2).

30 Figura 6: El tratamiento de células madre hematopoyéticas con Treprostinil *ex vivo* da lugar a un aumento del injerto de médula ósea en ratones irradiados de forma letal. Se prepararon las células madre hematopoyéticas como en la figura 3 y se trataron previamente con los compuestos indicados (FSK, forskolina), como se describe en Métodos. El recuento de glóbulos blancos se determinó mediante FACS. Se indica el número de animales analizado.

35 Figura 7: Proporción de células sanguíneas positivas para Ly5.2 y Ly5.1, 16 semanas después del trasplante de médula ósea. Las células Ly5.1 se trataron previamente con CTX o Treprostinil y forskolina.

Figura 8: Proporción de células sanguíneas positivas para Ly5.2 y Ly5.1, 16 semanas después del trasplante de médula ósea. Las células Ly5.2 se trataron previamente con CTX o Treprostinil y forskolina.

Descripción detallada de la invención

40 Proporcionar métodos y medios para aumentar la migración y el injerto de HSC al entorno de la médula ósea tiene importantes implicaciones biológicas y médicas. La localización de las células madre tras el trasplante es muy importante para procedimientos clínicos que conllevan la necesidad de grandes cantidades de células de donante. Estos métodos también son muy útiles porque un número significativo de trasplantes de donantes autólogos contienen números insuficientes de células madre, o HSC. De esta forma, los pacientes son incapaces de encontrar donantes histocompatibles de forma frecuente, lo que enfatiza la necesidad de métodos y composiciones para reducir el número de HSC necesarias para el éxito del trasplante. La habilidad para mejorar la migración y el injerto de HSC *in vitro* o *ex vivo* permite el aislamiento de pocas células de los donantes, por lo que se reduce el tiempo y el malestar asociado a la recogida de médula ósea o células madre periféricas, y se aumenta el número de donantes voluntarios de HSC.

50 La presente invención proporciona por tanto un método nuevo para aumentar el injerto de HSC mediante un tratamiento previo de las HSC *ex-vivo* que comprende las etapas de a) añadir al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, a una muestra que contiene células madre hematopoyéticas para generar una mezcla, b) incubar dicha mezcla durante un periodo de tiempo suficiente para estimular la señalización de Gα_s en dichas células y c) opcionalmente aislar dichas células así estimuladas o usar dicha mezcla que contiene dichas células estimuladas para usos posteriores, por ejemplo, para tratamientos o trasplantes.

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

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

5 Iloprost se comercializa como "Ilomedina" y es un ácido 5-[(*E*)-(1*S*,5*S*,6*R*,7*R*)-7-hidroxi-6[(*E*)-(3*S*,4*RS*)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-*inil*]-*bi*-ciclo[3.3.0]octan-3-*iliden*]}pentanoico.

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

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

10 Según una realización de la invención, se pueden usar al menos dos, específicamente al menos tres, análogos de prostaciclina distintos para dichos métodos. Alternativamente, se pueden usar dos, tres, cuatro, cinco o seis o incluso más análogos de prostaciclina diferentes para dicho método.

15 Este método proporciona de forma ventajosa células madre estimuladas que se pueden administrar directamente a individuos y que no muestran ningún efecto secundario indeseado debido a grandes cantidades de agentes activantes del AMPc no selectivos.

Según una realización adicional de la invención, se proporciona un método para aumentar el injerto de células madre hematopoyéticas mediante un tratamiento previo *ex vivo*, que comprende las siguientes etapas:

20 a. añadir al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente inespecífico, activante de AMPc, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, a una muestra que contiene células madre hematopoyéticas para obtener una mezcla

b. incubar dicha mezcla durante un periodo de tiempo suficiente para estimular la señalización de $G\alpha_s$ en dichas células y, opcionalmente,

c. aislar dichas células estimuladas y, opcionalmente,

d. purificar y/o concentrar dichas células estimuladas.

25 Según una realización específica de la invención, la razón de análogo de prostaciclina y forskolina debe ser aproximadamente 1:3. Las HSC tratadas con forskolina y análogos de prostaciclina se pueden purificar antes de ser reimplantadas, sin embargo, estas HSC también se pueden reimplantar sin etapas de purificación adicionales, dado que cantidades pequeñas de forskolina pueden estar presentes, pero no pueden causar ningún efecto secundario negativo.

30 Alternativamente, se puede añadir a las células madre una combinación de Treprostinil con Iloprost, o Beraprost o bien Cicaprost. Alternativamente, se puede añadir Treprostinil en combinación con más de un análogo de prostaciclina, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco de otros análogos de prostaciclina; por ejemplo, pero no limitado a, Iloprost, Beraprost o Cicaprost o sales de los mismos fisiológicamente aceptables.

35 Según una realización para el uso en estudios con animales o el tratamiento de animales, un activante de AMPc como la forskolina y/o la toxina colérica se añade adicionalmente a las HSC o a la mezcla de HSC con Treprostinil, Iloprost, Cicaprost o Beraprost antes de la incubación.

40 El periodo de tiempo que se necesita para estimular la señalización a través de $G\alpha_s$ en dichas células se puede medir según métodos conocidos, por ejemplo, mediante el uso de medidas de AMPc, de las que hay numerosas variantes: RIA, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) con EPAC (epac1) (Ponsiouen B. et al., EMBO reports, 5, 12, 1176-1180 (2004)), métodos radioquímicos, etc. Se pueden seleccionar o discriminar las células estimuladas en donde se da la señalización a través de $G\alpha_s$ de las células no estimuladas mediante métodos conocidos en la técnica como una sonda para AMPc basada en FRET.

Según una realización de la invención el tiempo de incubación es de aproximadamente 1 a 60 min, preferiblemente de aproximadamente 2 a 30 minutos.

45 La vía de señalización dependiente de AMPc es una vía esencial para promover el injerto de células madre hematopoyéticas. Los inventores han demostrado que un análogo de prostaciclina puede estimular el aumento del AMPc en células madre hematopoyéticas. Esto se realiza a través de la activación de múltiples receptores, por ejemplo, receptores para prostanoides tipo I (IP) y E (EP), lo que da lugar a un aumento de la señalización a través de $G\alpha_s$. Por consiguiente, los análogos de prostaciclina como el Treprostinil, Iloprost, Cicaprost o Beraprost son más efectivos para el aumento de los niveles de AMPc.

50 Según una realización muy específica, Treprostinil es un análogo de prostaciclina preferido usado según el método de la presente invención.

Alternativamente, en ciertos métodos y composiciones de la invención, se puede añadir también al menos un agente seleccionado entre un potenciador del AMP cíclico (AMPc) o un ligando de un receptor EP para prostaglandina. Ejemplos de potenciadores del AMPc incluyen, pero no se limitan a, dibutilil AMPc (DBAMPc), ésteres de forbol, forskolina, esclarelina, 8-bromo-AMPc, toxina colérica (CT), aminofilina, 2,4-dinitrofenol (DNP), norepinefrina, epinefrina, isoproterenol, isobutilmetil-xantina (IBMX), cafeína, teofilina (dimetilxantina), dopamina, rolipram, prostaglandina E₁, prostaglandina E₂, polipéptido activador de la adenilato ciclase de pituitaria (PACAP) y péptido vasoactivo intestinal (VIP), entre otros conocidos por la técnica, se pueden añadir a las células madre o a la mezcla de células madre con Treprostinil, Iloprost, Cicaprost y/o Beraprost antes de la incubación. Algunos ejemplos de potenciadores del AMPc también incluyen AMPc y análogos del AMPc, como los sp-5,6-dicloro-BIMPS cíclico (BIMPS), entre otros.

Según la invención, la forskolina y/o la toxina colérica o la subunidad A de la toxina colérica se añade adicionalmente a las células madre o a la mezcla de células madre/Treprostinil antes de la incubación.

Según una realización específica, dichos potenciadores del AMPc se usan para realizar el tratamiento de células madre de células animales o para realizar estudios con animales que tienen en cuenta el injerto de células madre.

Con respecto a los análogos de prostaciclina, según la presente invención, el término "análogos de prostaciclina" incluye también derivados y análogos de dichas sustancias.

Los términos "análogo" o "derivado" se refieren a un compuesto químico que es similar a otra sustancia química en estructura y función, que difiere estructuralmente por un solo elemento o grupo frecuentemente, que se puede diferenciar por la modificación de más de un grupo (p.ej., 2, 3 o 4 grupos) si conserva la misma función que el compuesto original. Estas modificaciones son rutinarias para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos químicos adicionales o sustituidos, como ésteres o amidas de un ácido, grupos protectores como los grupos bencilo para un alcohol o tiol, y grupos terc-butoxicarbonilo para una amina. También se incluyen las modificaciones de las cadenas laterales alquílicas, como las sustituciones con grupos alquilo (p.ej., metilo, dimetilo, etilo, etc.), modificaciones en el nivel de saturación o insaturación de cadenas laterales, y la adición de grupos modificados como fenilo y fenoxi sustituidos. Los derivados también pueden incluir conjugados, como restos biotina o avidina, enzimas como la peroxidasa del rábano y similares, y restos radiomarcados, bioluminiscentes, quimioluminiscentes o fluorescentes. Además, los restos se pueden añadir a los agentes descritos en la presente memoria para modificar sus propiedades farmacocinéticas, tal como para aumentar su vida media *in vivo* o *ex vivo*, o para aumentar sus propiedades para penetrar en las células, entre otras propiedades deseables. También se incluyen los profármacos, de los que se sabe que aumentan numerosas cualidades deseables de los fármacos (p.ej., solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.).

El término "derivado" también incluye dentro de su alcance modificaciones que se han hecho a una secuencia original que incluye adiciones, deleciones, y/o sustituciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes o mejoradas.

Según una realización específica de la invención, el derivado del Treprostinil se selecciona del grupo de derivados ácidos del Treprostinil, profármacos del Treprostinil, polimorfos del Treprostinil o isómeros del Treprostinil.

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

El término "células madres hematopoyéticas" (HSC) y el término más general "células madre" se entienden como términos equivalentes en la descripción de la presente invención, y se refieren de forma general a "células madre", bien pluripotentes, bien multipotentes que dan lugar a las estirpes de células sanguíneas, incluyendo las mieloides (p.ej., monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas), y linajes linfoides (p.ej., células T, células B, células NK), y otras conocidas por la técnica. Las "células madre" se caracterizan habitualmente por su habilidad para dar lugar a múltiples tipos celulares (es decir, por ser multipotentes) y por su capacidad para autoregenerarse. Sin embargo, los progenitores oligopotentes y unipotentes se pueden incluir también. "Hematopoyesis" se refiere en general al proceso de diferenciación celular o formación de células sanguíneas especializadas a partir de HSC. Durante el desarrollo, la hematopoyesis se traslada del hígado fetal a la médula ósea, que se mantiene como centro hematopoyético durante la edad adulta. Una vez establecidas en la médula ósea, las HSC no se distribuyen al azar dentro de la cavidad ósea. Más bien, las HSC se encuentran de forma característica en estrecha cercanía de la superficie endoósea. Las células madre más maduras aumentan en número conforme aumenta la distancia a la superficie del hueso.

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

La muestra que contiene HSC puede ser específicamente médula ósea.

Las HSC se pueden obtener por técnicas conocidas de cualquier fuente conocida que contenga HSC, específicamente de sangre periférica, cordón umbilical o sangre de cordón, placenta y médula ósea. De forma alternativa, también son

posibles el hígado fetal, el bazo fetal, y la aorta-gónada-mesonefro de animales como fuente de HSC. Se prefieren las HSC de origen humano para los métodos y composiciones de la invención.

Por ejemplo, las HSC se pueden encontrar en la médula ósea de adultos, lo que incluye fémur, cadera, costillas, esternón y otros huesos. Las HSC se pueden obtener extrayéndolas directamente de la cadera mediante el uso de una aguja y una jeringa, o de la sangre, frecuentemente tras el tratamiento previo con citoquinas, como el G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), que inducen la liberación de las células del compartimento de la médula ósea.

Las HSC se pueden identificar según ciertos marcadores fenotípicos o genotípicos. Por ejemplo, las HSC se pueden identificar por su pequeño tamaño, su falta de marcadores de linaje (lin), el bajo grado de tinción (subpoblación) con sondas vitales como la rodamina 123 (rho¹⁰) o el Hoechst 33342, y por la presencia de varios marcadores antigénicos en su superficie, muchos de los cuales pertenecen a las series de grupos de diferenciación (p.ej., CD5, CD11b, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4, Ter-119 y c-kit). Las HSC son fundamentalmente negativas para los marcadores que se usan habitualmente para detectar la determinación del linaje, y, por ello, se refieren habitualmente como células (lin⁻). La mayoría de HSC humanas se pueden caracterizar como CD5⁺, CD45R (B220)⁺, CD11⁺, GR-1⁺, CD34⁺, CD59⁺, Thyl/CD90⁺, CD38^{low}, c-kit/CD117⁺ y lin (-). Sin embargo, no todas las células madre se incluyen en esas combinaciones, dado que ciertas HSC son CD347⁺ y CD38⁺. Algunos estudios también sugieren que las células madre más tempranas pueden carecer de c-kit en su superficie.

Para la purificación de HSC que sean lin(-) mediante citometría de flujo, o FACS, se puede usar para la depleción las células lin(+) o progenitores multipotentes tardíos (MPP) el panel de anticuerpos de marcadores de linajes sanguíneos maduros, que incluye, por ejemplo, anticuerpos para CD3epsilon, CD5, CD45R, CD11b, CD16, GR-1, 7-4, y Ter-119, CD13, CD32 y CD33, CD71, CD19, CD61, Mac-1 (CD11b/CD18), Gr-1, 117Ra, CD3, CD4, CD5 y CD8, entre otros, conocidos por la técnica. Se conocen por la técnica métodos de purificación adicionales, por ejemplo, métodos que usan la caracterización específica mediante la familia de "moléculas de señalización de activación linfocitaria" (SLAM) de superficie celular.

Se pueden hacer crecer o expandir las HSC, ya sean de sangre de cordón, médula ósea, sangre periférica o de otra fuente, en cualquier medio adecuado, disponible de forma comercial o hecho a medida, con o sin suero. Las HSC de origen humano son realizaciones preferidas de la invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el medio sin suero puede usar albúmina y/o transferrina. Además, se pueden incluir citoquinas, como el ligando de Flt-3, el factor de células madre (FSC) y la trombopoyetina (TPO), entre otras. También se pueden crecer las HSC en recipientes como biorreactores. Un medio adecuado para la expansión de las HSC *ex vivo* también puede comprender células nodrizas para HSC, como las células estromales (p.ej., células estromales linforeticulares), que se pueden derivar, por ejemplo, de la disgregación del tejido linfóide, y para las que se ha demostrado que apoyan el mantenimiento *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, el crecimiento y la diferenciación de las HSC, así como su progenie.

"Sangre de cordón" o "sangre de cordón umbilical" se refiere en general a una cantidad relativamente pequeña de sangre (hasta aproximadamente 180 ml) de un bebé recién nacido que vuelve a la circulación neonatal. La sangre de cordón es rica en HSC y se puede extraer y almacenar para uso posterior según métodos conocidos por la técnica.

Los términos "*ex vivo*" o "*in vitro*" se refieren a actividades que tienen lugar fuera de un organismo, como la experimentación o las medidas realizadas en o sobre tejido vivo en un entorno artificial externo al organismo, preferiblemente con una alteración mínima de las condiciones naturales. En ciertas realizaciones, dichos tejidos o células se pueden recoger y congelar, y después descongelar para su tratamiento *ex vivo*. Los experimentos con cultivos de tejido o procedimientos que duran más de unos pocos días con uso de células o tejido vivos se consideran habitualmente como "*in vitro*", aunque este término se puede usar de forma intercambiable con *ex vivo*. Las técnicas "administración *ex vivo*", "tratamiento *ex vivo*" o "uso terapéutico *ex vivo*", se refieren de forma general a procedimientos médicos en los que se obtienen uno o más órganos, células o tejidos de un sujeto vivo o recientemente fallecido, purificados o enriquecidos de forma opcional, que se exponen a tratamientos o procedimientos para tratar las células madre (p.ej., una etapa de administración *ex vivo* que implica la incubación de las células con una composición de la presente invención para aumentar las capacidades para el injerto de las HSC), y que se administran entonces al mismo o a otro sujeto vivo después del tratamiento o procedimiento opcional.

Estas aplicaciones terapéuticas *ex vivo* pueden incluir también un tratamiento *in vivo* opcional o etapa de procedimiento, como la administración de una composición de la invención, una o más veces, al sujeto vivo tras la administración del órgano, células o tejido. Se contemplan tanto la administración local como la sistémica para estas realizaciones, según métodos bien conocidos por la técnica. La cantidad de Treprostnil o la cantidad de preparado que contiene Treprostnil y células madre estimuladas, junto con agentes adicionales, de forma opcional, administradas a un sujeto dependen de las características de ése sujeto, como son la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal, y la tolerancia a las drogas, así como el grado, severidad y tipo de reacción al Treprostnil y/o al trasplante de células.

Según una realización específica de la invención, se proporciona una composición que comprende un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, para uso en el tratamiento de individuos que son trasplantados con células madre hematopoyéticas.

- Según una realización preferida, la composición comprende un análogo de prostaciclina seleccionado del grupo del Treprostinil, Iloprost, Cicaprost o Beraprost o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, más específicamente, comprende Treprostinil. La composición de la invención puede comprender también Treprostinil junto con uno o más del grupo de Iloprost, Cicaprost, o Beraprost. Alternativamente, la composición puede comprender Iloprost en combinación con uno o más del grupo del Treprostinil, Cicaprost, Beraprost o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, la composición puede comprender Beraprost en combinación con uno o más del grupo del Treprostinil, Cicaprost o Iloprost o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, la composición puede comprender Cicaprost en combinación con uno o más del grupo del Treprostinil, Beraprost o Iloprost o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables.
- 5 Dichos sujetos pueden padecer cualquier enfermedad de la médula ósea, es decir, una enfermedad en donde se desplaza la arquitectura normal de la médula ósea por neoplasias, anemia aplásica, o infecciones que conllevan una disminución en la producción normal de células sanguíneas y plaquetas en sangre. Dicha enfermedad de la médula ósea puede ser, por ejemplo, leucemia, un defecto en el compartimento de células sanguíneas o la necesidad de trasplante de médula ósea después de un tratamiento con quimioterapia o con radioterapia.
- 10 Más específicamente, el defecto en el compartimento de células sanguíneas puede ser una hemoglobinopatía de tipo talasemia o defectos en la función de granulocitos neutrófilos o un defecto en la función de granulocitos neutrófilos.
- Se incluye también en la presente invención el uso para el tratamiento de individuos que padecen enfermedades de la médula ósea, por ejemplo, debidos a quimioterapia o radioterapia y por ello reciben un trasplante de células madre hematopoyéticas mediante la administración de al menos un análogo de prostaciclina por un periodo de tiempo limitado tras el trasplante de médula ósea.
- 20 Se incluye asimismo en la presente invención el tratamiento de individuos que reciben un trasplante de médula ósea usando al menos un análogo de prostaciclina, al menos un análogo de prostaciclina junto con uno o más, específicamente dos, más específicamente tres potenciadores del AMPc o una mezcla que comprende al menos uno, específicamente dos, más específicamente tres análogos de prostaciclina y células madre estimuladas, opcionalmente junto con agentes adicionales como uno o más potenciadores del AMPc.
- 25 Más específicamente, el potenciador del AMPc puede ser forskolina.
- Se puede usar al menos un análogo de prostaciclina para aumentar el injerto de HSC humanas durante los trasplantes de médula ósea o tras la reconstitución de la médula ósea mediante el uso de HSC. El injerto acelerado disminuye el periodo en el que los sujetos son susceptibles a infecciones potencialmente letales, sangrado y otras complicaciones de gravedad. Así, un análogo de prostaciclina debería ser una opción terapéutica útil para el tratamiento previo de la médula ósea del donante para aumentar el injerto de la médula ósea (es decir, mediante la reducción del número de células requeridas y la disminución de la duración de la aplasia de la médula ósea).
- 30 Específicamente, el análogo de prostaciclina se selecciona del grupo de Treprostinil, Iloprost, Cicaprost o Beraprost o de sales de los mismos farmacéuticamente aceptables. Más específicamente, Treprostinil es el análogo de prostaciclina preferido para uso.
- 35 El tratamiento continuo de sujetos durante varios días tras el trasplante de médula ósea con un análogo de prostaciclina debería dar lugar a una mejoría clínica por la mejora del trasplante (es decir, por la reducción del número de células requeridas y la disminución de la duración de la aplasia de la médula ósea).
- 40 Así, según una realización específica, el tratamiento se realiza al menos cinco días después del trasplante, más específicamente durante 10 días al menos, más específicamente, durante 14 días al menos tras el trasplante.
- Según una realización alternativa de la invención, se incluye una composición que comprende uno o más análogos de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, y células madre hematopoyéticas.
- 45 En ciertas realizaciones, de forma alternativa, se puede añadir a la composición un agente seleccionado entre un potenciador del cíclico AMP (AMPc) o un ligando del receptor EP para la prostaglandina. Según una realización específica, la composición de la invención puede comprender también forskolina.
- Las composiciones de la invención son, específicamente, composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones pueden contener excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables, tal como se conocen por la técnica.
- 50 La cantidad de análogo de prostaciclina depende de la terapia o método para la preparación de las HSC estimuladas. Muy específicamente, la cantidad efectiva de Treprostinil para aplicaciones terapéuticas es de al menos 1,0 ng/kg de peso corporal.
- La composición de la invención se puede administrar al sujeto mediante cualquier método aplicable y conocido por la técnica. Más específicamente, se proporciona la administración intravenosa o subcutánea.

Dicha composición puede ser una fórmula oral disponible seleccionada del grupo de fórmulas, comprimidos o cápsulas de liberación prolongada.

- 5 La descripción anterior se comprenderá más perfectamente en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son, sin embargo, meramente representativos de métodos para la práctica de una o más realizaciones de la presente invención y no deben ser entendidos como limitantes para el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Aislamiento de células madre de médula ósea

- 10 Se sacrificaron diez ratones (C57BL/6) mediante dislocación cervical. Los huesos largos de las extremidades inferiores (es decir, fémur y tibia) se limpiaron de músculo y tejido conjuntivo y se lavaron mediante una jeringa y una aguja de calibre 27½ con medio RPMI. El tejido conjuntivo visible se retiró de la suspensión celular, ésta se recogió y se transfirió a un tubo de centrifuga. Las células se recogieron mediante centrifugación (1.200 rpm/~100g durante 5 minutos) y se resuspendieron en 3 mL de solución de lisis de eritrocitos (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH ajustado entre 7,2 y 7,4). La suspensión celular se incubó durante 2 minutos a 20°C, seguido de 4 minutos en hielo. Después se añadieron 10 mL de RPMI y las células se recogieron por centrifugación y se contaron. El rendimiento típico fue de 3x10⁷ células por ratón.

- 20 Las células se resuspendieron en PBS (tampón fosfato salino) enfriado en hielo que contenía un 2% de FCS (suero fetal bovino), a una densidad de 2,5x10⁸ células por mL, a las que se añadió un cóctel de anticuerpos biotinilados (kit para depleción de linaje celular de Miltenyi Biotec) que contenía anticuerpos específicos de linaje dirigidos contra CD5, CD45R (B220), CD11b, GR-1 (=Ly-6G/C), 7-4 y Ter-119 en una proporción de 0,1 mL de solución de anticuerpo por cada 10⁸ células. Las células se incubaron durante 20 minutos en hielo con los anticuerpos y se precipitaron mediante centrifugación. Tras la resuspensión (3,3x10⁸ células por mL), se añadieron las microesferas recubiertas de anticuerpo secundario anti-biotina (0,2 mL por 10⁸ células), suministrado con el (kit para depleción de linaje celular de Miltenyi Biotec), a la suspensión celular y la mezcla se incubó durante 15 minutos en hielo. Después, la muestra se diluyó en tampón MACS (30 mL), las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 6 mL de tampón MACS. Esta suspensión se cargó en columnas LS preparadas previamente, que contienen esferas ferromagnéticas recubiertas con un material plástico compatible con las células. Se usaron tres columnas para este paso, de forma habitual (2 mL de suspensión celular por columna). La solución eluida contenía las células negativas para el marcador de linaje (células Lin⁻), mientras que las células de linaje comprometido se retuvieron en la columna. Las células se precipitaron mediante centrifugación y se resuspendieron en mL de PBS.

- 30 El rendimiento típico fue de fue de 7x10⁵ células Lin⁻ por ratón.

Análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

- 35 Los anticuerpos empleados para teñir los marcadores de superficie celular provenían de las siguientes fuentes: el panel de anticuerpos para linaje de ratón era de Becton Dickinson Biosciences (BD 559971, que contenía, como conjugados con biotina, anti-CD3ε, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-Ly-6G/Ly-6c, anti-Ter-119), el anticuerpo de rata purificado por afinidad anti-ratón CD16/CD32 (bloqueante para Fcγ_{1/II/III}, BD553142) y el colorante fluorescente alofococianina-Cy7-estreptavidina (estreptavidina APC-Cy7, BD 554063) eran también de Becton Dickinson Biosciences. El anti-ratón Ly6A/E marcado con ficoeritrina(PE)-Cy7 (antígeno de célula madre -1=Sca1) PE-Cy7 (número de catálogo 25-5981-82) y anti-ratón Pe-Cy5 CD117 (c-Kit) (número de catálogo 15-1171-811) eran de eBiosciences.

- 40 Después de la separación MACS, se transfirieron directamente 1x10⁶ células positivas (Lin⁺) y negativas (Lin⁻) para el linaje a tubos de FACS y se mantuvieron en 50 µl de PBS en hielo. Durante este tiempo, se diluyeron (1:50) y mezclaron en PBS los siguientes anticuerpos para FACS: anti CD16/CD32 purificado (para bloquear los receptores para Fc), anti-CD3ε biotinilado, anti-CD11b biotinilado, anti-CD45R biotinilado, anti-Ly-6G/Ly-6C biotinilado y anti-Ter-119 biotinilado, estreptavidina APC-Cy7, anti-Sca1-PE-Cy7, anti-c-Kit-PE-Cy5. Esa mezcla madre se añadió a cada muestra (50 µL), que se mezcló entonces mediante vórtex suave y se incubó a 4°C durante 15 minutos en la oscuridad. Después, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en 2 mL de PBS y se resuspendieron en PBS. Las muestras se analizaron en un FACS Canto II (Becton Dickinson). El procedimiento de identificación fue como sigue:
- 50 los parámetros de identificación ("gate") para las células vivas se ajustaron mediante el registro del tamaño y complejidad de la muestra (FSC y SSC). Las células vivas se discriminaron además en base a la expresión de los marcadores de linaje (es decir, CD11b, CD45R, Ly-6G/Ly-6C, Ter-119). Esto permitió definir los "gates" para las células Lin⁻, que fueron analizadas además para la expresión de Sca-1 y c-Kit.

Ensayo de acumulación de AMPc^[3H]

Se incubaron las células Lin⁻/sca1⁺ en 1 mL de medio para células madre (Stem Span SFEM, Sten Cell Tech #09650) que contenía bencilpenicilina y estreptomina a 0,5 mg/L, bencilpenicilina y estreptomina, 50 ng/mL cada una, factor de célula madre murino (mSCF), Flt-3 humana y interleuquina-11 humana (hIL-11) a 50 ng/mL cada una, interleuquina 3 de ratón (m-IL3, 10 ng/mL) (todas de PreProTech), adenosina desaminasa a 10 µg/mL (Roche) y adenina [³H] (Perkin Elmer, 1 µCi/mL). La incubación previa duró 4 h a 37°C. Después se estimularon las células con los compuestos (forskolina, Treprostinil y otros prostanoides; toxina colérica) durante 1 h. A continuación, se precipitaron las células (5 minutos a 100g), se retiró el medio y el precipitado se lisó en ácido perclórico al 2,5% enfriado en hielo (0,9 mL) que contenía 0,1 mM de AMPc, se mantuvo en hielo durante 1 h y se neutralizó con KOH 4,2 M (0,1 mL). Se incubaron previamente, de igual forma, las células positivas para los marcadores de linaje, pero el medio contenía RPMI en vez de medio para células madre sin suero. Se separaron el ATP y el AMPc por cromatografía de forma secuencial en columnas que contenían Dowex AG50-X8 y alúmina neutra (12).

El hecho de que las diferencias sólo puedan ser observadas en presencia de forskolina es un problema técnico -la señal es demasiado baja en ausencia de sensibilización por forskolina para ver cualquier diferencia entre los distintos compuestos, es decir, Beraprost y Treprostinil. Sensibilización significa que las células se han sensibilizado para la respuesta al receptor, ya que estas células contienen una cantidad extremadamente baja de AMPc.

Según la curva de concentración-respuesta (Figura 5) para Treprostinil, se puede observar claramente que el incremento de AMPc es significativo sin la adición de forskolina.

Trasplante de médula ósea:

Se sometió a irradiación letal a los ratones isogénicos receptores. Estos ratones mueren durante las dos semanas siguientes si no se les rescata mediante administración intravenosa de células madre hematopoyéticas. Se prepararon las células madre hematopoyéticas Lin⁻ (Sca1⁺ y c-Kit⁺) tal como se describe arriba y se trataron *ex vivo* previamente en ausencia o presencia de 10 µM de Treprostinil, de la combinación de Treprostinil y 30 µM de forskolina (FSK), de 10 µg/mL de toxina colérica durante 1 h a 37°C. Después, se inyectaron las células (3x10⁵ por ratón) en la vena de la cola. El recuento de glóbulos blancos se determinó mediante FACS. Se determinaron los números de serie blanca cada 5 días, empezando por el día 9 (en el que el recuento de glóbulos blancos era ≈1G/L).

Resultados

Purificación de células madre hematopoyéticas

El procedimiento basado en MACS retiene a las células positivas para los marcadores de linaje (Lin⁺) en las esferas magnéticas y permite la recuperación de las células negativas para los marcadores de linaje (Lin⁻). Se caracterizó la naturaleza de la población celular mediante FACS. Además, la población celular retenida por MACS se enriqueció en células que se tiñeron para marcadores específicos de linaje y que carecían del receptor de células madre c-Kit/CD117 (figura 1).

En cambio, las células que se recuperaron de la solución eluida de la columna se localizaron en el cuadrante superior izquierdo; es decir, que mostraron niveles elevados de c-Kit y se deplecionaron de fluorescencia APC-Cy7-A, lo que era indicativo de depleción de marcadores de linaje (figura 2).

Se evaluaron, además, las poblaciones celulares mediante la tinción para ambos, c-Kit y Sca-1 (antígeno de célula madre-1): las células positivas para el linaje carecían de estos dos marcadores (Figura 3A), mientras que la fracción negativa para el linaje expresaba niveles elevados de c-Kit o de la combinación de c-Kit y Sca-1 (figura 3B).

Acumulación de AMPc en células c-Kit⁺ y Sca1⁺

Se marcó metabólicamente con adenina [³H] el reservorio de nucleótidos de adenina de las células madre hematopoyéticas (población c-Kit⁺ y Sca-1⁺, ver figura 3B) y se examinó su respuesta al Treprostinil y a otros agonistas para el receptor para prostaglandinas. Se sensibilizó la enzima mediante el uso de forskolina, dado que estas células presentan una respuesta muy modesta de AMPc. Este diterpeno se une en la hendidura para el pseudosustrato localizado entre los dominios catalíticos C1 y C2 y da lugar a varias de las isoformas de la enzima más sensibles a la proteína Gαs estimuladora (13-15). Como se puede ver en la figura 4, Treprostinil, Beraprost e Iloprost causaron *per se* una acumulación modesta de AMPc, que fue comparable en magnitud a la inducida por forskolina a 30 µM. Sin embargo, cuando se combinó con forskolina, el Treprostinil causó un aumento en los niveles de AMPc que excedió los causados por Iloprost y Beraprost, compuestos específicos para el receptor IP (prostanoides I). Esto se puede racionalizar si se tiene en cuenta la acción del Treprostinil sobre los receptores EP (prostanoides E) (10). El Treprostinil causó una acumulación de AMPc dependiente de concentración en el intervalo de 0,1 a 1,0 µM (figura 5). La EC₅₀ se estimó en el intervalo de 0,3 µM. El Treprostinil no fue capaz de aumentar los niveles de AMPc en la fracción de células hematopoyéticas Lin⁺ (no se muestran los datos).

Reconstitución de la médula ósea por células hematopoyéticas (Lin⁻, c-Kit⁺, Sca⁺)

Se rescataron ratones irradiados de forma letal mediante la inyección intravenosa de 3x10⁵ células Lin⁻, c-Kit⁺, Sca1⁺. EL recuento de glóbulos blancos comenzó a aumentar desde el punto más bajo a día 9 y aumentaron lentamente

durante las siguientes semanas. Se eligió el nivel de glóbulos blancos a día 60 tras la inyección de las células madre hematopoyéticas como el punto de finalización relevante dado que, después de 60 días, las células de serie blanca circulantes sólo se pueden producir a partir del injerto de células madre hematopoyéticas. Como se puede ver en la figura 6, los ratones que se inyectaron con células madre hematopoyéticas tratadas previamente con Treprostinil tenían niveles significativamente mayores de células de serie blanca circulantes que aquellos que recibieron células madre hematopoyéticas tratadas con vehículo ($p < 0,05$, prueba t no pareada).

Como controles adicionales, los animales se inyectaron con

- (i) células tratadas con toxina colérica, porque es el activador de Gas más efectivo y persistente
- (ii) forskolina, porque, como se menciona arriba, activa directamente las isoformas de la adenilato ciclasa
- (iii) la combinación de forskolina y Treprostinil

Es evidente que el Treprostinil fue tan efectivo como el control positivo con toxina colérica, que se estableció como manipulación efectiva *ex vivo* (12).

Ejemplo 2

Aislamiento de células madre de médula ósea

Se sacrificaron ratones C57BL/6 o C6SjL y las células madre de médula ósea se aislaron tal como se describe en el ejemplo 1.

Tratamiento *in vitro* previo de células madre aisladas

Se trataron de forma previa las células madre de médula ósea de ratones C57BL/6 o C6SjL con toxina colérica (CTX) o Treprostinil+ forskolina *in vitro* (FSK) y se marcaron las células madre con Ly5.2 o Ly5.1.

En un primer experimento, se usaron sin tratamiento previo las células madre de médula ósea de ratones C57BL/6 y las células madre se marcaron con Ly5.2. Se trataron de forma previa las células madre de médula ósea de C6JL con toxina colérica (CTX) o Treprostinil+forskolina *in vitro* y se marcaron las células madre con Ly5.1.

Para estudios comparativos, se introdujo una mezcla 1:1 de células Ly5.1+ y Ly5.2+ en ratones mediante trasplante de médula ósea y se midió la proporción inicial de células positivas en sangre. Se midió el crecimiento de las células tras 16 semanas después del trasplante de médula ósea. Los resultados se muestran en la figura 7, en donde se muestra claramente que las células tratadas previamente con Treprostinil/FSK (Ly5.1+) muestran un aumento del crecimiento significativo, comparado con las células no tratadas y las células tratadas previamente con CT.

En un segundo experimento, se trataron previamente las células madre de médula ósea de C57BL/6 con toxina colérica o Treprostinil y forskolina *in vitro* y se marcaron las células madre con Ly5.2. Se usaron sin tratamiento alguno las células madre de médula ósea de ratones C6JL, marcadas con Ly5.1.

De nuevo, para estudios comparativos, se introdujo una mezcla 1:1 de células Ly5.1+ y Ly5.2+ en ratones mediante trasplante de médula ósea y se midió la proporción inicial de células Ly5.1 y Ly5.2 positivas en sangre. Se midió el crecimiento de las células tras 16 semanas después del trasplante de médula ósea. Los resultados se muestran en la figura 8, en donde se demuestra de nuevo claramente que las células tratadas previamente con Treprostinil/FSK (Ly5.2+) muestran un aumento del crecimiento significativo, comparado con las células no tratadas y con las células tratadas previamente con CT. Así, se puede demostrar que el efecto del Treprostinil y la forskolina es independiente del origen de las células de médula ósea.

Por ello, una combinación de Treprostinil y forskolina aumenta el injerto de células madre hematopoyéticas y es tan efectivo o aún más que el tratamiento previo con toxina colérica.

Referencias

1. Adams GB, Alley IR, Chung UI, Chabner KT, Jeanson NT, Lo Celso C, Marsters ES, Chen M, Weinstein LS, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT (2009) Haematopoietic stem cells depend on Gas-mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* 459:103-107 .
2. Dexter TM, Whetton AD, Heyworth CM (1985) Inhibitors of cholera toxin-induced adenosine diphosphate ribosylation of membrane-associated proteins block stem cell differentiation. *Blood* 65:1544-1548 .
3. Long MW, Heffner CH, Gragowski LL (1988) Cholera toxin and phorbol diesters synergistically modulate murine hematopoietic progenitor cell proliferation *Exp Hematol.* 16:195-200 .
4. Freissmuth M, Gilman AG (1989) Mutations of G α designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG187 result in loss of GTPase activity. *J Biol Chem* 264:21907-21914

5. Aksentijevich I, Flinn I (2002) Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. *Cancer Biother Radiopharm* 17:399-403 .
6. Awedan AA (2002) High intensity regimens with autologous hematopoietic stem cell transplantation as treatment of multiple myeloma. *Ann Transplant* 7:38-43 .
- 5 7. North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, Weber GJ, Bowman TV, Jang IH, Grosser T, Fitzgerald GA, Daley GQ, Orkin SH, Zon LI (2007) Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447:1007-1011 .
8. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 113:5444-5455 .
- 10 9. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, Zon LI (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136:1136-1147 .
10. Aronoff DM, Peres CM, Serezani CH, Ballinger MN, Carstens JK, Coleman N, Moore BB, Peebles RS, Faccioli LH, Peters-Golden M (2007) Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol* 178:1628-1634 .
- 15 11. Kiriya M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, and Narumiya S (1997) Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 122:217-224
12. Johnson RA, Alvarez, R, Salomon, Y. (1994) Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double chromatographic procedures. *Methods in Enzymology* 238:31-56
- 20 13. Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* 278: 1907-1916 .
14. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461-480 .
- 25 15. Kudlacek O, Mitterauer T, Nanoff C, Hohenegger M, Tang WJ, Freissmuth M, Kleuss C (2001) Inhibition of adenylyl and guanylyl cyclase isoforms by the antiviral drug foscarnet. *J Biol Chem* 276:3010-3016
16. Otsuka H. et al., The prostacyclin analog beraprost sodium augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by autologous bone marrow cells, *A...Vasc.Surg*, 2006, 20:646-652
- 30 17. Madonna R., "Prostacyclin improves transcronary myocardial delivery of adipose tissue-derived stromal cells", *Europ. Heart Journ.*, 2006, Vol. 27, No. 17, 2054-2061
18. Ishii M. et al., "Mesenchymal stem cell-based gene therapy with prostacyclin synthase enhanced neovascularisation in hindlimb ischemia", 2009, Vol. 206, No. 1, 109-118
- 35 19. Crutchley D. J. et al., "Effects of prostacyclin analogs on the synthesis of tissue factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 β in human monocytic THP-1 cells", *J.. Pharma. and Exp. Therap*, 1994, Vol. 271, No. 1, 446-451

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la capacidad de injerto de células madre hematopoyéticas (HSC) mediante un tratamiento previo ex vivo de las HSC que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. mezclar al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, a una muestra que contiene células madre hematopoyéticas para obtener una mezcla,
 - b. incubar dicha mezcla durante un periodo de tiempo suficiente para estimular la señalización de G alfas en dichas células y, opcionalmente,
 - c. aislar dichas células estimuladas.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en donde dicho análogo de prostaciclina se selecciona del grupo de Treprostinil, Iloprost, Cicaprost y Beraprost o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables.
3. Un método según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho análogo de prostaciclina es Treprostinil, específicamente dicho Treprostinil es un derivado de Treprostinil seleccionado del grupo de derivados ácidos de Treprostinil, profármacos de Treprostinil, polimorfos de Treprostinil e isómeros de Treprostinil.
- 15 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha muestra es médula ósea.
5. Una composición que comprende al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, para uso en el tratamiento de individuos que necesitan un trasplante de médula ósea, que padecen leucemia o un defecto del compartimento de células sanguíneas o enfermedades de la médula ósea inducidas por quimioterapia o radioterapia.
- 20 6. Una composición para uso según la reivindicación 5, en donde dicho análogo de prostaciclina se selecciona del grupo de Treprostinil, Iloprost, Cicaprost y Beraprost o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables.
7. Una composición para uso según las reivindicaciones 5 ó 6, en donde dicho análogo de prostaciclina es Treprostinil, preferiblemente un derivado de Treprostinil seleccionado del grupo de derivados ácidos de Treprostinil, profármacos de Treprostinil, polimorfos de Treprostinil e isómeros de Treprostinil.
- 25 8. Una composición para uso según la reivindicación 5, en donde dicho defecto del compartimento de células sanguíneas es hemoglobinopatía o un defecto en la función de granulocitos neutrófilos.
9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para uso en el tratamiento de individuos que necesitan un trasplante de médula ósea, que padecen leucemia o un defecto del compartimento de células sanguíneas o enfermedades de la médula ósea inducidas por quimioterapia o radioterapia, mediante administración de un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, durante 7 días al menos, preferiblemente durante 10 días al menos, preferiblemente durante 14 días al menos, después del trasplante de médula ósea.
- 30 10. Una composición que comprende al menos un análogo de prostaciclina junto con un agente activante de AMPc inespecífico, seleccionado preferiblemente entre toxina colérica y forskolina, y células madre hematopoyéticas estimuladas.
- 35 11. Una composición según la reivindicación 10, que es una composición farmacéutica.
12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 para administración intravenosa o subcutánea.
13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células madre son derivadas de sangre de cordón, médula ósea de donante o placenta.

40

Figura 2

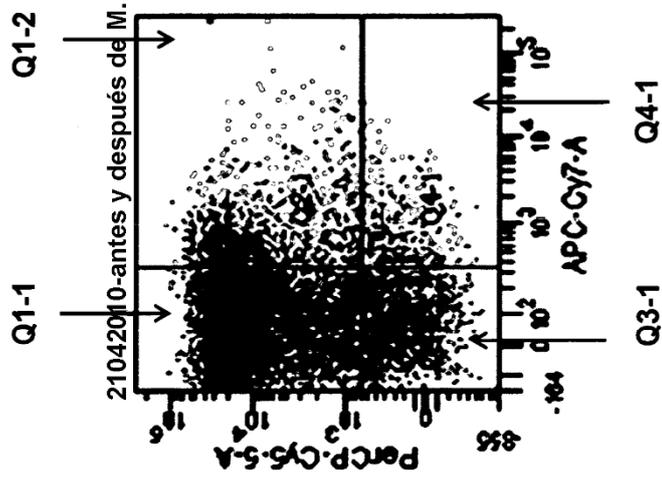
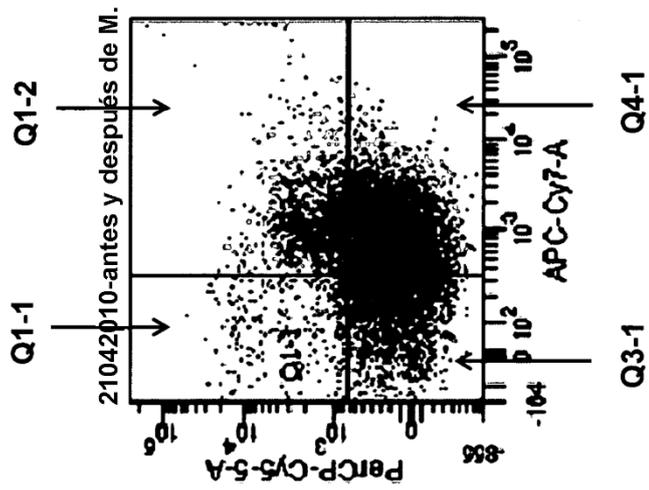


Figura 1



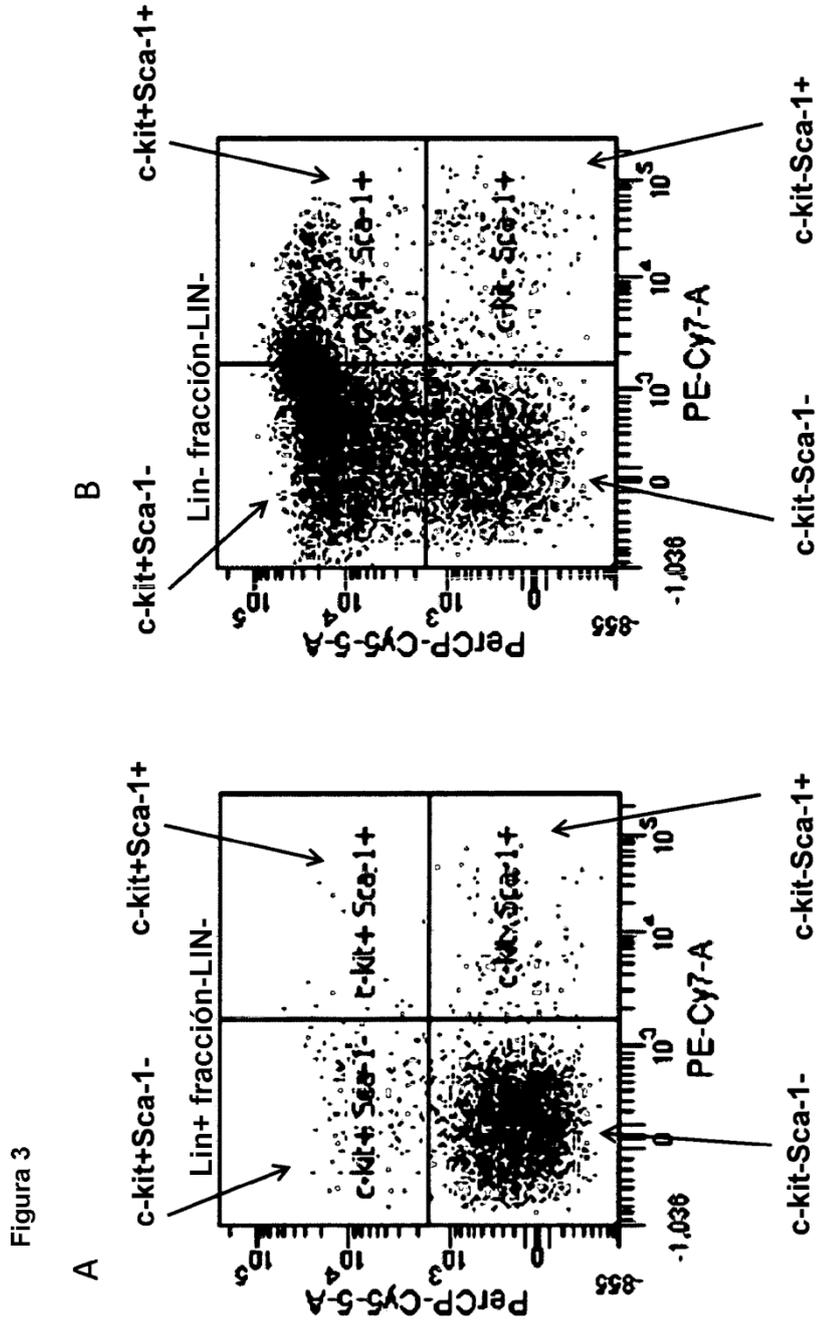


Figura 4

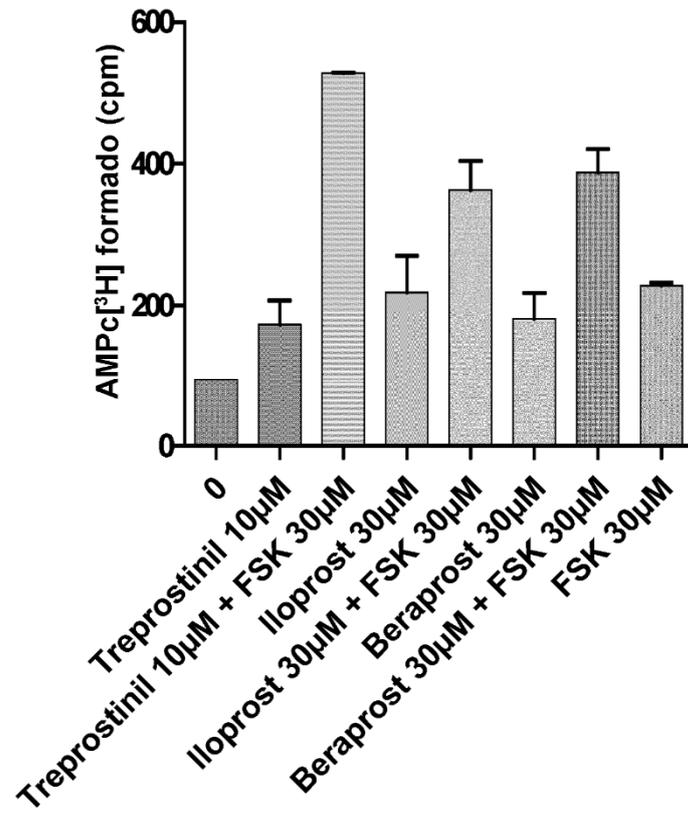


Figura 5

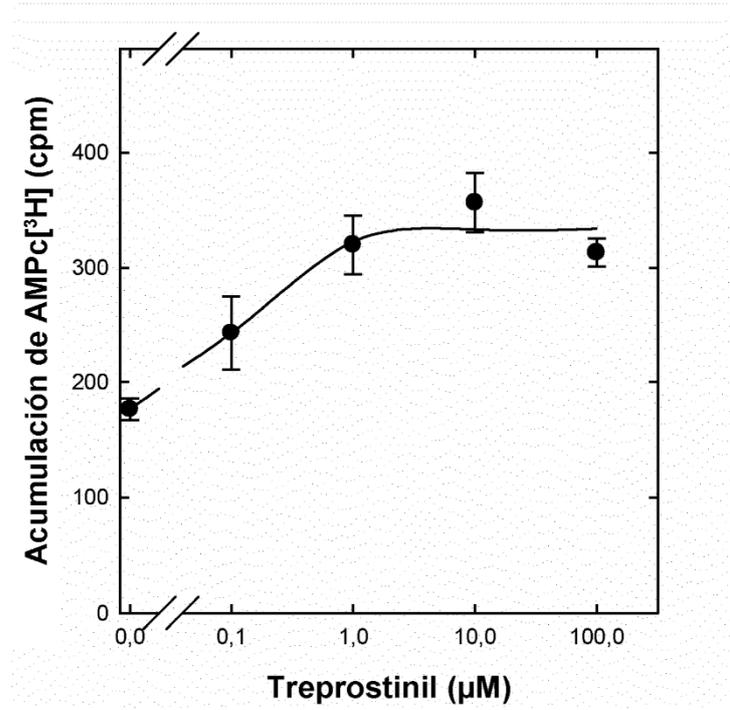


Figura 6

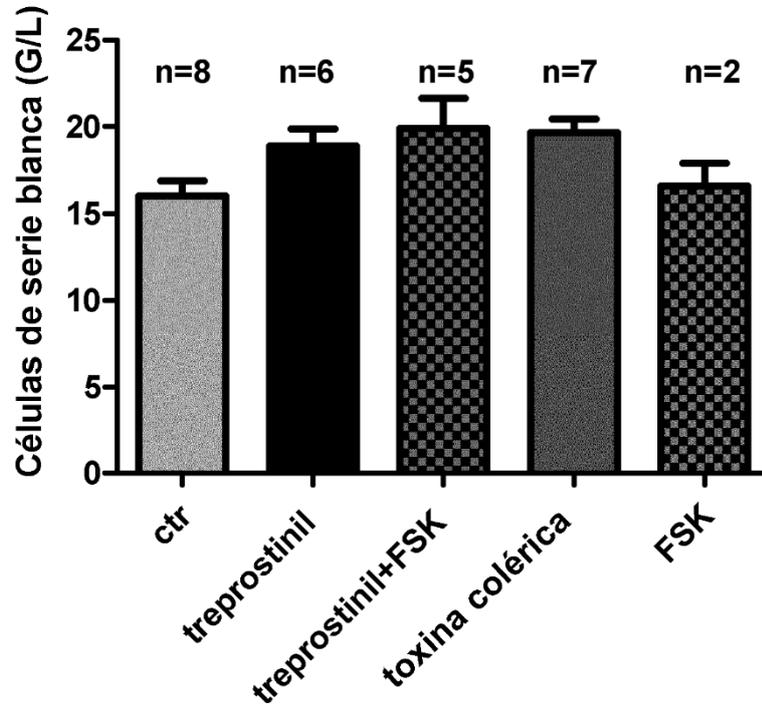


Figura 7

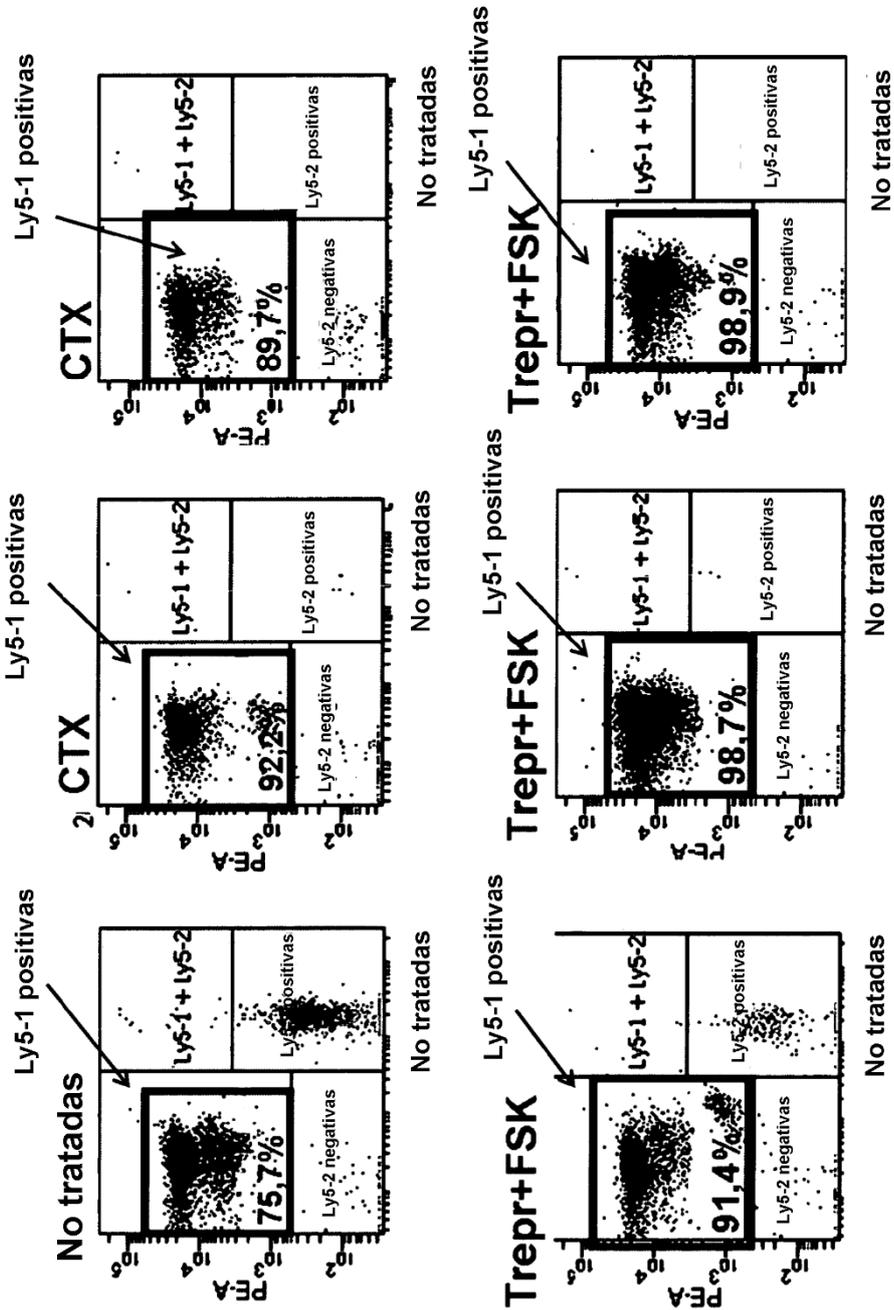


Figura 8

