



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 193**

51 Int. Cl.:
A61K 38/27 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01960261 .4**
96 Fecha de presentación : **01.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1286689**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2003**

54 Título: **Hormona de crecimiento humano para estimular la movilización de células madre hematopoyéticas pluripotentes.**

30 Prioridad: **07.06.2000 EP 00111834**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2009

73 Titular/es: **Merck Serono S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH

72 Inventor/es: **Gianni, Alessandro, Massimo**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 330 193 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

Hormona de crecimiento humano para estimular la movilización de células madre hematopoyéticas pluripotentes.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al uso de la hormona del crecimiento y sus derivados para la fabricación de un medicamento para aumentar el número de células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis, en particular para aumentar el número de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC).

10 La invención se refiere además al uso de una combinación de la hormona del crecimiento y el G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) para aumentar el número de células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*.

15 **Antecedentes de la invención**

El trasplante de médula ósea (BMT) es un procedimiento clínico en el que células hematopoyéticas pluripotentes obtenidas a partir de la médula ósea son transplantadas a un paciente. El BMT es el tratamiento de elección en varios trastornos hematológicos, incluyendo los tumores malignos, inmunodeficiencias combinadas severas (SCID), 20 anomalías hematopoyéticas establecidas congénitamente o genéticamente, anemia, anemia aplásica, leucemia y osteopetrosis (Fischer *et al.*, 1998). En los últimos diez años, el uso del BMT ha aumentado desde menos de 5.000 hasta más de 40.000 anualmente (Waters *et al.*, 1998).

Las células madre primitivas o pluripotentes usualmente residen en la médula ósea, donde generan una progenie de 25 células madre pluripotentes (auto-renovación) o células progenitoras dedicadas (células formadoras de colonias), que están destinadas a producir solamente uno o algunos tipos de células sanguíneas. Las células madre se pueden dividir en general en células madre linfoides, que dan origen a las células T y B, y células madre mieloides, que dan origen a diferentes tipos de linfocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos (Alberts *et al.*, "Molecular Biology of the Cell", 3rd edition 1994).

30 Las células progenitoras hematopoyéticas primitivas usualmente expresan sobre su superficie el antígeno CD34, que es el marcador "clásico" de las células progenitoras primitivas que tienen el potencial de auto-renovación indicado antes y la capacidad de generar células formadoras de colonias así como las células sanguíneas (véase, por ejemplo, Haas and Murea, 1995 o Lemoli *et al.*, 1998).

35 En condiciones de equilibrio, la mayoría de las células madre y células progenitoras hematopoyéticas residen en la médula ósea y sólo un pequeño número de estas células son detectables en la sangre periférica. Sin embargo, se pueden movilizar células madre adicionales a la sangre periférica por tratamiento con agentes mielodepresivos y/o ciertos factores de crecimiento hematopoyéticos (Van Hoef, 1998). Algunos estudios han demostrado que las células madre 40 de la sangre periférica (PBSC) infundidas en un hospedante presentan un mejor potencial para injerto en comparación con las células madre y células progenitoras derivadas de la médula ósea (Gianni *et al.*, 1989; Larsson *et al.*, 1998). Por tanto, las PBSC movilizadas por la quimioterapia, los factores de crecimiento hematopoyéticos o la combinación de estas modalidades se usan habitualmente en los casos de trasplantes autólogos y no autólogos (Van Hoef, 1998; Anderlini and Korbling, 1997). En el caso de trasplante no autólogo, los donantes de células madre son individuos 45 normales y el procedimiento para la movilización de las células madre al torrente sanguíneo se tiene que conseguir con mínimas molestias. En este caso, la movilización de las células madre con factores de crecimiento hematopoyéticos es preferible al tratamiento con fármacos antiblasticos (esto es, ciclofosfamida).

Varios factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como G-CSF, EPO y CSF han sido estudiados como agentes 50 movilizantes y se utilizan habitualmente para aumentar el número de las PBSC antes de la leucocitaféresis (Henry, 1997; Weaver and Testa, 1998). La leucocitaféresis, también llamada aféresis, es un método por el que las células hematopoyéticas se recuperan a partir del donante. Los tratamientos dedicados a estimular la hematopoyesis global pueden ser de gran interés para movilizar un gran conjunto de células progenitoras y células madre. El aumento de la movilización de las células madre es extremadamente valioso en el contexto de los trasplantes de células madre 55 hematopoyéticas por reducir el número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células madre hematopoyéticas para ser transplantadas.

Kotzmann *et al.* (1996) estudiaron la influencia de la hormona del crecimiento sobre las células progenitoras eritroides y mieloides y sobre las células de la sangre periférica en pacientes deficientes en hGH en una terapia de 60 sustitución de hGH a largo plazo. La cantidad de dichas células fue monitorizada antes de la administración de hGH, y a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses después de la administración de hGH. No se observó ningún aumento significativo en células precursoras progenitoras eritroides y mieloides hasta después de 18 y 24 meses de terapia. La hGH sólo tuvo efectos insignificantes sobre las células de la sangre periférica a lo largo de todo el periodo de tiempo. Estos hallazgos demostraron por tanto que la hGH no tiene ningún efecto a corto plazo sobre las células progenitoras hematopoyéticas. Además, se debe sacar la conclusión de que el efecto indicado de la hormona del crecimiento sobre las células 65 progenitoras hematopoyéticas no se puede explotar en una situación en la que se necesita un gran número de células progenitoras hematopoyéticas en un corto periodo de tiempo.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un nuevo uso de la hormona del crecimiento. Más específicamente, se refiere al uso de la hormona del crecimiento y sus derivados para la fabricación de un medicamento para aumentar el número de células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis, *para proporcionar dichas células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica en una cantidad suficiente para el trasplante autólogo en un paciente que necesite un trasplante hematopoyético*, por ejemplo, en un ser humano. En particular, la invención se refiere al uso de una combinación de la hormona del crecimiento y el G-CSF para este propósito. La invención se refiere además a usos para explotar dicho uso de la hormona del crecimiento o de la combinación de la hormona del crecimiento y el G-CSF.

Descripción de la invención

El primer aspecto de la invención se refiere al uso de la hormona del crecimiento como un agente movilizador para aumentar el número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* en un individuo. Las células contempladas según la invención son células pluripotentes que circulan en la sangre periférica. Las células son CD34 negativas, esto es carecen del marcador de la superficie celular que ha sido tradicionalmente asociado con el subconjunto de las células progenitoras hematopoyéticas pluripotentes, primitivas.

El nuevo agente movilizador de la invención es la hormona del crecimiento y especialmente la hormona del crecimiento humana (hGH) y sus derivados.

A menos que se indique otra cosa, el término “GH” significa hormona del crecimiento o uno de sus derivados dentro del contexto de la invención.

Se ha encontrado ahora que, por la administración de la hormona del crecimiento y especialmente la hormona del crecimiento humana (hGH) o uno de sus derivados, se obtiene una movilización de células progenitoras CD34 negativas en la sangre periférica. Estas células son capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, esto es generar células sanguíneas cuando se reinfunden o transplantan en un ser humano. También son capaces de generar una progenie de células cuando se ponen en cultivo celular, teniendo también toda o parte de la progenie de células un potencial hematopoyético. El término células progenitoras CD34 negativas “pluripotentes” o “primitivas” como se usa aquí, engloba todas las células madre hematopoyéticas CD34 negativas que tienen un potencial de auto-regeneración y/o el potencial para generar diferentes tipos de células de la médula ósea o de células sanguíneas. Por tanto, estas células se pueden usar para reconstituir, construir, suplementar o contribuir al sistema hematopoyético en un individuo (“*in vivo*”), después de haber sido administradas al individuo. Alternativamente, se pueden usar para regenerar las células hematopoyéticas o las células sanguíneas en cultivo celular (“*in vitro*”).

La hormona del crecimiento, especialmente la hormona del crecimiento humana (hGH) y sus derivados, administrada sola o en combinación con otros factores, representa un nuevo uso para movilizar estas células *in vivo* a partir de la médula ósea hacia la sangre periférica. A partir de la sangre periférica, las células pueden ser recuperadas por leucocitaféresis, por ejemplo, y ser almacenadas o cultivadas *in vitro* para la expansión o generación de las células progenitoras, que son capaces de reconstituir la hematopoyesis después de un trasplante a un individuo.

Cuando las células progenitoras CD34 negativas se ponen en cultivo celular, estas células crecen o proliferan cuando se someten a las condiciones correctas, para generar más células pluripotentes o células dedicadas o células formadoras de colonias o cualquier otro tipo de células capaces de reconstituir la hematopoyesis *in vivo*. La progenie de las células se puede usar entonces para reconstituir las células de la médula ósea o las células sanguíneas en un paciente, como, por ejemplo, en un individuo, que sido sometido a terapia mieloablativa.

Durante el cultivo *in vitro*, las células progenitoras CD34 negativas pueden convertirse en células CD34 positivas. La presencia o ausencia del antígeno CD34 sobre la superficie de las células se puede analizar utilizando un anticuerpo específico anti CD34 por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, ELISA de FACS. Se puede analizar además por otros métodos bien conocidos en la técnica, como RT-PCR o similares.

La hormona del crecimiento humana (hGH), conocida también como somatotropina es una hormona proteínica producida y segregada por las células somatotrópicas de la hipófisis anterior. La hGH desempeña un papel clave en el crecimiento somático a través de sus efectos sobre el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y lípidos. En adición a sus efectos sobre el crecimiento somático, se ha demostrado que la hGH estimula las células sanguíneas *in vitro* (Derfalvi *et al.*, 1998; Merchav *et al.*; 1988), para aumentar los recuentos de eritrocitos y hemoglobina (Valerio *et al.*, 1997; Vihervuori *et al.*, 1996), para mejorar tanto la proliferación como la producción de Ig (inmunoglobulina) en las líneas de células plasmáticas (Kimata and Yoshida, 1994) y para estimular los recuentos de células CD8⁺ y, en menor medida los recuentos de células CD4⁺ (Geffner, 1997).

Los usos de la invención utilizando el agente movilizador según la invención tienen varias ventajas:

Usualmente hay un número bajo de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis. Este número se considera insuficiente para proporcionar una dosis de células que sea adecuada para una transferencia de células, por leucocitaféresis simple o múltiple en un periodo de tiempo razonable. Esta situación se agrava en los “movilizadores

ES 2 330 193 T3

bajos”. Los pacientes se clasifican como movilizadores bajos si tienen menos de aproximadamente 10 células CD34+ por μl de sangre y/o pacientes que tienen menos de 3×10^6 células CD34+ por kg de peso corporal.

Los usos de la invención resuelven este problema mediante una periferalización temporal de dichas células y subconjuntos en la sangre circulante que lleva a un importante aumento de la cantidad de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* en la sangre, minimizando de este modo el número de leucocitaféresis necesarias para conseguir una dosis de injerto.

Otras ventajas de los usos de la invención incluyen la posibilidad de:

- a) evitar la necesidad de anestesia general,
- b) efectuar la recogida incluso si los huesos iliacos están dañados por radioterapia previa o si están infiltrados con células malignas,
- c) conseguir la restauración de las funciones hematopoyéticas sostenidas más rápidamente que con las células progenitoras derivadas de la médula ósea.
- d) conseguir la restauración de las funciones hematopoyéticas sostenidas más rápida y efectivamente que sin un pre-tratamiento que incluye un método o un uso de la invención.

Generalmente, los usos de la invención son eficaces y seguros para movilizar a las células de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*.

Los usos de la invención no son tóxicos según los principales parámetros de toxicidad que son por ejemplo, el crecimiento del tumor, síntomas clínicos e instrumentales (parámetros clínicos, o análisis de laboratorio para la función cardíaca, hepática y renal).

El aumento de la movilización o la periferalización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* obtenido con los usos de la invención son extremadamente valiosos en los trasplantes de células madre hematopoyéticas al reducir el número de leucocitaféresis requeridas para recoger una cantidad suficiente de células hematopoyéticas para ser transplantadas.

Los usos de la invención llevan también a una reducción del volumen de sangre requerido para ser procesado durante el procedimiento de aféresis o leucocitaféresis con el fin de obtener el objetivo especificado del número de células. Las ventajas de procesar un volumen reducido de sangre son que el paciente está menos tiempo en la máquina separadora de células, lo que reduce la toxicidad del procedimiento, particularmente en términos del volumen de anticoagulante al que se debe exponer el paciente durante el procedimiento, lo que reduce el tiempo de la máquina y del operador.

Además, el trasplante de una población de células sanguíneas enriquecidas con células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, cuya población se obtiene a partir de la sangre periférica mediante los usos de la invención, tiene el efecto de mejorar la reconstitución de los sistemas hematopoyético e inmunitario del receptor después de terapias mieloablativas o antitumorales.

En un primer aspecto, la invención se refiere al uso de la hormona del crecimiento humana o de uno de sus derivados para la fabricación de un medicamento para aumentar *en un paciente que necesite la regeneración hematopoyética* el número de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica, capaces de reconstituir la hematopoyesis *in vivo*, para proporcionar dichas células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica en cantidad suficiente para un trasplante autólogo.

El término “aumentado” o “aumento” o “enriquecido” generalmente significa en el contexto de la invención que el parámetro (número) “aumentado” o “enriquecido” tiene un valor que está por encima del valor estándar de este parámetro. El valor estándar del parámetro se mide en un cuerpo o en una muestra de un cuerpo que no ha recibido ningún agente movilizador de células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*.

En una realización preferida, las células CD34 negativas pluripotentes son las células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC).

Las LTC-IC son un subconjunto de células madre hematopoyéticas raras, muy primitivas que tienen la capacidad de producir grandes cantidades de progenie madura durante periodos de tiempo prolongados (Petzer *et al.*, 1996, Sutherland *et al.*, 1994). En los tejidos hematopoyéticos adultos, usualmente sólo hay una pequeña población de estas células totipotentes. Este tipo de células hematopoyéticas muy precoces se puede detectar y cuantificar utilizando el ensayo de las células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) que mide su capacidad para generar células formadoras de colonias granulopoyéticas, eritropoyéticas, y pluripotentes después de 5 semanas en cultivos que contienen una capa alimentadora de células adherentes de la médula humana normal o fibroblastos murinos competentes (Petzer *et al.*, 1996). Las células se denominan por tanto LTC-IC.

ES 2 330 193 T3

La LTC-IC es capaz de regenerar todos los diferentes compartimentos linfoides y mieloides después de su transplante a receptores sometidos a mieloablación y puede generar progenie con las mismas propiedades totipotentes.

5 Como se muestra en los ejemplos que siguen, se ha encontrado ahora que se puede recuperar un número elevado de LTC-IC mediante el tratamiento de leucocitaféresis utilizando hGH o, preferiblemente, hGH y G-CSF. Al menos una porción de las LTC-IC pueden ser negativas para el antígeno CD34. La posibilidad de recuperar células LTC-IC representa un importante progreso, ya que estas células son capaces de reconstituir la hematopoyesis cuando se transplantan a un paciente que puede carecer de un sistema hematopoyético en funcionamiento o cuyo sistema hematopoyético haya sido destruido por radioterapia o quimioterapia, por ejemplo. También puede ser posible cultivar LTC-IC a lo largo de extensos periodos de tiempo para generar un gran número de células y utilizar las células expandidas *in vitro* para re-infusión en el paciente.

15 Las LTC-IC se utilizan para transplante, incluso para el mismo individuo (transplante autólogo). También se describe el uso para transplante en un individuo diferente del donante (transplante heterólogo/alogénico), o en un pariente, que tiene la mitad del haplotipo del donante (transplante semi-alogénico). Si las LTC-IC se van a transplantar a un receptor diferente del donante, los antígenos de histocompatibilidad tienen que ser concordantes con el fin de minimizar las reacciones de rechazo. Sin embargo, también es posible el transplante entre donantes y aceptores que no tienen antígenos de histocompatibilidad concordantes, siempre que las células T hayan sido eliminadas.

20 Las condiciones en las que se cultivan las LTC-IC se pueden tomar de los ejemplos que siguen, y están descritas en la bibliografía, por ejemplo, por Sutherland *et al.* (1993), Lemieux *et al.* (1995), Sutherland *et al.* (1994) o Petzer *et al.* (1996). Usualmente, las LTC-IC se administran junto con todos los otros tipos de células recuperadas por aféresis. A partir de esta mezcla, son las células madre hematopoyéticas primitivas, las que reconstituyen la médula ósea. Por tanto, cuanto mayor es el número de células madre en la mezcla mejor será la reconstitución del trabajo del sistema hematopoyético. Los expertos en la técnica podrán apreciar que las LTC-IC y/o otros tipos de células madre se pueden separar también unas de otras por métodos bien conocidos en la técnica, como por centrifugación en gradiente, por ejemplo.

30 Preferiblemente, el número de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica recuperadas después de la administración del medicamento según la invención es al menos aproximadamente 50, más preferiblemente al menos aproximadamente 100, 500 o lo más preferible más de 1000 células por mililitro de sangre.

35 La sangre que contiene las células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica se puede recoger por cualquier método conocido en la técnica. Las células se recogen preferiblemente por leucocitaféresis. La leucocitaféresis (también llamada aféresis) es un procedimiento, en el que los leucocitos se separan de la sangre extraída y el resto de la sangre se vuelve a transfundir al donante. Los leucocitos recogidos se pueden almacenar o utilizar directamente para transplante a otro receptor. La leucocitaféresis es un método no invasivo en comparación con la separación de la médula ósea. Es por tanto igualmente adecuado para obtener células de donantes sanos así como de los pacientes.

40 Las células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* presentes en la población aislada de células sanguíneas se pueden purificar o enriquecer adicionalmente con el fin de aumentar la concentración de dichas células.

45 En una realización ventajosa, las células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica se conservan para un transplante posterior a un ser humano. También se pueden cultivar para la generación de progenie de células hematopoyéticas. La progenie de las células hematopoyéticas pueden ser las propias LTC-IC o células totipotentes, pluripotentes, dedicadas, clonogénicas o células formadoras de colonias o cualquier otro tipo de células que se pueden generar a partir de las LTC-IC y que se utilizan para transplante a un paciente. Las células hematopoyéticas pueden comprender células linfoides, mieloides, granulopoyéticas o eritropoyéticas.

50 El transplante de las células como se ha indicado antes es un transplante autólogo, esto es, se toman de un individuo y se re-infunden más tarde en el mismo individuo. Un transplante autólogo tiene la ventaja de que se evitan las reacciones inmunitarias o de rechazo de las células transplantadas, por ser las células derivadas del propio paciente.

55 También se describe un transplante que es heterólogo (alogénico), esto es, se toman las células de un individuo y se transplantan las células a otro individuo que tiene un perfil compatible de antígenos de histocompatibilidad. El transplante heterólogo es ventajoso en el caso en que el paciente tenga pocas células hematopoyéticas sanas, o en que las células no se separen fácilmente de las células cancerosas que pueden estar presentes, o en que el paciente esté demasiado débil para una separación de células sanas.

60 El uso según la invención es adecuado para cualquier tumor maligno para el que está indicada o se aplica quimioterapia mielotóxica. Es especialmente preferido para tratar una enfermedad neoplásica, cáncer, ya sea sólido o diseminado, leucemia, linfoma, un trastorno hematológico, tumores malignos, anormalidades hematopoyéticas establecidas congénitamente o genéticamente, anemia, anemia aplásica, neutropenia y/o osteopetrosis. En todas estas enfermedades, es necesaria o deseable la transferencia de células hematopoyéticas para la reconstitución del sistema hematopoyético.

65 Se prefiere utilizar el medicamento según la invención cuando la enfermedad es la enfermedad de Hodgkin. La enfermedad de Hodgkin o linfoma de Hodgkin es un linfoma que usualmente requiere quimioterapia. Después de la

ES 2 330 193 T3

quimioterapia, se requiere un trasplante de células hematopoyéticas para la reconstitución o soporte de la construcción del sistema hematopoyético en el paciente que ha sufrido mieloablación.

5 El medicamento según la invención preferiblemente comprende además uno o varios compuestos elegidos entre los siguientes grupos de compuestos: factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, quimiocinas, anticuerpos monoclonales.

El grupo de los factores de crecimiento puede comprender la trombopoyetina (TPO).

10 El grupo de las citocinas puede comprender IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), G-CSF, GM-CSF o SCF por ejemplo, el grupo de las quimiocinas puede comprender por ejemplo MIP-1 α o MIPF-1 o -2 (factor-1 y -2 inhibidores de progenitores mieloides, descritos por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.001,606) o la quimiocina EU-2; el grupo de los anticuerpos monoclonales puede comprender los anticuerpos anti-VLA-4, por ejemplo.

15 En una realización altamente preferida, el medicamento comprende además G-CSF. Se ha encontrado sorprendentemente que la administración de una combinación de la hormona del crecimiento y el G-CSF lleva a la movilización o periferalización de un elevado número de células CD34 negativas primitivas en comparación con la administración de G-CSF solo. Como se muestra en los ejemplos que siguen, la cantidad de células progenitoras CD34 negativas movilizadas por GH y G-CSF se puede aumentar grandemente en comparación con la administración de G-CSF solo.

20 La hormona del crecimiento puede ser administrada en una cantidad de aproximadamente 10 a 500 μg por kg por administración, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 100 μg por kg por administración.

25 El G-CSF puede ser administrado en una cantidad de aproximadamente 1 a 100 μg por kg al día, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5 a 25 μg por kg al día. La administración de aproximadamente 5 a 10 μg al día es especialmente preferida.

30 Ventajosamente, la administración se realiza por las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica o bucal.

Se prefiere la vía intravenosa. La administración puede ser de una o de tres veces al día. Es preferible un régimen, en el que la administración de la hormona del crecimiento se realice tres veces al día y la administración de G-CSF se realice una vez al día.

35 La administración se puede realizar a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 a 14 días o, hasta la aféresis, hasta la movilización o periferalización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, hasta el aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o hasta el injerto.

40 En las realizaciones de la invención altamente preferidas, la administración o administraciones se realizan antes o después de quimioterapia, radioterapia, terapia mielotóxica o mielodepresiva, trasplante de células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o trasplante de médula ósea. Se puede realizar después de cualquiera de estas terapias, siempre que la terapia sea ahorradora de células madre.

45 La administración empieza unos siete días después del comienzo de un tratamiento quimioterapéutico o unos 2 días después del final de un tratamiento quimioterapéutico. Cualquier terapia mielotóxica es adecuada para la quimioterapia, ya sea un tratamiento con un único agente terapéutico o con una combinación, siempre que sea ahorrador de células madre. Para la quimioterapia intensiva, se utilizan frecuentemente ifosfamida (IFO) y/o vinorelbina (VNR), por ejemplo.

50 En una realización preferida, la hormona del crecimiento utilizada es la hormona del crecimiento humana, y es altamente preferido el uso de hormona del crecimiento recombinante. Además, es altamente preferido el uso de G-CSF humano, recombinante.

55 También se describe un método de preparación de una población de células capaces de regenerar la hematopoyesis en un ser humano, que comprende las etapas de:

60 a) Administrar a un donante una composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados o cualquier factor inductor de la liberación de la hormona del crecimiento en una cantidad suficiente para aumentar en dicho donante el número de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis en un ser humano; y

65 b) Recuperar la población de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* a partir del donante.

El método produce así una población de células CD34 negativas capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, estando destinada esta población para trasplante en el mismo individuo o en diferentes individuos, por ejemplo.

ES 2 330 193 T3

Los expertos en la técnica pueden apreciar, que el término “la administración” no significa sólo una única administración, sino que engloba también más de una, varias o muchas administraciones.

5 En la etapa (b), la recuperación, recogida o aislamiento de células CD34 negativas usualmente comprende aislar o sacar la sangre o las células sanguíneas que contienen las células pluripotentes a partir de un donante (un individuo sano o enfermo). Esto se puede hacer por cualquier método conocido, siendo el método más conveniente la leucocitaféresis. Durante la leucocitaféresis, usualmente el fluido y los glóbulos rojos se re-infunden en el paciente, y se retienen las células residuales (la “capa leucocítica”).

10 Se puede administrar una cantidad suficiente para aumentar el número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, una cantidad suficiente para inducir la movilización o periferalización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o una cantidad suficiente para inducir la movilización de las células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* hasta la sangre periférica, en una o varias dosis durante uno o varios días.

15 Las células aisladas del donante se pueden conservar, por ejemplo, porque el donante va a ser sometido a un tratamiento específico tal como quimioterapia, radioterapia o cualquier terapia mieloablativa, por ejemplo. La conservación de las células se hace usualmente congelándolas en nitrógeno líquido. Alternativamente, se pueden utilizar directamente para trasplante, por ejemplo, para un receptor alogénico. Las células congeladas profundamente se pueden conservar durante extensos periodos de tiempo, como semanas, meses o años. Para la descongelación, las células se ponen a 37°C hasta que funden, y entonces pueden ser transferidas al receptor.

20 También se describe un método de preparación de un donante de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica, que comprende la administración de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados o cualquier factor inductor de la liberación de la hormona del crecimiento en una cantidad suficiente para aumentar el número de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica.

25 En otro aspecto, se describe un método para aumentar el número de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica *in vivo* en un donante mediante la administración a dicho donante de una composición que comprende la hormona del crecimiento y/o uno de sus derivados y/o cualquier factor inductor de la liberación de la hormona del crecimiento.

En los métodos, las células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica son las LTC-IC.

30 Ventajosamente, el aumento del número de células CD34 negativas pluripotentes circulantes de la sangre periférica, es de al menos aproximadamente 50, 100, 500 o 1000 células por mililitro de sangre periférica.

35 En la etapa (b), se puede utilizar cualquier método para recuperar y/o aislar las células CD34 negativas. Se prefiere el uso de la leucocitaféresis.

40 El objetivo especificado del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* es de al menos 2×10^4 células por kg de peso corporal de donante o receptor.

45 La composición administrada en la etapa (a) puede comprender además uno o varios compuestos elegidos entre los siguientes grupos de compuestos: factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, quimiocinas, anticuerpos monoclonales. El grupo de los factores de crecimiento puede comprender la trombopoyetina TPO, por ejemplo. El grupo de las citocinas puede comprender IL-1, IL-3, G-CSF, GM-CSF o SCF; el grupo de las quimiocinas comprende MIP-1 α , MIP-1, MIP-2 o EU-2; el grupo de los anticuerpos monoclonales comprende los anticuerpos anti-VLA-4.

50 Preferiblemente, las composiciones comprenden además G-CSF.

Preferiblemente, la composición comprende la hormona del crecimiento y el G-CSF.

55 En la etapa (a), se puede administrar la hormona del crecimiento en una cantidad comprendida entre 10 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, en particular en una cantidad de aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Se puede administrar G-CSF en una cantidad comprendida entre 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, en particular en una cantidad de aproximadamente 5 a 10 μg por kilogramo de peso corporal.

60 Se prefieren los siguientes regímenes:

- La administración de la hormona del crecimiento se hace tres veces al día y la administración de G-CSF se hace una vez al día;
- 65 - La administración se realiza por las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica o bucal.

ES 2 330 193 T3

- La administración se realiza a lo largo de un periodo de aproximadamente 14 días, hasta la aféresis, hasta la movilización o periferalización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, hasta el aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o hasta el injerto.

5

- La administración se realiza antes o después de la quimioterapia, radioterapia, terapia mielotóxica o mielodepresiva, trasplante de células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o trasplante de médula ósea.

10

- La administración empieza unos siete días después del comienzo de un tratamiento quimioterapéutico o unos 2 días después del final de un tratamiento quimioterapéutico.

- La administración se realiza después de tratamiento quimioterapéutico con ifosfamida y/o vinorelbina.

15

Preferiblemente, la hormona del crecimiento administrada es la hormona del crecimiento humana, en particular hormona del crecimiento recombinante, y el G-CSF administrado es G-CSF humano, en particular G-CSF recombinante.

En esta solicitud:

20

- El término “circulante” puede ser reemplazado por el término “sangre” o “sangre periférica”.

- El término “preparación” en la expresión “método de preparación” puede ser reemplazado por “pre-tratamiento” o por “preparación para extracción de sangre o leucocitaféresis”.

25

- Un “donante” como se señala en los métodos o usos de la invención puede ser un ser humano o un animal, un individuo sano o un individuo enfermo (paciente). Dicho animal es preferiblemente un mamífero y se puede elegir entre los animales domésticos tales como perros, gatos etc. o animales tales como cerdos, caballos, ganado vacuno, ovejas.

30

- El término “hematopoyesis” puede significar la formación de las células sanguíneas.

35

- El término “hormona del crecimiento” engloba la hormona del crecimiento humana (hGH) y todas las proteínas homólogas de la hormona del crecimiento humana de diferente especie y todos los homólogos de la hormona del crecimiento humana en especies distintas de la humana. Las especies distintas de la humana pueden ser cualquier clase de animal doméstico o caballo por ejemplo.

40

En las realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana. La hormona del crecimiento humana (hGH), conocida también como somatropina (INN) o somatotropina es una hormona proteínica producida y segregada por las células somatotrópicas de la hipófisis anterior. La hGH desempeña un papel clave en el crecimiento somático a través de sus efectos sobre el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y lípidos.

45

La hormona del crecimiento humana es una cadena polipeptídica sencilla de 101 aminoácidos que tiene dos enlaces disulfuro, uno entre Cys-53 y Cys-165, formando un gran bucle en la molécula, y el otro entre Cys-182 y Cys-189, formando un pequeño bucle cerca del C-terminal.

50

El término “derivado” en la expresión “derivados de la hormona del crecimiento” significa en el contexto de la invención, moléculas que difieren estructuralmente de la GH pero que conservan la función de la GH con respecto a su efecto directo o indirecto sobre el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y lípidos y/o su efecto de movilización y/o efecto de recuperación (esto es, “movilización o periferalización de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, reducción del número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células circulantes para trasplante, reducción del volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo especificado del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*”).

55

Los derivados de la hormona del crecimiento humana (hGH) incluidos en la invención, incluyen los derivados presentes en la naturaleza, las variantes y productos metabólicos, los productos de degradación principalmente de la hGH biosintética y los derivados de la hGH producidos por métodos de ingeniería genética. Cualquier derivado de hGH se puede utilizar para los fines de la presente invención siempre que retenga la actividad biológica de la hGH según la invención.

60

Ejemplos de derivados son las variantes por corte y empalme, oligómeros, agregados, productos de escisión proteolítica, variantes que tienen sustituciones, inserciones o deleciones de uno o más aminoácidos etc.

65

La hGH-metionilo es un ejemplo de derivado de la hGH que es producido por tecnología de DNA recombinante. Este compuesto es realmente un derivado de la hGH que tiene un residuo adicional de metionina en su N-terminal (Goeddel *et al.*, 1979).

ES 2 330 193 T3

Otro ejemplo de derivado de la hGH es una variante de hGH presente en la naturaleza llamada 20-K-hGH que se ha publicado que existe en la hipófisis así como en el torrente sanguíneo (Lewis *et al.*, 1977; 1978 y 1981). Este compuesto, que carece de 15 residuos aminoácidos de Glu-32 a Gln-46, surge de un corte y empalme alternativo del ácido ribonucleico mensajero (DeNoto *et al.*, 1981).

Otro ejemplo de derivado de la hGH está acetilado en el N-terminal (Lewis *et al.*, 1979).

La hormona del crecimiento humana puede estar además en una forma monomérica, dimérica y oligomérica de más alto peso molecular o en una mezcla de dichas formas.

La hormona del crecimiento humana puede estar en formas agregadas que se encuentran tanto en la hipófisis como en la circulación (Stolar *et al.*, 1984; Solar and Baumann, 1986).

La forma dimérica de la hGH puede ser de distintos tipos:

- un dímero disulfuro conectado por medio de enlaces disulfuro intercadenas (Lewis *et al.*, 1977),
- un dímero covalente o irreversible que se detecta sobre geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y que no es un dímero disulfuro (Bewley and Li, 1975), y
- un dímero no covalente que se disocia fácilmente en hGH monomérica por tratamiento con agentes que rompen las interacciones hidrófobas de las proteínas (Becker *et al.*, 1987),
- un complejo dimérico con Zn^{2+} (Cunningham *et al.*, 1991).

El análisis de Scatchard ha revelado que dos iones Zn^{2+} se asocian por cada dímero de hGH de forma cooperativa, y se ha encontrado que este complejo dimérico Zn^{2+} -hGH es más estable a la desnaturalización que la hGH monomérica (Cunningham *et al.*, 1991).

Una serie de derivados de hGH surgen de modificaciones proteolíticas de la molécula. La ruta primaria para el metabolismo de la hGH incluye la proteólisis. La región de hGH alrededor de los residuos 130-150 es extremadamente susceptible a la proteólisis, y se han descrito varios derivados de hGH que tienen cortes o deleciones en esta región (Thorlacius-Ussing, 1987). Esta región está en el bucle grande de la hGH, y la escisión de un enlace peptídico en ella produce la generación de dos cadenas que están conectadas por medio de enlace disulfuro en Cys-53 y Cys-165. Se ha publicado que muchas de estas formas de dos cadenas tienen mayor actividad biológica (Singh *et al.*, 1974).

Muchos derivados de la hormona del crecimiento humana han sido generados artificialmente mediante el uso de enzimas. Se han utilizado las enzimas tripsina y subtilisina, así como otras, para modificar la hGH en diferentes puntos a lo largo de la molécula (Lewis *et al.*, 1977). Un derivado de este tipo, llamado proteína anabólica de dos cadenas (2-CAP), se formó mediante proteólisis controlada de la hGH utilizando tripsina.

Otro ejemplo de derivado de la hGH es la hGH desamidada. Los residuos de asparagina y glutamina en las proteínas son susceptibles de reacciones de desamidación en condiciones apropiadas. Un ejemplo de hGH desamidada es la hGH de la hipófisis que se ha demostrado que sufre este tipo de reacción, dando como resultado la conversión de Asn-152 en ácido aspártico y también, en menor grado, la conversión de Gln-137 en ácido glutámico (Lewis *et al.*, 1981). Otro ejemplo de hGH desamidada es la hGH biosintética que se sabe que se degrada en ciertas condiciones de conservación, dando como resultado la desamidación en una asparagina diferente (Asn-149). Este es el sitio principal de desamidación, pero también se observa la desamidación en Asn-152 (Becker *et al.*, 1988). No se ha informado de la desamidación en Gln-137 en la hGH biosintética.

Otro ejemplo de derivado de la hGH es el sulfóxido de hGH. Los residuos de metionina en las proteínas son susceptibles de oxidación, principalmente hasta sulfóxido. Tanto la hGH derivada de la hipófisis como la biosintética sufren sulfoxidación en Met-14 y Met-125 (Becker *et al.*, 1988). La oxidación en Met-170 se ha observado también en la hGH hipofisaria pero no en la biosintética.

Otro ejemplo de derivado de la hGH son las formas truncadas de hGH que han sido producidas, o por las acciones de las enzimas o por métodos genéticos. La 2-CAP, generada por las acciones controladas de la tripsina, tiene eliminados los ocho primeros residuos en el N-terminal de hGH. Otras versiones truncadas de hGH han sido producidas modificando el gen antes de la expresión en un hospedante adecuado. Los 13 primeros residuos han sido eliminados para dar un derivado que tiene propiedades biológicas características en el que la cadena polipeptídica no está escindida (Gertler *et al.*, 1986).

La hGH y sus derivados se pueden producir por tecnología de DNA recombinante que permite la producción de un suministro ilimitado de hGH en una serie de sistemas diferentes. La purificación de la hGH o sus derivados a partir del medio de cultivo se facilita por las bajas cantidades de proteínas contaminantes presentes. De hecho, se ha demostrado que la hGH se puede purificar a escala de laboratorio mediante una única etapa de purificación en una columna de HPLC de fase inversa.

ES 2 330 193 T3

La hGH recombinante generalmente se comercializa como viales que contienen hGH más excipientes adicionales, por ejemplo, glicina y manitol, en forma liofilizada. Se proporciona a la vez un vial de diluyente, que permite al paciente reconstituir el producto a la concentración deseada antes de la administración de la dosis.

5 En general, no se han observado diferencias significativas en las actividades farmacocinéticas o biológicas de la hGH de secuencia natural recombinante, la hGH-N-metionilo recombinante, o el material derivado de la hipófisis en los seres humanos (Moore *et al.*, 1988; Jorgensen *et al.*, 1988).

10 La hormona del crecimiento humana como se utiliza en la presente invención puede incluir derivados funcionales como se ha indicado antes, así como otros tipos de derivados, fragmentos, variantes, análogos, o derivados químicos. Un derivado funcional retiene al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de hGH que permite su utilización de acuerdo con la presente invención, especialmente la movilización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* por ejemplo.

15 En el significado de la invención, un “derivado” puede ser:

- Un “fragmento” de la hormona del crecimiento humana según la presente invención se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, esto es, un péptido más corto.
- 20 - Una “variante” de la hormona del crecimiento humana según la presente invención se refiere a una molécula que es sustancialmente similar al péptido completo o a uno de sus fragmentos. Los péptidos variantes se pueden preparar convenientemente por síntesis química directa del péptido variante, utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

25 Alternativamente, las variantes de aminoácidos de la hGH se pueden preparar por mutaciones en el cDNA que codifica los derivados de hGH sintetizados. Tales variantes comprenden deleciones, inserciones o sustitución de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Se puede realizar también cualquier combinación de deleciones, inserciones, y sustituciones, siempre que la construcción final tenga la actividad deseada.

30 A nivel genético, estas variantes se preparan ordinariamente por mutagénesis dirigida al sitio (como se pone por ejemplo por (Adelman *et al.*, 1983)) de nucleótidos en el DNA que codifica la molécula peptídica, con lo que se produce el DNA que codifica la variante, y después la expresión del DNA en cultivo celular recombinante. Las variantes presentan típicamente la misma actividad biológica que el péptido no variante.

- 35 - Un “análogo” de la hormona del crecimiento humana según la presente invención se refiere a una molécula no natural que es sustancialmente similar a la molécula completa o a uno de sus fragmentos activos.
- Un “derivado químico” de la hormona del crecimiento humana según la presente invención contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la secuencia de aminoácidos del derivado de la hormona del crecimiento humana. Las modificaciones covalentes de la secuencia de aminoácidos están incluidas dentro del alcance de esta invención. Tales modificaciones se pueden introducir en la hormona del crecimiento humana haciendo reaccionar residuos de aminoácidos seleccionados del péptido con un agente orgánico derivatizante que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados.

45 Los tipos de sustituciones que se pueden llevar a cabo en la hormona del crecimiento humana según la presente invención se pueden basar en los análisis de frecuencias de cambios de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies. Basándose en tal análisis, se pueden definir aquí las sustituciones conservadoras como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

- 50 I: Residuos pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- II: Residuos polares cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
- III: Residuos polares cargados positivamente: His, Arg, Lys
- 55 IV: Residuos grandes, alifáticos no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- V: Residuos grandes aromáticos: Phe, Try, Trp

60 Dentro de los grupos mencionados, las siguientes sustituciones se consideran “altamente conservadoras”:

- Asp/Glu
- His/Arg/Lys
- 65 - Phe/Tyr/Trp
- Met/Leu/Ile/Val

ES 2 330 193 T3

Las sustituciones semi-conservadoras se definen como intercambios entre dos de los grupos (I)-(IV) anteriores que se limitan al supergrupo (A), que comprende los (I), (II), y (III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende los (IV) y (V) anteriores. Las sustituciones no se limitan a los aminoácidos codificados de forma genética ni tampoco a los que están presentes en la naturaleza. Cuando se prepara el epítipo por síntesis peptídica, se pueden utilizar directamente los aminoácidos deseados. Alternativamente, un aminoácido codificado de forma genética puede ser modificado haciéndole reaccionar con un agente orgánico derivatizante que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados.

Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar lo más comúnmente con alfa-haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboxilmetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo se derivatizan también por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivatizan por reacción con procarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de parabromofenacilo es útil también; la reacción se lleva a cabo preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos de lisinilo y amino terminal se hacen reaccionar con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-aminoácidos incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y la reacción con glioxilato catalizada por las transaminasas.

Los residuos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal; 2,3-butanodiona; y ninhidrina. La derivatización de los residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas a causa del alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo epsilon-amino de la arginina.

La modificación específica de los residuos de tirosilo *per se* ha sido estudiada en profundidad, con particular interés en introducir marcas espectrales en los residuos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil-tirosilo y derivados e-nitro, respectivamente.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias (R'N-C-N-R') tales como 1-ciclohexil-3-[2-morfolinil-(4-etil)]carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparraginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

Los residuos glutaminilo y asparraginilo son frecuentemente desamidados hasta los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos son desamidados en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos residuos está dentro del alcance de la invención.

Aunque la presente invención se puede realizar con derivados de la hormona del crecimiento humana recombinante preparados por tecnología de DNA recombinante, por ejemplo en células procariotas o eucariotas, estos derivados se pueden preparar también por métodos convencionales de síntesis de proteínas que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La hormona del crecimiento puede ser una proteína, un péptido, una molécula de DNA, una molécula de RNA. La molécula de DNA y la molécula de RNA pueden codificar la hGH y todos sus derivados incluyendo los indicados antes.

La hormona del crecimiento puede ser preferiblemente la hormona del crecimiento recombinante.

La determinación de las cantidades de hormona del crecimiento o de uno de sus derivados a ser administradas en un método o uso de la invención descritos antes está dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica.

La dosis típica de la hormona del crecimiento o de uno de sus derivados empezará en aproximadamente 1 microgramo por kilogramo de peso del paciente o donante al día y la dosis irá escalando hasta que se alcance el efecto deseado (movilización o periferalización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, reducción del número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células circulantes para trasplante, reducción del volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo específico del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*).

La dosis administrada de hormona del crecimiento o de uno de sus derivados depende de la edad, sexo, salud y peso del donante, tipo de tratamiento previo o concurrente, si lo hubiera, frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

ES 2 330 193 T3

La hormona del crecimiento o uno de sus derivados puede ser administrada ventajosamente en una cantidad comprendida entre 10 y 500 μg por kilogramo de peso corporal, más particularmente aproximadamente 50 200 μg por kilogramo de peso corporal.

5 Una dosis preferida de hormona del crecimiento o uno de sus derivados a ser administrada es aproximadamente 100 μg por kilogramo de peso corporal.

La hormona del crecimiento o sus derivados se pueden administrar solos o en conjunción o asociación con otros factores.

10

La hormona del crecimiento o sus derivados pueden estar ventajosamente presentes en una composición que comprende además uno o varios compuestos elegidos entre los compuestos que pertenecen a los siguientes grupos: factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, quimiocinas, anticuerpos monoclonales.

15 La hormona del crecimiento o sus derivados y uno o varios compuestos elegidos entre los compuestos que pertenecen a los siguientes grupos: factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, quimiocinas, anticuerpos monoclonales, se pueden administrar simultáneamente o a diferentes tiempos y/o en el mismo sitio o en diferentes sitios y/o en la misma composición o medicamento o diferente.

20 El grupo de los factores de crecimiento puede comprender la trombopoyetina (TPO). El grupo de las citocinas puede comprender IL-1, IL-3, G-CSF, GM-CSF o SCF. El grupo de las quimiocinas puede comprender MIP1 α , MIP1-1, MIP1-2 o EU-2. El grupo de los anticuerpos monoclonales puede comprender los anticuerpos anti-VLA-4.

25 Preferiblemente, la hormona del crecimiento o sus derivados están presentes en una composición que comprende el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF).

Preferiblemente, la hormona del crecimiento o sus derivados se asocian con el G-CSF.

30 La hormona del crecimiento o sus derivados y el G-CSF se pueden administrar simultáneamente o a diferentes tiempos y/o en el mismo sitio o en diferentes sitios y/o en la misma composición o medicamento o diferente.

La hormona del crecimiento o sus derivados y el G-CSF se pueden administrar ventajosamente por separado.

35 El G-CSF se puede administrar ventajosamente en una cantidad comprendida entre 1 y 15 μg por kilogramo de peso corporal, más particularmente entre 4 y 12 μg por kilogramo de peso corporal.

Una dosis preferida de G-CSF a ser administrada es aproximadamente 5 μg o aproximadamente 10 μg por kilogramo de peso corporal.

40 En una realización preferida, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se administra en una cantidad de aproximadamente 100 μg por kilogramo de peso corporal, y el G-CSF se administra en una cantidad de aproximadamente 5 y 10 μg por kilogramo de peso corporal.

45 Según la invención, la expresión “administración en una cantidad suficiente para aumentar el número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o para reducir el volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo especificado del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*” puede significar una o varias administraciones, una o varias veces al día y durante uno o varios días para acumular una cantidad suficiente para aumentar el número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o para reducir el volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo especificado del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*.

50 Las composiciones farmacéuticas o composiciones que se utilizan en los usos de la invención están en una forma farmacéutica aceptable opcionalmente combinados con un vehículo aceptable.

55 Estas composiciones se pueden administrar por cualquier medio que consiga los fines previstos.

Las composiciones utilizadas en los usos de la invención se pueden administrar solas o conjuntamente con otros compuestos terapéuticos dirigidos a una enfermedad o dirigidos a otros síntomas de la misma.

60 Las composiciones utilizadas en los usos de la invención se pueden administrar por vía intravenosa o subcutánea, o, preferiblemente, por vía oral.

Después de la administración intravenosa, la eliminación de hGH se describe por una cinética de primer orden con una semivida en suero de 12-30 minutos tanto en los animales como en los seres humanos (Moore *et al.*, 1988; Hendricks *et al.*, 1985). Tradicionalmente, la inyección intramuscular ha sido el método de elección como la vía preferida de administración. En los seres humanos, la absorción de hGH exógena parece que es más rápida desde el sitio intramuscular, con un tiempo hasta la concentración máxima de dos a tres horas, en comparación con las cuatro a seis horas después de la administración subcutánea. Se ha publicado que la fase de desaparición del suero varía de

ES 2 330 193 T3

12-20 horas para la administración intramuscular, y 20-24 horas después de administración subcutánea (Albertsson-Wikland *et al.*, 1986; Jorgensen *et al.*, 1987).

5 Las composiciones utilizadas en los usos de la invención se pueden administrar por vías parenterales tales como la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o por vía transdérmica o por vías mucosales tales como la vía bucal u oral.

10 La composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se puede administrar por vías parenterales tales como la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o por vía transdérmica o por vías mucosales tales como la vía bucal u oral.

Preferiblemente, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados solos o en combinación con G-CSF, se administran subcutáneamente.

15 La dosis o cantidad total requerida para cada tratamiento, método o uso de la invención se puede administrar en dosis única o en dosis múltiples.

20 La composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se puede administrar una o tres veces al día.

Preferiblemente la composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se administra tres veces al día.

25 Preferiblemente, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se administra una o tres veces al día.

En una realización preferida, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se administra tres veces al día.

30 Si un método o uso de la invención comprende la administración de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados y G-CSF, el G-CSF se administra preferiblemente una vez al día y/o intravenosamente.

35 Si un uso de la invención comprende la administración de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados o cualquier factor inductor de la liberación de la hormona del crecimiento y G-CSF, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados o cualquier factor inductor de la liberación de la hormona del crecimiento, se administra preferiblemente tres veces al día y el G-CSF se administra preferiblemente una vez al día.

La composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados puede ser de administración diaria que puede empezar aproximadamente 20 días pre-leucocitaféresis.

40 La composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se puede administrar durante un periodo de aproximadamente 5 días o durante un periodo de aproximadamente 10 días o durante un periodo de aproximadamente 15 días, hasta la leucocitaféresis o hasta que se alcance el efecto deseado (movilización o periferalización de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, reducción del número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células circulantes para trasplante, reducción del volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo específico del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*).

45 Preferiblemente, la composición que comprende la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se administra hasta la leucocitaféresis y/o hasta que se alcance el efecto deseado (movilización o periferalización de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, reducción del número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células circulantes para trasplante, reducción del volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo específico del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*).

50 Los usos de la invención se realizan ventajosamente antes o después de la quimioterapia, radioterapia, terapia mielodepresiva, trasplante o injerto de células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o trasplante de médula ósea.

60 Los usos de la invención se realizan ventajosamente aproximadamente 7 días después de empezar un tratamiento quimioterapéutico o aproximadamente 2 días después de terminar un tratamiento quimioterapéutico.

65 En una realización preferida, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados y el G-CSF se administran hasta la leucocitaféresis, hasta la periferalización o movilización de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, hasta el aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, hasta la reducción del número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células circulantes para trasplante, y/o hasta la reducción del volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo específico del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*. En esta realización preferida, la hormona del crecimiento o uno de sus derivados se administra preferiblemente tres veces al día y el G-CSF se administra preferiblemente una vez al día.

ES 2 330 193 T3

Los usos de la invención se pueden combinar con un tratamiento previo llamado “quimioterapia previa (*chemopriming*)”. Los regímenes de “*chemopriming*” que se pueden utilizar son:

- ciclofosfamida a altas dosis (4 a 7 g/m²) para pacientes con cáncer de mama o mieloma múltiple,
- ifosfamida, vinorelbina o etopósido y similares, para pacientes con linfoma no Hodgkin o enfermedad de Hodgkin,
- ciclofosfamida, etopósido, cisplatino (CVP) para pacientes con tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama).

Para mejorar la inducción de células capaces de regenerar la recuperación de la hematopoyesis *in vivo*, los usos de la invención se empiezan rápidamente después de terminar el tratamiento de *chemopriming* o el tratamiento de quimioterapia y se continúan hasta completar la aféresis.

Es de notar también que en los pacientes, en que el conjunto de células madre de la médula está significativamente disminuido por quimioterapia previa, un régimen adicional de *chemopriming* puede perjudicar en lugar de inducir las células capaces de regenerar la periferalización de la hematopoyesis *in vivo*. Los agentes quimioterapéuticos tóxicos para las células madre tales como busulfán, doxorubicina, melfalán, tiotepa y posiblemente fludarabina (y otros) no deben ser parte de un régimen de *chemopriming*. Por otro lado, la ciclofosfamida se considera el fármaco ideal para *chemopriming* con las mínimas células capaces de regenerar la toxicidad de la hematopoyesis *in vivo*, aunque la cardiotoxicidad (dosis > 4 g/m²) y la cistitis hemorrágica son los efectos secundarios extramedulares bien conocidos que limitan la dosis (To *et al.*, 1990).

La población de células sanguíneas enriquecidas con células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* obtenidas a partir de la sangre periférica mediante los usos de la invención, se puede reinfundir de nuevo, injertar o transplantar al mismo individuo que es en este caso el donante (transplante autólogo) o a diferentes individuos (transplante no autólogo/heterólogo).

La población de células sanguíneas enriquecidas con células CD34 negativas capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* obtenidas a partir de la sangre periférica mediante los usos de la invención, se infunde ventajosamente a un individuo que ha recibido previamente uno o varios tratamientos de quimioterapia, radioterapia, terapia mielodepresiva, mieloablative o mielotóxica.

Dicha operación de re-infusión, injerto o transplante pertenece a los llamados procedimientos de transplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). El HSCT es un procedimiento clínico en el que las células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, obtenidas a partir de médula ósea o de sangre periférica, se transplantan a un paciente.

Un transplante autólogo es un transplante en el que donante y receptor son el mismo individuo mientras que un transplante no autólogo es un transplante en el que donante y receptor son individuos diferentes. El método engloba tanto los transplantes autólogos como los no autólogos.

Por otra parte, la invención proporciona el uso de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados para mejorar el efecto de movilización o periferalización del G-CSF.

La invención proporciona el uso de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados para mejorar la movilización de las células CD34 negativas circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* por el G-CSF, para mejorar el incremento del número de células CD 34 negativas circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* por el G-CSF.

De este modo, la administración de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados y el G-CSF mejora o aumenta sinérgicamente la movilización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, mejora o aumenta sinérgicamente el número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, reduce el número de leucocitaféresis requeridas para recoger suficiente cantidad de células circulantes para transplante, y/o reduce el volumen de sangre requerido para ser procesado con el fin de obtener el objetivo especificado del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, con respecto a los efectos obtenidos administrando el G-CSF solo o sin la hormona del crecimiento o uno de sus derivados.

La administración de la hormona del crecimiento o de uno de sus derivados y el G-CSF permite utilizar dosis más bajas de G-CSF que si se utiliza el G-CSF solo o sin la hormona del crecimiento o uno de sus derivados o cualquier factor inductor de la liberación de la hormona del crecimiento.

La administración de la hormona del crecimiento o de uno de sus derivados y el G-CSF se puede realizar simultáneamente o a diferentes tiempos y/o en el mismo sitio o en diferentes sitios y/o en la misma composición o medicamento o diferente.

Los usos de la invención se pueden aplicar en muchos campos clínicamente importantes, especialmente transplante autólogo o heterólogo, transplante alogénico o semi-alogénico de médula ósea, terapia génica, transplante de

células madre hematopoyéticas, trasplante de células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, radioterapia, quimioterapia, terapia mielodepresiva o mielotóxica.

Los usos de la invención se pueden aplicar para tratar a un paciente que ha recibido radioterapia o quimioterapia, que ha sido transplantado con médula ósea o con células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, o que ha recibido terapia mielotóxica o mieloablativa.

Habiendo descrito ahora totalmente la invención, ésta se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Leyendas de las figuras

Fig. 1 muestra el plan de tratamiento de los pacientes para los ciclos 1 y 3 y ciclo 2, respectivamente. En los ciclos 1 y 3, los pacientes reciben primero tratamiento quimioterapéutico con ifosfamida (IFO) y vinorelbina (VNR) y después el G-CSF como agente movilizante, mientras que en el ciclo 2, los pacientes reciben primero ifosfamida (IFO) y vinorelbina (VNR) y después una combinación de G-CSF y hormona del crecimiento (GH) como agentes movilizantes.

Fig. 2 muestra el desarrollo del número de glóbulos blancos (recuento de glóbulos blancos, WBC) por μl de sangre en cinco pacientes (casos 1 a 5) que han recibido un tratamiento según el plan de tratamiento mostrado en la Fig. 1.

Fig. 3 representa el desarrollo del número de células CD 34⁺/ μl de sangre, obtenido en cinco pacientes (casos 1 a 5) que han recibido un tratamiento según el plan de tratamiento mostrado en la Fig. 1.

Fig. 4 muestra el desarrollo del número de células formadoras de colonias (CFC) por mililitro de sangre, obtenidas en cinco pacientes (casos 1 a 5) que han recibido un tratamiento según el plan de tratamiento mostrado en la Fig. 1.

Fig. 5 muestra el desarrollo del número de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) por mililitro de sangre, obtenidas en cuatro pacientes (casos 1 a 4) que han recibido un tratamiento según el plan de tratamiento mostrado en la Fig. 1.

Fig. 6 muestra un histograma que representa las relaciones de los picos obtenidos en los experimentos mostrados en las Fig. 3 a 5.

Fig. 7 muestra el número total de células CD 34⁺ obtenidas en los ciclos 1 a 3 en los cinco pacientes diferentes.

Fig. 8 muestra el número total de células formadoras de colonias (CFC) obtenidas en los ciclos 1 a 3 en los cinco pacientes diferentes.

Fig. 9 muestra el número total de LTC-IC obtenidas en los ciclos 1 a 3 en cuatro de los cinco pacientes.

Ejemplo

Estudio clínico piloto que muestra el efecto de la rhGH en combinación con rhG-CSF para la movilización de las células progenitoras hematopoyéticas después de quimioterapia en pacientes con enfermedad de Hodgkin

Abreviaturas

- BFU-E: unidad formadora de estallido eritroide
- CFU-C: unidad formadora de colonias de cultivo
- CFU-GM: unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos
- CFU-Meg: unidad formadora de colonias de megacariocitos
- G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos
- IGF-I: factor de crecimiento similar a insulina I
- LTC-IC: células iniciadoras de cultivo a largo plazo
- hGH: hormona del crecimiento humana
- rhG-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante
- rhGH: hormona del crecimiento humana recombinante

Introducción

La mayoría de los pacientes con enfermedad de Hodgkin (HD) se curan con radioterapia, quimioterapia de combinación o ambas. Sin embargo, los pacientes que recaen después de alcanzar una remisión completa y los que tienen la enfermedad refractaria primaria tienen pobres resultados con los regímenes de quimio-radioterapia de rescate en dosis convencionales. Varios ensayos clínicos utilizando dosis altas de quimio-radioterapia con trasplante autólogo de células madre (ASCT) demuestran que del 30% al 50% de los pacientes parecen haber sido curados utilizando este método. Adicionalmente, dos estudios aleatorios que comparan la quimioterapia de segunda línea con dosis estándar con la terapia de dosis altas (HDT) y el trasplante autólogo de células madre (ASCT), han demostrado una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia libre de sucesos y libre de progresión para los pacientes tratados con la HDT más ASCT.

Un prerrequisito esencial para la viabilidad de los programas de HDT es la disponibilidad de cantidades adecuadas de células madre/progenitoras hematopoyéticas a ser utilizadas después de la terapia mieloablata. La movilización y recogida óptimas de las células progenitoras de la sangre periférica (PBPC) en pacientes con cáncer requieren tanto la quimioterapia como la infusión del factor de crecimiento. Sin embargo, incluso en condiciones óptimas, algunos pacientes fallan en movilizar cantidades adecuadas de células progenitoras. Debido a una quimio-radioterapia previa extensa o a factores intrínsecos de la enfermedad, de 30% a 50% de los pacientes de HD son pacientes difíciles de movilizar y potencialmente no pueden sufrir terapia mieloablata curativa.

Para ensayar la hipótesis de que la rhGH podría ser útil para mejorar la movilización inducida por rhG-CSF de las células progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica, se llevó a cabo recientemente un estudio clínico piloto dedicado a investigar los efectos combinados de la rhGH y rhG-CSF para aumentar la movilización de las PBPC en pacientes con recaída de HD o con HD refractaria. Los objetivos del estudio fueron: (i) evaluar la actividad de la rhGH para aumentar la movilización inducida por rhG-CSF de las células CD34+, y la recogida de las células CD34+; (ii) evaluar la actividad de la rhGH para aumentar la movilización inducida por rhG-CSF de las células progenitoras inmaduras (LTC-IC) y la recogida de LTC-IC; (iii) evaluar la seguridad y la tolerancia de la rhGH administrada en combinación con rhG-CSF a los pacientes de cáncer después de la quimioterapia.

1. *Criterios de selección para los estudios clínicos de movilización y recuperación en pacientes con la enfermedad de Hodgkin (HD)*

Pacientes

En este estudio de movilización fueron incluidos cinco pacientes elegibles para trasplante con HD refractaria o con recaída de HD tratados en nuestra Institución con un programa de quimioterapia de rescate a dosis altas.

A) Criterios de inclusión

- Consentimiento informado por escrito
- Edad entre 18 años y 60 años
- Enfermedad de Hodgkin histológicamente confirmada (linfoma) sometida a quimioterapia de rescate de dosis altas según las recomendaciones actuales de INT.

B) Criterios de exclusión

- Insuficiencia renal (creatinina > 1,5 N), o hepática (SGOT y/o SGPT > 2,5 N; bilirrubina > 1,5 N), o enfermedad del CNS o psiquiátrica grave.
- Enfermedad cardíaca o miocárdica clínicamente significativa. Fracción de expulsión ventricular izquierda < 50% en reposo por evaluación con ecocardiografía o < 55% por medida isotópica.
- Hepatitis B o C, o test de HIV positivo.

ES 2 330 193 T3

Las principales características clínicas de los 5 pacientes elegidos se indican en la Tabla 1.

TABLA 1

Características clínicas de los pacientes en el momento del estudio

Paciente	1	2	3	4	5
Edad/Sexo	28/F	40/F	45/M	50/M	50/M
No. de regímenes de quimioterapia previos	1	1	2	1	1
Radioterapia	+	+	+	+	+
Implicación de BM en la recaída	-	-	-	-	+
Extensión de la enfermedad en la recaída	x	x	x	x	x
Nodal	+	+	x	+	x
Extranodal	x	x	x	x	x
ambas	x	x	+	x	+

2. Plan de tratamiento

El plan de tratamiento se ilustra en la Fig. 1.

Los pacientes recibieron tres ciclos consecutivos de quimioterapia incluyendo ifosfamida y vinorelbina. Se infundió G-CSF solo en los ciclos 1 y 3, y en combinación con la hGH en el ciclo 2. De este modo, la cinética de la movilización de las células progenitoras provocada por la quimioterapia y el G-CSF (ciclo 1) sirve como control intrapaciente para evaluar la movilización resultante de la quimioterapia, la hGH y el G-CSF (ciclo 2). Como consecuencia de la toxicidad acumulativa para la médula ósea por la quimioterapia, era de esperar que la movilización después del ciclo 2 fuera inferior a la movilización después del ciclo 1.

Estudio de movilización con rhG-CSF (ciclo 1 y 3)

- Administración de ifosfamida (3 g/m² intravenosamente (iv), una vez al día, días 1-4), uromitexan (un agente protector frente a la cistitis hemorrágica) (1 g/m² iv, tres veces al día, días 1-4), y vinorelbina (25 mg/m² iv, una vez al día, días 1 y 5).
- Administración de rhG-CSF (5 µg/kg una vez al día, sc (subcutánea) desde el día 6 hasta completar la recogida de las células CD34+ (la dosis de células objetivo es ≥ 8 x 10⁶ células CD34+ /kg de peso corporal).

Movilización con rhGH y rhG-CSF (ciclo 2)

- Administración de ifosfamida (3 g/m² iv, una vez al día, días 1-4), uromitexan (1 g/m² iv, tres veces al día, días 1-4), y vinorelbina (25 mg/m² iv, una vez al día, días 1 y 5).
- Co-administración de rhGH (100 µg/kg una vez al día, sc) y rhG-CSF (5 µg/kg una vez al día, sc) desde el día 6 hasta completar la recogida de las células CD34+ (la dosis de células objetivo es ≥ 8 x 10⁶ células CD34+/kg de peso corporal).

ES 2 330 193 T3

3. *Parámetros principales de actividad*

A) *Movilización*

5 Empezando el día +10, se evalúan los siguientes parámetros:

- Recuento absoluto de células CD34+/ μ L (diariamente en la sangre periférica, y una vez en las células sometidas a leucocitaféresis)
- 10 - Recuento absoluto de CFU-GM/ μ l (diariamente en la sangre periférica, y una vez en las células sometidas a leucocitaféresis)
- Recuento absoluto/ μ l de CFU-Meg, BFU-E, LTC-IC (en las células sometidas a leucocitaféresis)

15

B) *Recuperación hematológica*

Empezando el día +0, y hasta recuperación completa y estable, se evalúan los siguientes parámetros:

- 20 - Recuento absoluto de granulocitos/ μ l (diariamente)
- Recuento absoluto de plaquetas/ μ l (diariamente)
- Recuento absoluto de eritrocitos/ μ l (diariamente)
- 25 - Nadir de granulocitos
- Nadir de plaquetas
- 30 - Extensión y duración de la neutropenia
- Extensión y duración de la trombocitopenia
- Extensión y duración del soporte hematopoyético (transfusiones de plaquetas, transfusiones de RBC)
- 35 - Duración de la profilaxis infecciosa, e infecciones
- Hemorragias

40

4. *Parámetros principales de toxicidad*

- Crecimiento del tumor
- 45 - Síntomas clínicos e instrumentales
- Ensayos de laboratorio para las funciones cardíaca, hepática y renal

50 5. *Procedimiento de estudio*

A) *En la línea base*

- 55 - Completa historia médica, examen físico, electrocardiograma (EKG) con examen cardíaco, fracción de expulsión ventricular izquierda (LVEF) mediante escáner de escintigrafía multipropósito o ecografía, radiografía de pecho
- Prueba de embarazo (si procede)
- 60 - Prueba de HBV, HCV y HIV
- Recuento diferencial de sangre completa
- Recuento absoluto de células CD34+ circulantes y de CFU-GM
- 65 - Análisis químico de la sangre (transaminasas, fosfatasa alcalina en suero, gammaGT, LDH, bilirrubina total, BUN, creatinina, glicemia, Na, K, Ca, P, ácido úrico, proteínas totales, albúmina, colesterol, triglicéridos)

ES 2 330 193 T3

- Biopsia bilateral de la médula ósea
- Consentimiento informado

5

B) Evaluación de la movilización

- Evaluación diaria de células CD34+/ μL y CFU-GM/ μL en la sangre periférica, desde el día +10 hasta la leucocitaféresis
- Rendimiento total de células CD34+, CFU-GM, BFU-E, CFU-Meg, así como las LTC-IC en las células sometidas a leucocitaféresis
- Evaluación de la toxicidad por medio de exámenes clínicos e instrumentales (EKG, radiografía de pecho, y otros exámenes según sea requerido)
- Medida y evaluación de todos los parámetros del tumor después de finalizar el estudio de movilización

10

15

20

C) Evaluación de la recuperación hematológica

- Evaluación diaria de los recuentos de WBC, RBC y plaquetas
- Número de transfusiones de plaquetas
- Número de transfusiones de RBC
- Tipo y gravedad de enfermedades infecciosas e infecciones documentadas
- Evaluación clínica e instrumental de toxicidades aparte de la hematológica

25

30

6. Materiales y métodos

35

Quimioterapia y movilización de las PBPC

Después de proporcionar el consentimiento informado, por escrito, los pacientes recibieron tres ciclos consecutivos de ifosfamida (IFO, 3 g/m² iv, QD, días 1-4) y vinorelbina (VNR, 25 mg/m² iv, QD, días 1 y 5) (Figura 1). Después del primer y tercer ciclo de quimioterapia con IFO/VNR, se movilizaron las PBPC utilizando rhG-CSF solo (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, QD, sc), mientras que después del segundo ciclo de quimioterapia con IFONNR, la movilización de las PBPC fue provocada por rhG-CSF y rhGH (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, QD, sc). De este modo, la cinética de la movilización de las células progenitoras provocada por la quimioterapia y rhG-CSF (ciclo 1) sirvió como control intra-paciente para evaluar la movilización resultante de la quimioterapia, la rhGH y el rhG-CSF (ciclo 2). Se administró terapia de movilización desde el día 7 hasta que se completó la recogida de las células CD34+ (la dosis de células objetivo fue $\geq 8 \times 10^6$ células CD34+/kg peso corporal). Las recogidas de las PBPC empezaron cuando las células CD34+ circulantes fueron $\geq 20/\mu\text{L}$. Los parámetros a monitorizar diariamente que empezaron cuando los recuentos de glóbulos blancos (WBC) fueron $\geq 1,000/\mu\text{l}$ y hasta completar la leucocitaféresis incluyeron: los recuentos de WBC, las células CD34+, las células progenitoras hematopoyéticas dedicadas (CFU-Mix, BFU-E, CFU-GM) y las células progenitoras hematopoyéticas primitivas (LTC-IC).

50

Citometría de flujo

Se detectaron las células CD34+ por inmunofluorescencia directa. En resumen, las células de la capa leucocítica (1×10^6) incubadas con anticuerpos monoclonales HPCA-2 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton-Dickinson, San Jose, CA) o con un anticuerpo IgG1-FITC de ratón (B-D) como control negativo, se analizaron en un sistema de citometría de flujo con láser FACScan (B-D) equipado con un ordenador personal Macintosh PowerMac G3 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) utilizando el software Cell Quest (B-D).

60

Ensayo de CFU-Mix, BFU-E, CFU-GM

El ensayo de CFU-Mix, BFU-E, y CFU-GM se realizó como se ha descrito previamente. En resumen, se extendieron 1 a 5×10^4 células nucleadas procedentes de sangre movilizada en placas Petri de 35 mm en alícuotas de 1 ml de IMDM que contiene: suero fetal bovino al 30% (FBS, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada); 2-mercaptoetanol 10^{-4} M (Gibco, Grand Island, NY, USA); y metilcelulosa al 1,1% (p/v). Se estimularon los cultivos con interleucina-3 (10 ng/ml, Sandoz, Basel, Switzerland), factor estimulador de colonias de granulocitos (10 ng/ml, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (10 ng/ml, Sandoz) y

65

ES 2 330 193 T3

eritropoyetina (3 U/ml, Amgen Inc.). Se evaluó el crecimiento de las células progenitoras, según criterios previamente publicados, después de 14-18 días de incubación (37°C, 5% de CO₂) en una atmósfera humidificada. Se marcaron cuatro placas para cada punto de datos y los resultados se expresaron como la media ± SEM.

5

Ensayo de LTC-IC

Se realizó el ensayo de las células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) como se ha descrito previamente. En resumen, se resuspendieron las células de ensayo en medio completo que consiste en alfamedio (Gibco) suplementado con FBS (12,5%), suero de caballo (12,5%), L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol (10⁻⁴ M), inositol (0,2 mM), ácido fólico (20 μM) e hidrocortisona recientemente disuelta (10⁻⁶ M). La suspensión de células de ensayo (5 x 10⁶ células nucleadas) se sembró en cultivos que contenían una capa alimentadora de células M2-10B4 murinas irradiadas (8.000 cGy) (3 x 10⁴/cm², amablemente proporcionadas por Dr. C. Eaves, Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canada) tratadas mediante transferencia génica retroviral para producir IL-3 y G-CSF humanos. Después de 5 semanas de cultivo, las células no adherentes y las células adherentes recogidas por tripsinización se reunieron, se lavaron, y se ensayaron conjuntamente en cuanto a células clonogénicas en cultivos estándar de metilcelulosa a una concentración apropiada. El número total de células clonogénicas (esto es, CFU-Mix más BFU-E más CFU-GM) presentes en el LTC (cultivo a largo plazo) de 5 semanas proporciona una medida relativa del número de las LTC-IC originalmente presentes en la suspensión de ensayo. Se calcularon los valores absolutos de LTC-IC dividiendo el número total de células clonogénicas por 4, que es la producción media de células clonogénicas por las LTC-IC, según los estudios de análisis de dilución limitante publicados por otros autores.

25

7. Resultados del estudio clínico piloto

La Fig. 1 ilustra el plan de tratamiento al que fueron sometidos los pacientes. Cinco pacientes con recaída de la enfermedad de Hodgkin (Tabla + anterior) recibieron tres ciclos de tratamiento (Fig. 1). El primer y tercer ciclo consistieron en la administración de ifosfamida a 3 g/m², administrada intravenosamente (iv) diariamente durante los días 1 a 4 y en la administración de vinorelbina 25 mg/m² iv, diariamente, los días 1 y 5. Posteriormente, se trataron los pacientes con el factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante (rhG-CSF) a 5 μg/kg sc, diariamente, empezando el día 7. Se continuó el tratamiento hasta el día 20, o hasta que se completó la leucocitaféresis, si se alcanzó antes el pico de células CD34+.

El ciclo 2 consistió en el mismo plan de tratamiento para ifosfamida y vinorelbina, que fue seguido después por la administración de factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante (rhG-CSF, 5 μg/kg iv) más la hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH, 100 μg/kg sc), administrados ambos diariamente, empezando el día 7 hasta el 20 o hasta que se completó la leucocitaféresis.

Los resultados de los parámetros más relevantes medidos en los cinco primeros pacientes que participaron en el estudio clínico se muestran en las Fig. 2 a 5. En todos los pacientes, el ciclo 1 (utilizando G-CSF solo como agente movilizante) representó un control intra-paciente. Sirvió para evaluar la capacidad de hGH + G-CSF (ciclo 2) para mejorar la movilización de las células madre/progenitoras inducida por la quimioterapia y el G-CSF. El ciclo 3 mostró entonces las capacidades de movilización del paciente con G-CSF solo de nuevo.

Se debe hacer notar que todos los pacientes implicados en este estudio piloto fueron incluidos en este estudio porque fueron clasificados como "malos" movilizadores, lo que significa que la movilización de las células madre hematopoyéticas se redujo en cada uno de los cinco pacientes con respecto a la media de los pacientes que sufren quimioterapia con la misma enfermedad. El umbral es un número de aproximadamente 10 células CD34+/μI, o menos de aproximadamente 3 x 10e6 células/μI. Se debe hacer notar también que la segunda y la tercera leucocitaféresis se ven usualmente dificultadas por las leucocitaféresis previas, esto es el número de células, en particular el número de células madre movilizadas se espera que sea cada vez más bajo cuantos más ciclos de tratamiento y leucocitaféresis sean aplicados al paciente.

La Fig. 2 ilustra el recuento de glóbulos blancos (WBC) por microlitro en los pacientes con recaída de la enfermedad de Hodgkin que reciben tratamiento según el plan de tratamiento de tres ciclos como se ha indicado antes. El recuento de glóbulos blancos (WBC) registrado en los 5 pacientes después de cada ciclo de quimioterapia se muestra en la Figura 2. La adición de rhGH en el segundo ciclo no afectó sustancialmente a la cinética del recuento de WBC.

La Fig. 3 muestra la cinética de movilización de las células CD34⁺ por microlitro de sangre en pacientes con recaída de la enfermedad de Hodgkin que reciben el tratamiento anterior. La relación de picos representa el valor máximo de células CD34⁺ por μI de sangre después de rhG-CSF + rhGH dividido por el valor máximo de células CD34⁺ por μI de sangre después de rhG-CSF. Como se muestra, en 5 de los 5 casos los valores de los picos de células CD34⁺ detectados después de rhG-CSF más rhGH fueron más altos en comparación con los observados después de rhG-CSF solo. La relación media de los picos, esto es, el valor máximo de células CD34⁺ después de rhG-CSF + rhGH/valor máximo de células CD34⁺ después de rhG-CSF, fue 2,38 (intervalo, 1,6 a 3,3). En todos los pacientes, las cantidades máximas de células CD34⁺ recuperadas por leucocitaféresis fueron mucho más altas después de la administración de la combinación de hGH y G-CSF (ciclo 2) en comparación con el G-CSF solo (ciclos 1 y 3). Las relaciones de los picos se resumen en la Tabla 2 que sigue y se ilustran en la Fig. 6. Varían entre 1,6 y 3,3 y tienen

un valor medio de 2,38, lo que significa que el tratamiento de combinación dio como resultado más del doble de las células CD34+ movilizadas. Este resultado es particularmente notable, debido a que los pacientes fueron clasificados como malos movilizados.

5 La Fig. 4 muestra la cinética de movilización de las células formadoras de colonias totales (CFC) por mililitro de sangre en pacientes con recaída en la enfermedad de Hodgkin que reciben el tratamiento indicado antes. Las CFC totales incluyen las CFC granulocitos-macrófagos (CFU-GM), la unidad formadora de estallido eritroide (BFU-E) y las CFC multipotentes (CFU-Mix). Los datos se expresan como valores medios derivados de cultivos por cuadruplicado. Las relaciones de los picos representan el valor máximo de las CFC por ml de sangre después de rhG-CSF + rhGH
10 dividido por el valor máximo de las CFC por ml de sangre después de rhG-CSF.

En todos los casos, la movilización de las CFC se mejoró por la adición de rhGH a rhG-CSF con una relación media de picos de 2,8 (intervalo, 1,1 a 4,6).

15 Los resultados del análisis de las células formadoras de colonias apoyan los resultados positivos del análisis de células CD34+. La relación media de los picos calculada en esta serie experimental (véase la Tabla 2 que sigue) es 2,8, lo que significa que el tratamiento combinado casi triplicó el rendimiento de las CFC.

La Fig. 5 muestra la movilización de las células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) por mililitro de
20 sangre en pacientes con recaída de la enfermedad de Hodgkin que reciben el tratamiento indicado antes. Una vez más, los datos se expresan como valores medios derivados de cultivos por cuadruplicado. La relación de los picos representa el valor máximo de LTC-IC por ml de sangre después de rhG-CSF + rhGH dividido por el valor máximo de LTC-IC por ml de sangre después de rhG-CSF. De forma interesante, la adición de rhGH a rhG-CSF mejoró significativamente la movilización de las PBPC con una relación media de picos de 49 (intervalo, 2 a 165).

25 La cantidad de LTC-IC se evalúa en el ensayo de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC). Utilizando la técnica de cultivo a largo plazo (LTC) se puede conseguir fácilmente una producción sostenida *in vitro* de células linfomieloides, siempre que esté presente una capa de estroma, poniendo las células hematopoyéticas en cultivo líquido a una concentración celular relativamente alta, con suplementos, temperatura y condiciones de alimentación apropiados. El sistema de LTC, basado en el re-establecimiento *in vitro* de los tipos esenciales de células y el mecanismo responsable de la producción localizada y sostenida de células hematopoyéticas en la médula *in vivo*, ofrece un método capaz de investigar no solamente los sucesos proliferativos y de diferenciación, sino también los tipos de células autorrenovables de cualquier tipo de células clonogénicas. Un periodo de tiempo de 5 a 8 semanas entre la iniciación del LTC y la evaluación de los números de progenitoras clonogénicas permite cuantificar las células hematopoyéticas primitivas, las llamadas "células iniciadoras de cultivo a largo plazo" (LTC-IC) que tienen potencial de autorrenovación y características fenotípicas que se solapan con las de las células transplantables murinas de repoblación *in vivo* (Sutherland *et al.*, 1989; Petzer *et al.*, 1996 y Lemieux *et al.*, 1995). Los ensayos de dilución limitante permiten calcular la frecuencia de las LTC-IC y su potencial proliferativo (número de CFU-C generadas por cada LTC-IC).
40

Para realizar el ensayo de las LTC-IC, se resuspendieron las células nucleadas de la sangre periférica en medio completo que consiste en medio alfa (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (12,5%), suero de caballo (12,5%), L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol (10^{-4} M), inositol (0,2 mM), ácido fólico ($20 \mu\text{M}$) e hidrocortisona recientemente disuelta (10^{-6} M). Se siembran entonces las células sanguíneas (5×10^6) en cultivos que contienen una capa de alimentación de células murinas M210B4 irradiadas (8.000 cGy) ($3 \times 10^4/\text{cm}^2$) preparadas por transferencia génica retroviral para producir IL-3 y G-CSF humanos (Sutherland *et al.*, 1994). Después de 5 semanas de cultivo, las células no adherentes y las células adherentes recogidas por tripsinización se reunieron, se lavaron, y se ensayaron conjuntamente en cuanto a células clonogénicas en cultivos estándar de metilcelulosa a una concentración apropiada. El número total de células clonogénicas (esto es, CFU-Mix más BFU-E más CFU-GM) presentes en el LTC de 5 semanas proporciona una medida relativa del número de las LTC-IC originalmente presentes en la suspensión de ensayo (Udomsakdi *et al.*, 1992). Se calcularon los valores absolutos de LTC-IC dividiendo el número total de células clonogénicas por 4, que es la producción media de células clonogénicas por LTC-IC, según los estudios de análisis de dilución limitante (Udomsakdi *et al.*, 1992).
50

55 Al menos una porción de las LTC-IC no presenta el antígeno CD34 en su superficie celular, y por tanto carece del clásico marcador de las células progenitoras hematopoyéticas primitivas. Hay también indicaciones de que la expresión del antígeno CD34 puede cambiar de positiva a negativa o viceversa, ya sea en cultivo o *in vivo*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de las LTC-IC apoyan una actividad muy eficiente de una combinación
60 de hGH y G-CSF como agentes movilizantes de las células madre hematopoyéticas primitivas. La cantidad de LTC-IC movilizadas fue mucho mayor que lo esperado. Como se puede deducir de la Fig. 5, la cantidad de LTC-IC por mililitro de sangre recuperada del paciente por leucocitaféresis fue claramente superior después del tratamiento de los pacientes con una combinación de rhG-CSF y rhGH (ciclo 2) en comparación con el tratamiento con rhG-CSF solo (ciclos 1 y 3). Los resultados para el paciente 5 no estuvieron disponibles.

65 Los valores de los picos (véase la Tabla 2, Fig. 6) presentan una gran variedad entre los pacientes individuales. Ellos varían entre 165 y 6,5, siendo el valor medio 61. Se muestra claramente el efecto pronunciado por hGH y G-CSF sobre la movilización de las LTC-IC.

La actividad superior del tratamiento de combinación con GH y G-CSF sobre la movilización de las LTC-IC es especialmente notable y fue totalmente inesperada, en primer lugar porque todos los pacientes participantes en el estudio fueron calificados como malos movilizadores, y en segundo lugar porque las altas cantidades inesperadas de células precursoras hematopoyéticas primitivas se observaron en el segundo ciclo de leucocitaféresis del paciente, que ya está usualmente obstaculizado por el primer ciclo de movilización.

TABLA 2

Relaciones de los picos para células CD34+, CFC y LTC-IC

Tipo de célula	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Media
CD 34 +	2,8	2,5	1,6	1,7	3,3	2,38
CFC	4,6	1,5	1,1	2,3	4,5	2,8
LTC-IC	165	9,3	6,3	64	n.d.*	61,15

*no determinado

Además, los resultados obtenidos utilizando el ensayo de las LTC-IC se observan con respecto a los resultados obtenidos midiendo el recuento de las células CD34+ (Fig. 3). Mientras que la administración combinada de GH y G-CSF produjo un aumento de la movilización de las células CD34+ de dos a tres veces, lo que es ya una mejora importante, el impacto del tratamiento combinado sobre la movilización de las LTC-IC está en el intervalo de aproximadamente 50 veces.

Las Fig. 7 a 9 muestran las cantidades totales de células CD34+ por kilogramo de peso corporal del paciente (Fig. 7), las CFC por kilogramo (Fig. 8) y las LTC-IC por kilogramo (Fig. 9) recuperadas durante los ciclos 1, 2 y 3. Confirmando los resultados indicados antes a partir de los estudios cinéticos, en todos los casos el ciclo 2 fue el ciclo en el que se movilizaron y se recogieron durante la leucocitaféresis las cantidades más altas de células CD34+, CFC o LTC-IC.

Recogida de las PBPC

Después del primer ciclo de quimioterapia, solamente 2 de 5 pacientes alcanzaron niveles de células CD34+ que permitieron la recogida de las PBPC mientras que no se pudo realizar ninguna recogida en los 3 pacientes restantes. En sorprendente contraste, 5 de los 5 pacientes fueron elegibles para la recogida de las PBPC después de movilización con rhG-CSF y rhGH. Sin embargo, debido a la cantidad de células CD34+ recogidas después del primer ciclo (12×10^6 /kg peso corporal), el paciente #4 sufrió leucocitaféresis solamente en el primer ciclo. Los datos de la recogida se resumen en la Tabla 2.

Efectos secundarios

Durante la inyección de rhGH, un paciente con tolerancia reducida a la glucosa presentó una hiperglucemia transitoria requiriendo terapia de insulina. La hiperglucemia fue bien controlada con insulina y no necesitó la discontinuación de rhGH de forma que el paciente pudo completar satisfactoriamente la movilización y recogida completa de las PBPC. Los niveles de glucosa en sangre bajaron hasta los valores normales dos días después de parar la terapia con rhGH. Ningún otro efecto secundario específico pudo ser adscrito a la terapia con rhGH.

TABLA 2

Células CD34+/kg peso corporal recogidas después de cada ciclo de quimioterapia con IFO/VNR

Ciclo	Citocina(s)	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
1	rhG-CSF	0	0	5×10^6	12×10^6	0
2	rhG-CSF+rhGH	15×10^6	5×10^6	6×10^6	nd	7×10^6
3	rhG-CSF	0	$0,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	nd	nd

Conclusiones

Los nuevos hallazgos descritos anteriormente representan una importante mejora de la técnica de movilización. La movilización de las células progenitoras desempeña un papel fundamental en al menos tres campos clínicamente importantes, especialmente el trasplante autólogo de médula ósea, el trasplante de médula ósea alogénico y semia-
logénico, y la terapia génica.

En los donantes normales, la movilización va acompañada por un tratamiento con G-CSF durante unos días. Hasta ahora los sustitutos o adjuntos del G-CSF o bien han fallado para mejorar la movilización alcanzada con G-CSF solo, o bien han dado como resultado una mejora limitada compensada por una toxicidad sustancialmente aumentada (véanse las combinaciones de rhG-CSF con rhSCF o con rhIL3). La movilización con G-CSF solo, tiene limitaciones tanto cuantitativas como cualitativas. Cuantitativamente, sólo el 50% de los donantes de células progenitoras pueden sufrir una única leucocitaféresis. La mitad restante o bien falla en producir una cantidad óptima de células progenitoras (esto es $\geq 5 \times 10^6$ células CD34+/kg), o bien requiere leucocitaféresis múltiples (hasta 4) en días consecutivos. Cualquier procedimiento aplicable a donantes normales, y capaz de aumentar el rendimiento de las células progenitoras circulantes en ausencia de toxicidad añadida, tiene un profundo impacto sobre la movilización y obtención de células madre/progenitoras.

Otro hallazgo inesperado fue la actividad del tratamiento a corto plazo. Dado el periodo de tiempo extremadamente corto en el que se administran la hGH y el G-CSF (máximo 13 días), no se observaron ni se esperaron efectos adversos graves. En la mayoría de los casos, el tratamiento se podría terminar mucho antes puesto que el valor del pico de las células CD 34+ se observó ya antes del final del tratamiento. La leucocitaféresis se realizó entonces directamente y se paró el tratamiento posterior hasta el ciclo 3.

Referencias

Adelman, J.P., Hayflick, J. S., Vasser, M., and Seeburg, P. H. (1983). *In vitro* deletional mutagenesis for bacterial production of the 20,000-dalton form of human pituitary growth hormone. *DNA* 2, 183-193.

Albertsson-Wikland, K., Westphal, O., and Westgren, U. (1986), Daily subcutaneous administration of human growth hormone in growth hormone deficient children. *Acta Paediatr. Scand.* 75, 89-97.

Alexander, W.S. (1998). Cytokines in hematopoiesis. *Int. Rev. Immunol.* 16, 651-682.

Anderlini, P. and Korbling, M. (1997), The use of mobilized peripheral blood stem cells from normal donors for allografting. *Stem. Cells* 15, 9-17.

Becker, G.W., Bowsher, R.R., Mackellar, W. C., Poor, M.L., Tackitt, P.M., and Riggin, R.M.(1987). Chemical, physical, and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 478-487.

Becker, G.W., Tackitt, P., Bromer, W.W., Lefeber, D.S., and Riggin, R.M. (1988). Isolation and characterization of a sulfoxide and a desamido derivative of biosynthetic human growth hormone. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10, 326-337.

Bewley, T.A. and Li, C.H. (1975). The chemistry of human pituitary growth hormone. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 42: 73-166, 73-166.

Cunningham, B.C., Mulkerrin, M.G., and Wells, J.A. (1991). Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* 253, 545-548.

DeNoto, F.M., Moore, D.D., and Goodman, H.M. (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic. Acids. Res.* 9, 3719-3730.

Derfalvi, B., Sallai, P., Nemet, K., Szalai, C., Kenesei, E., Tulassay, T., and Falus, A. (1998). [The *in vitro* effect of recombinant human growth hormone on lymphocyte and granulocyte function in healthy and uremic children]. *Orv. Hetil.* 139, 1847-1850.

Fischer, A., Haddad, E., Jabado, N., Casanova, J.L., Blanche, S., Le Deist, F., and Cavazzana-Calvo, M. (1998), Stem cell transplantation for immunodeficiency. *Springer Semin. Immunopathol.* 19, 479-492.

Geffner, M. (1997), Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on T- and B-lymphocytes and immune function. *Acta Paediatr. Suppl.* 423: 76-9, 76-79.

Gertler, A., Shamay, A., Cohen, N., Ashkenazi, A., Friesen, H. G., Levanon, A., Gorecki, M., Aviv, H., Haddad, D., and Vogel, T. (1986), Inhibition of lactogenic activities of ovine prolactin and human growth hormone (hGH) by a novel form of a modified recombinant hGH. *Endocrinology* 118, 720-726.

- Gianni, A.M., Bregni, M., Siena, S., Villa, S., Sciorelli, G.A., Ravagnani, F., Pellegris, G., and Bonadonna, G.** (1989). Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells. A changing role for high dose chemo-radiotherapy ? *Hemato. Oncol.* 7, 139-148.
- 5 **Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R., and Seeburg, P.H.** (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281, 544-548.
- 10 **Haas R, Murea S** (1995): The role of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization and transplantation of peripheral blood progenitor and stem cells [published erratum appears in *Cytokines Mol Ther* 1996 Mar; 2 (1): 136] *Cytokines Mol Ther* 1: 4 249-70.
- Heather J. et al.** *Blood* 74; 1563-1570 (1989).
- 15 **Hendricks, C.M., Eastman, R.C., Takeda, S., Asakawa, K., and Gorden, P.** (1985), Plasma clearance of intravenously administered pituitary human growth hormone: gel filtration studies of heterogeneous components. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60, 864-867.
- 20 **Henry, D.** (1997). Haematological toxicities associated with dose-intensive chemotherapy, the role for and use of recombinant growth factors. *Ann. Oncol.* 8 Suppl 3: S7-10, S7-10.
- Jorgensen, J.O., Flyvbjerg, A., Dinesen, J., Lund, H., Albert, K.G., Orskov, H., and Christiansen, J.S.** (1987). Serum profiles and short-term metabolic effect of pituitary and authentic biosynthetic human growth hormone in man. A double-blind cross-over study. *Acta Endocrinol.* (Copenh.) 116, 381-386.
- 25 **Jorgensen, K.D., Monrad, J.D., Brondum, L., and Dinesen, B.** (1988). Pharmacokinetics of biosynthetic and pituitary human growth hormones in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 63, 129-134.
- 30 **Kimata, H. and Yoshida, A.** (1994). Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on immunoglobulin production by and growth of human B células. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 635-641.
- Kotzmann, H, Riedl, M., Clodi, M., Barnas, A., Kaider, A., Hocker, P. and Luger, A.** (1996). The influence of growth hormone substitution therapy on erythroid and myeloid progenitor cell and peripheral blood cells in adult patients with growth hormone deficiency. *Eur. J. of Clin. Invest.* 26, 1175-1181.
- 35 **Larsson, K., Bjorkstrand, B., and Ljungman, P.** (1998), Faster engraftment but no reduction in infectious complications after peripheral blood stem cell transplantation compared to autologous bone marrow transplantation. *Support. Care Cancer* 6, 378-383.
- 40 **Lemieux ME, Rebel VI, Landsorp PM, et al.** Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood* 86: 1339, 1995.
- 45 **Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, Catani L, Rondelli D, Ratta M, Tura S** (1998). Biological characterization of CD34+ cells mobilized into peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 22 Suppl 5, 47-50.
- Lewis, U.J., Peterson, S.M., Bonewald, L.F., Seavey, B.K., and VanderLaan, W.P.** (1977). An interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 252, 3697-3702.
- 50 **Lewis, U.J., Singh, R.N., Bonewald, L.F., Lewis, L.J., and VanderLaan, W. P.** (1979), Human growth hormone: additional members of the complex. *Endocrinology* 104, 1256-1265.
- Lewis, U.J., Singh, R.N., Bonewald, L F., and Seavey, B. K.** (1981). Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation. *J. Biol. Chem.* 256, 11645-11650.
- 55 **Lewis, U.J., Singh, R.N., VanderLaan, W.P., and Tutwiler, G. F.** (1977). Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymic modification. *Endocrinology* 101, 1587-1603.
- Merchav, S., Tatarsky, I., and Hochberg, Z.** (1988). Enhancement of erythropoiesis *in vitro* by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I. *Br. J. Haematol.* 70, 267-271.
- 60 **Moore, J.A., Rudman, C.G., MacLachlan, N.J., Fuller, G.B., Burnett, B., and Frane, J. W.** (1988). Equivalent potency and pharmacokinetics of recombinant human growth hormones with or without an N-terminal methionine. *Endocrinology* 122, 2920-2926.
- 65 **Petzer AL, Hogge DE, Lansdorp PM, Reid DS, Eaves CJ.** Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) *in vitro* and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93: 1470, 1996.

ES 2 330 193 T3

Siena et al. *Blood* 74; 1905-1914 (1989)).

Siena et al. *Blood* 77; 400-409 (1991)).

5 **Singh, R.N., Seavey, B.K., Rice, V.P., Lindsey, T.T., and Lewis, U.J.** (1974). Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. *Endocrinology* 94, 883-891.

Stolar, M.W., Amburn, K., and Baumann, G. (1984). Plasma “big” and “big-big” growth hormone (GH) in man: an oligomeric series composed of structurally diverse GH monomers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 212-218.

10 **Stolar, M.W. and Baumann, G.** (1986). Big growth hormone forms in human plasma: immunochemical evidence for their pituitary origin. *Metabolism* 35, 75-77.

15 **Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AJ, Dragowskas W, Lansdorp PM.** Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 74: 1563, 1989.

Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Philips GL, Hogge DE. Kinetics of committed and primitive blood progenitor mobilization after chemotherapy and growth factor treatment and their use in autotransplants. *Blood* 83: 3808, 1994.

20 **Sutherland HJ, Hogge DE, Cook D, Eaves CJ.** Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis. *Blood* 81: 1465, 1993.

25 **Thorlacius-Ussing, O.** (1987). Zinc in the anterior pituitary of rat: a histochemical and analytical work. *Neuroendocrinology.* 45, 233-242.

Tian, Z.G., Woody, M.A., Sun, R., Welniak, L.A., Raziuddin, A., Funakoshi, S., Tsarfaty, G., Longo, D.L., and Murphy, W.J. (1998). Recombinant human growth hormone promotes hematopoietic reconstitution after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Stem. Cells* 16, 193-199.

30 **To LB, Shepperd KM, Hailock DN et al.** Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol* (1990); 18, 442-447.

35 **Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ.** Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood* 80: 2513, 1992.

Valerio, G., Di Maio, S., Salerno, M., Argenziano, A., Badolato, R., and Tenore, A. (1997). Assessment of red blood cell indices in growth-hormone-treated children. *Horm. Res.* 47, 6266.

40 **Van Hoef, M.E.** (1998). Haematological recovery after high-dose consolidation chemotherapy with peripheral blood progenitor cell rescue: the effects of the mobilization regimen and post-transplant growth factors. *Neth. J. Med.* 52, 30-39.

45 **Vihervuori, E., Virtanen, M., Koistinen, H., Koistinen, R., Seppala, M., and Siimes, M. A.** (1996). Hemoglobin level is linked to growth hormone-dependent proteins in short children. *Blood* 87, 2075-2081.

Waters, T.M., Bennett, C.L., Pajeau, T.S., Sobocinski, K.A., Klein, J.P., Rowlings, P.A., and Horowitz, M.M. (1998). Economic analyses of bone marrow and blood stem cell transplantation for leukemias and lymphoma: what do we know? *Bone Marrow Transplant.* 21, 641-650.

50 **Weaver, A. and Testa, N.G.** (1998). Stem cell factor leads to reduced blood processing during apheresis or the use of whole blood aliquots to support dose-intensive chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 22,33, -38.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de la hormona del crecimiento o uno de sus derivados para la fabricación de un medicamento para aumentar, en un paciente que necesite la regeneración hematopoyética, el número de células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis, para proporcionar dichas células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, en una cantidad suficiente para un trasplante autólogo.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende además uno o varios compuestos elegidos entre los siguientes grupos de compuestos: factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas, quimiocinas, anticuerpos monoclonales.
- 15 3. El uso según la reivindicación 2, en el que el grupo de los factores de crecimiento hematopoyético comprende trombopoyetina (TPO), el grupo de las citocinas comprende IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), G-CSF, GM-CSF o SCF; el grupo de las quimiocinas comprende MIP-1 α , MIP-1, MIP-2 o EU-2; el grupo de los anticuerpos monoclonales comprende anticuerpos anti-VLA-4.
- 20 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende además G-CSF.
- 25 5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende la hormona del crecimiento y el G-CSF.
- 30 6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, son células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC).
- 35 7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para tratar una enfermedad neoplásica, leucemia, linfoma, un trastorno hematológico, tumores malignos, anormalidades hematopoyéticas establecidas congénitamente o genéticamente, anemia, anemia aplásica, neutropenia y/o osteopetrosis.
- 40 8. El uso según la reivindicación 7, en el que el linfoma es linfoma de Hodgkin.
- 45 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aumento está mediado por la movilización de las células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis en el paciente a partir de la médula ósea.
- 50 10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el número de células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica, capaces de regenerar la hematopoyesis en un ser humano es al menos aproximadamente 50, 100, 500 o 1000 células por mililitro de sangre.
- 55 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hormona del crecimiento se administra en una cantidad de 10 a 500 μg por kg, por administración.
- 60 12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hormona del crecimiento se administra en una cantidad de aproximadamente 100 μg por kg, por administración.
- 65 13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en el que el G-CSF se administra en una cantidad de 1 a 100 μg por kg al día.
14. El uso según la reivindicación 13, en el que el G-CSF se administra en una cantidad de aproximadamente 5 a 10 μg por kg al día.
15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la administración se realiza por las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica u oral.
16. El uso según la reivindicación 15, en el que la administración se realiza subcutáneamente.
17. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la administración es de una o tres veces al día.
18. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 17, en el que la administración de la hormona del crecimiento se realiza tres veces al día y la administración del G-CSF se realiza una vez al día.
19. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la administración se realiza a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 a 14 días o, hasta la leucocitaféresis, hasta la movilización o periferización de las células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo*, hasta el aumento del número de células circulantes capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o hasta el injerto.

ES 2 330 193 T3

20. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la administración se realiza antes o después de la quimioterapia, radioterapia, terapia mielotóxica o mielodepresiva, trasplante de células capaces de regenerar la hematopoyesis *in vivo* o trasplante de médula ósea.

5 21. El uso según la reivindicación 20, en el que la administración empieza aproximadamente siete días después del comienzo de un tratamiento quimioterapéutico o aproximadamente 2 días después del final de un tratamiento quimioterapéutico.

10 22. El uso según la reivindicación 21, en el que la administración se realiza después del tratamiento quimioterapéutico con ifosfamida y/o vinorelbina.

23. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células CD34 negativas pluripotentes de la sangre periférica se recuperan por leucocitaféresis.

15 24. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana.

20 25. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hormona del crecimiento es hormona del crecimiento recombinante.

26. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el G-CSF es G-CSF recombinante.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

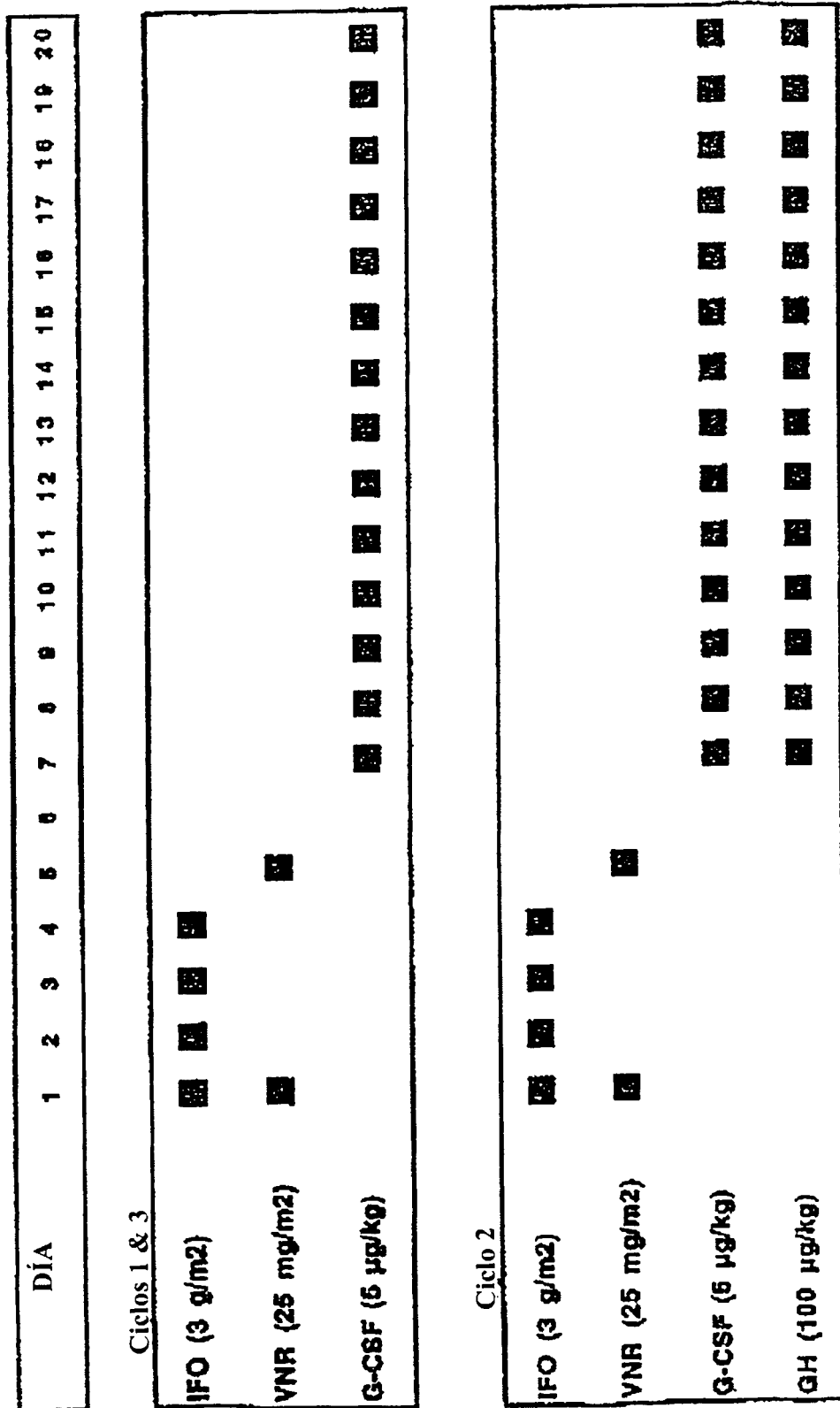


Fig. 1

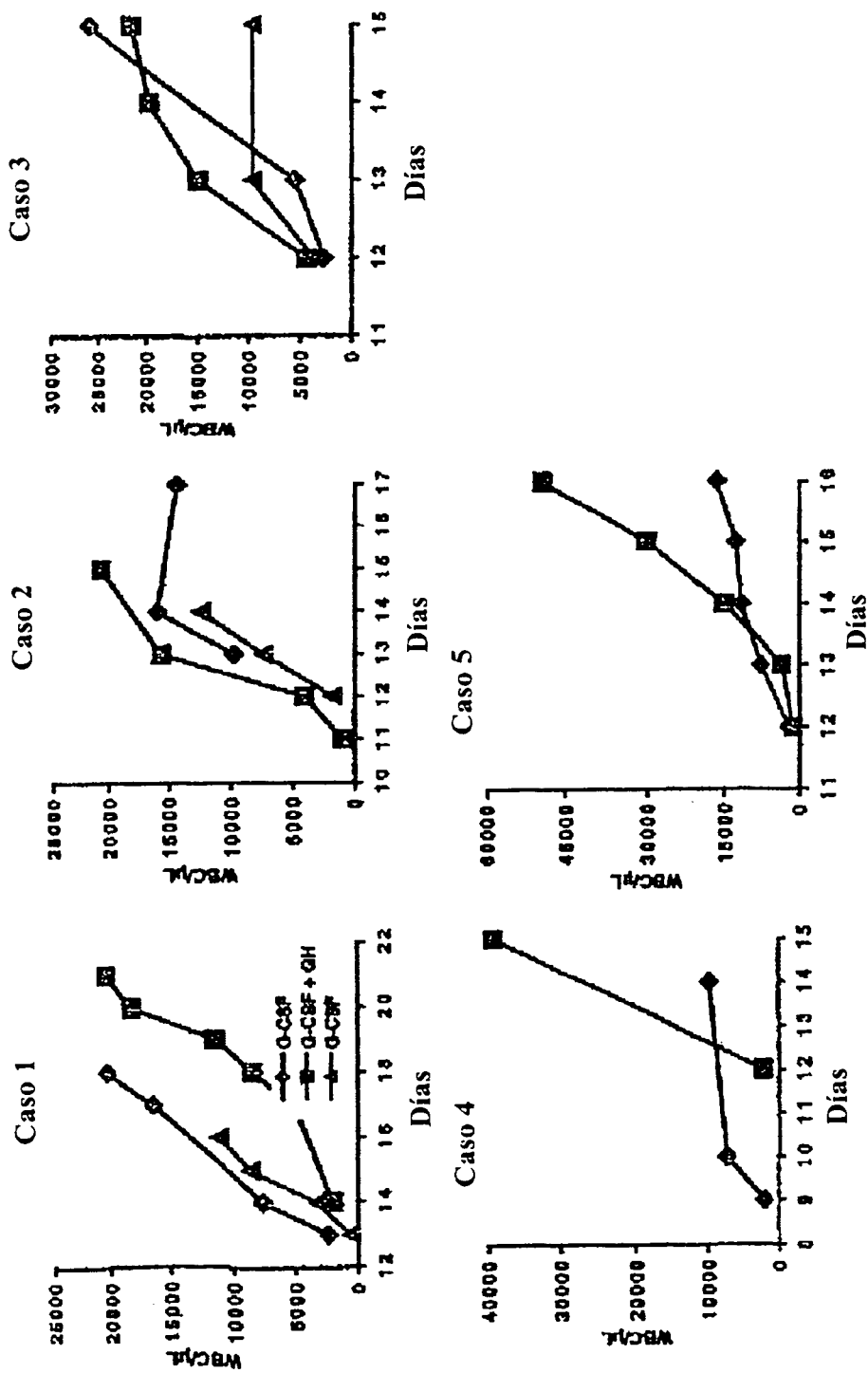


Fig. 2

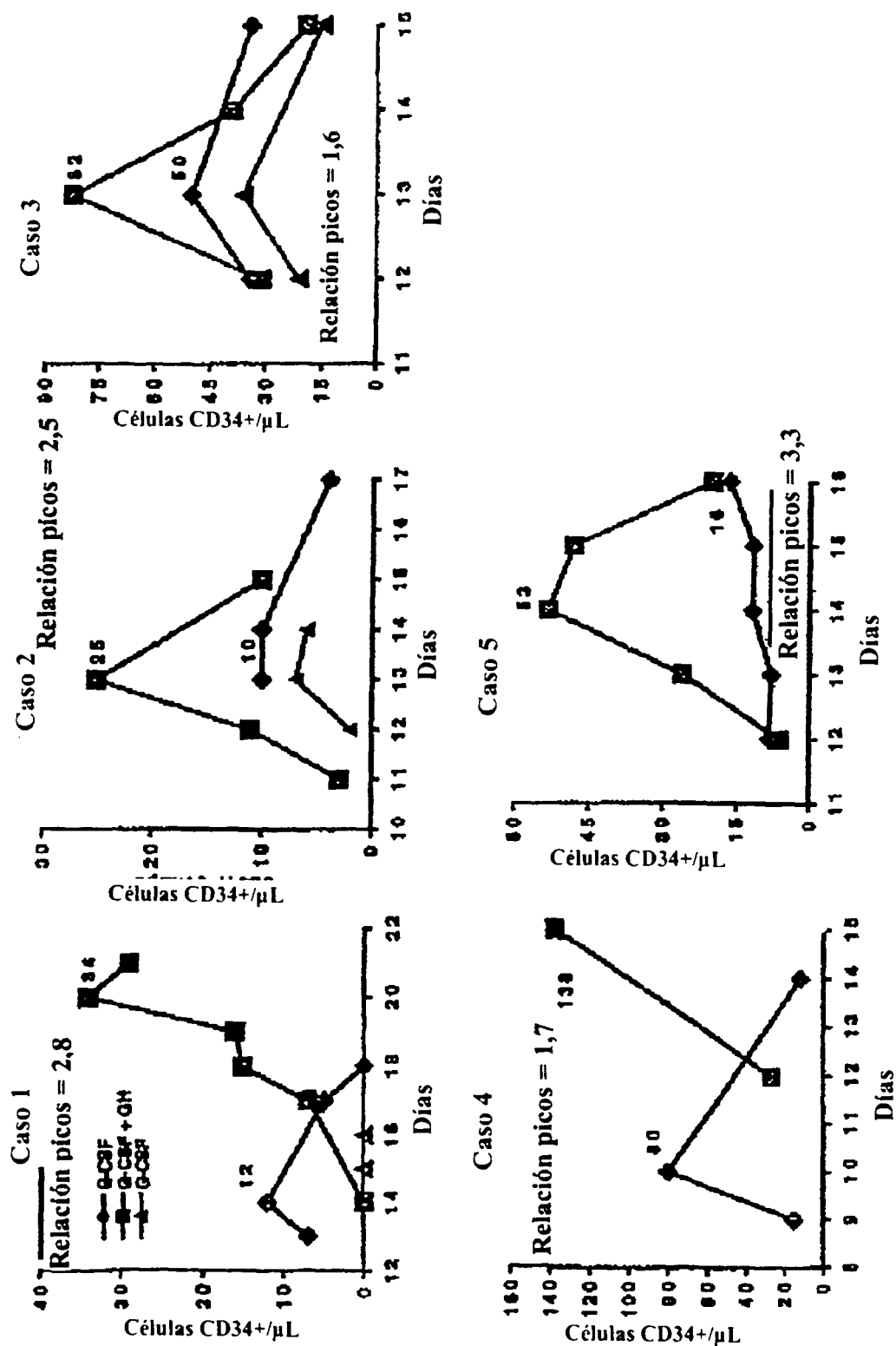
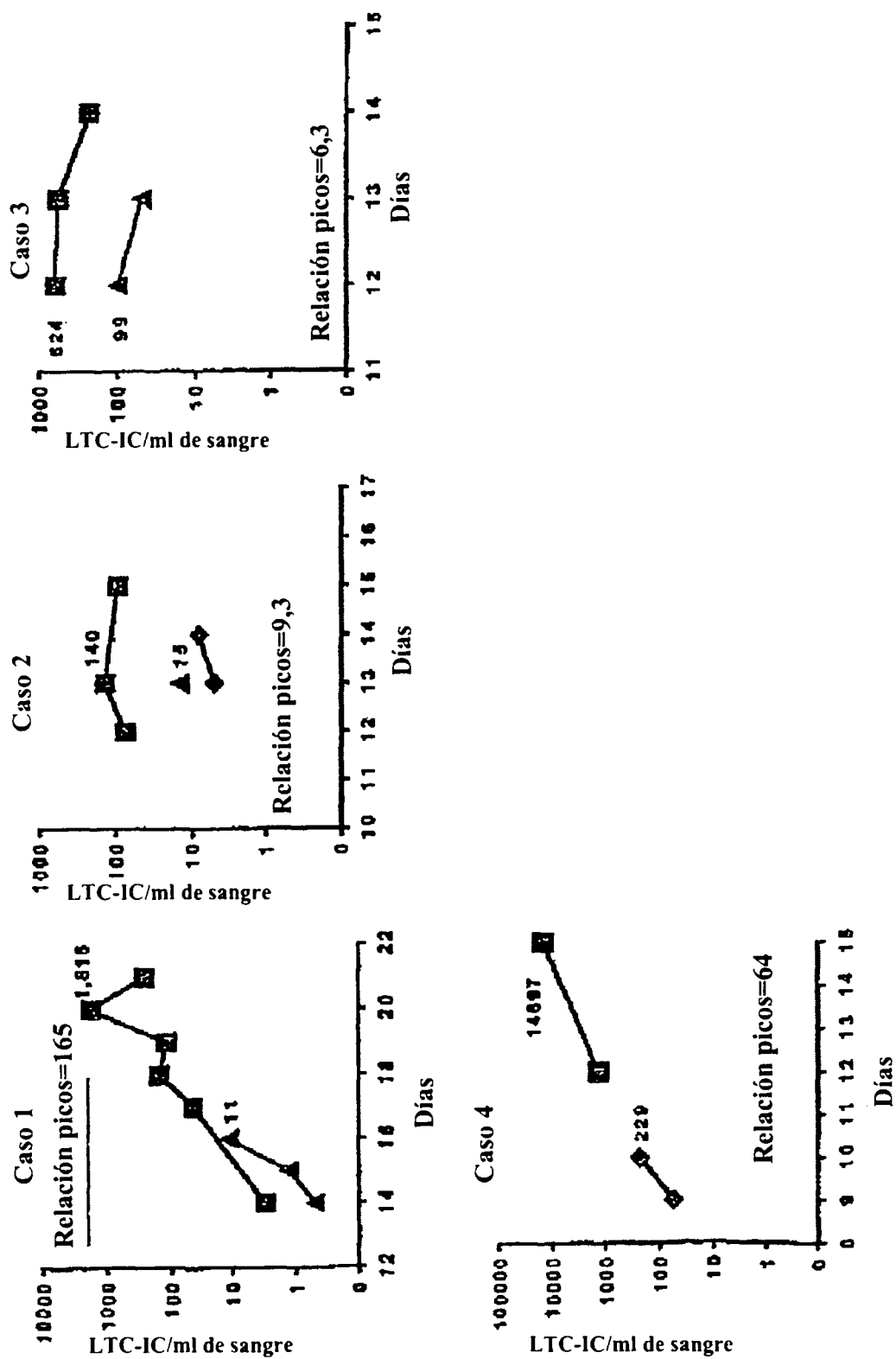


Fig. 3



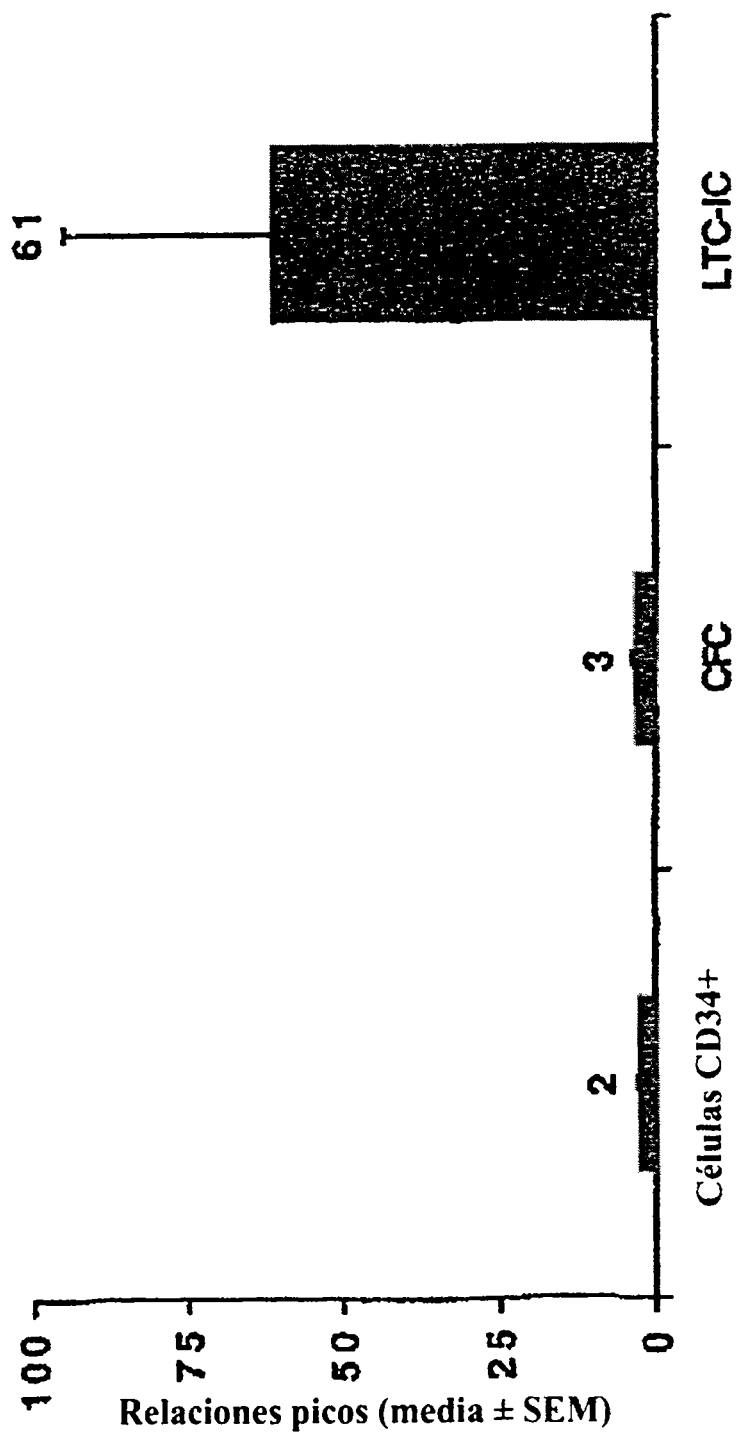


Fig. 6

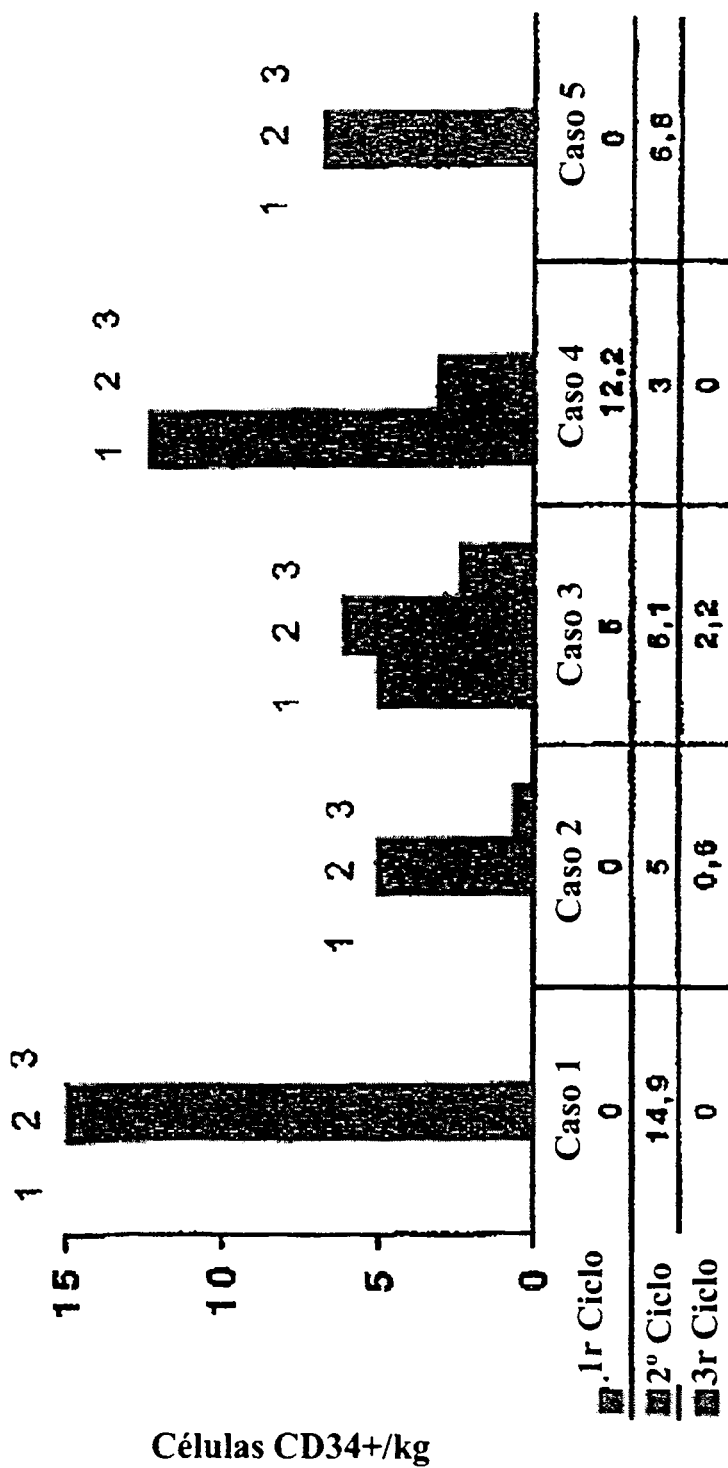


Fig. 7

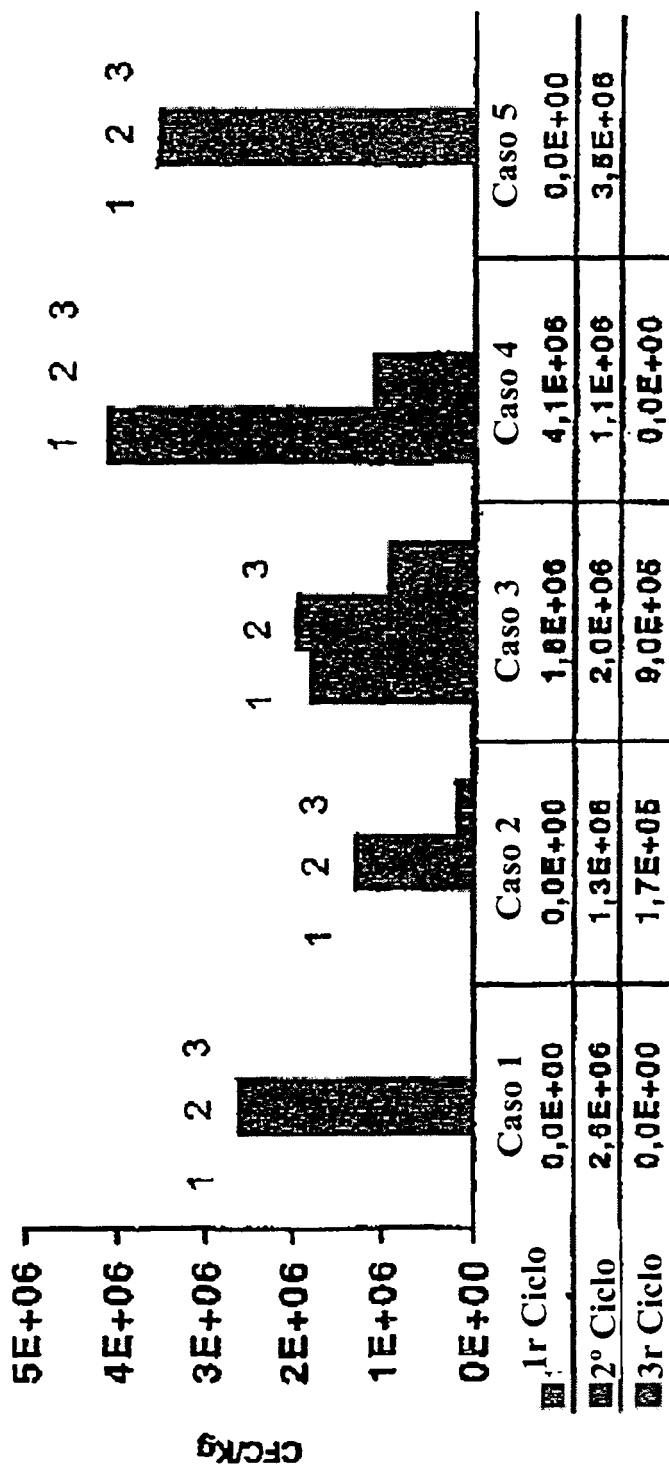


Fig. 8

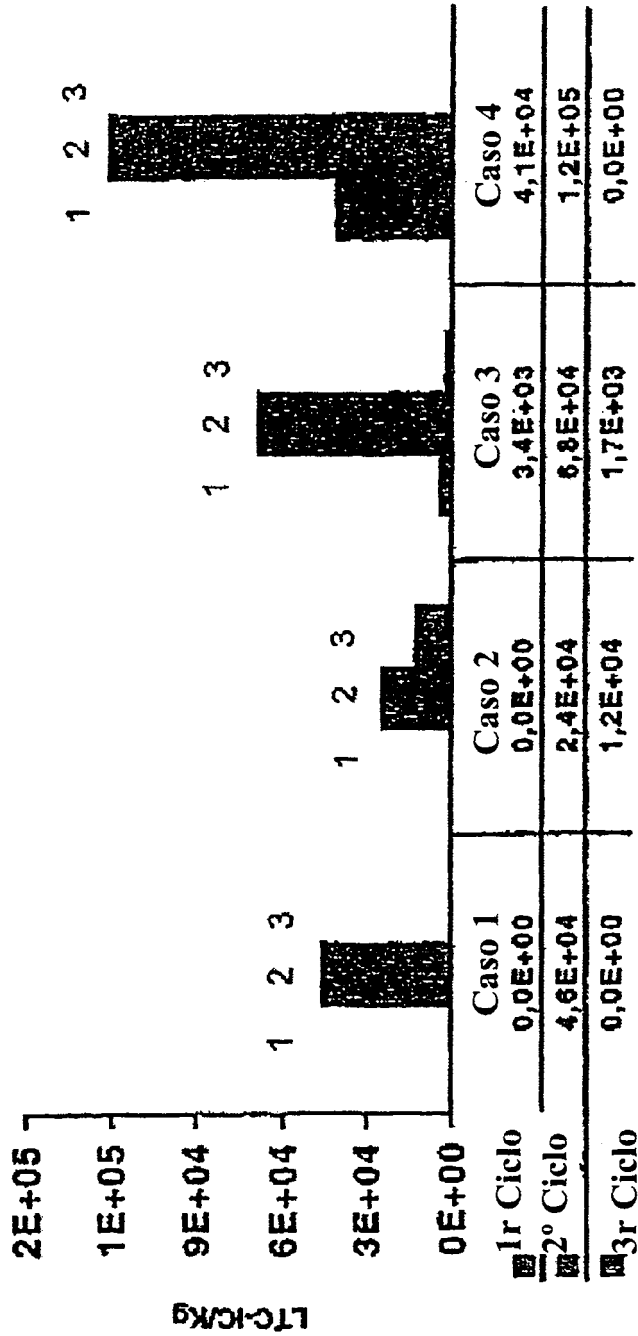


Fig. 9