

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 487**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04763431 .6**
96 Fecha de presentación: **23.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1660115**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **COMBINACIÓN FARMACÉUTICA DE G-CSF Y PLGF ÚTIL PARA CÉLULAS MADRE DE SANGRE.**

30 Prioridad:
29.07.2003 EP 03017174

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
**DOMPE' S.P.A.
LOCALITÀ CAMPO DI PILE SNC
67100 L'AQUILA, IT**

72 Inventor/es:
**GIANNI, Alessandro, Massimo;
CARLO-STELLA, Carmelo y
COLOTTA, Francesco**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 487 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

Combinación farmacéutica de G-CSF y PLGF útil para células madre de sangre.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a una combinación de moléculas biológicamente activas para uso en la movilización de células madre sanguíneas en un paciente o sujeto que tiene necesidad de ello. Más específicamente, la invención proporciona una combinación de G-CSF y P1GF particularmente eficaz en la estimulación de células madre de sangre periféricas (PBPC), aumentando así la factibilidad y eficacia del trasplante de órganos o células y de protocolos quimio-radioterapéuticos en pacientes con tumor.

Antecedentes de la invención

10 Las PBPC autólogas tienen indicaciones significativamente incrementadas de factibilidad y eficiencia en quimio-radioterapia a dosis altas y trasplantes de células madre autólogas (SCT)^{1,2} en pacientes con linfoma no hodgkiniano (NHL)³, linfoma de Hodgkin de recidiva (HL)⁴ así como mieloma múltiple (MM)⁵.

15 Las PBPC alogenas representan la fuente preferida de células madre para SCT que casan con HLA y la única fuente de alógrafos desacoplados a HLA^{6, 7, 8, 9, 10, 11} que es una terapia potencialmente curativa para pacientes con riesgo alto de leucemia que carecen de un donante acoplado a HLA relacionado o no relacionado, esto es, aproximadamente 40% de la población global de pacientes que se pueden beneficiar de los trasplantes alógrafos.

20 Los protocolos usados para movilizar PBPC autólogas en pacientes de cáncer incluyen el uso de factores de crecimiento mieloides solos o durante la recuperación de quimioterapia citotóxica, permitiendo este último enfoque una movilización óptima de PBPC^{12, 13, 14}. La movilización de PBPC alogenas de donantes sanos usualmente se logra con tratamientos cortos con factor recombinante humano estimulante de granulocitos (rhG-CSF) en dosis que varían de 10 a 20 µg/kg/día^{15, 16, 17, 18}.

25 Los pacientes de cáncer autoinjertados con $\geq 5 \times 10^6$ células CD34+/kg experimentan un pronto y durable injerto hematopoyético, mientras que los que reciben $\leq 2 \times 10^6$ células CD34+/kg tienen el riesgo de injerto demorado, fallo de injerto o mielodisplasia¹⁹. Por tanto, en la realización de SCT autólogo, la disponibilidad de cantidades adecuadas de células CD34+ representa un prerrequisito esencial. Debido a una quimio-radioterapia anterior o a factores relacionados con enfermedad, una proporción sustancial de pacientes de cáncer con quimioterapia simple (de 10 a 20%) o demorada/refractaria (de 30 a 40%) fracasan en la movilización de cantidades óptimas de células CD34+^{20, 21, 22}.

30 La recogida de cantidades adecuadas de células CD+ alogenas no representa una cuestión crítica en receptores de trasplantes de HLA idénticos; sin embargo, de 5 a 10% de donantes normales experimentan una mala movilización de células madre y requieren dosis incrementadas de rhG-CSF y múltiples procedimientos aferéticos^{22, 24, 25}. Los receptores de HLA desacoplado requieren la reinfusión de dosis "mega" de células CD34+ empobrecidas en linfocitos para prevenir fallo de injerto y GvHD²⁶ severa. Bajo el régimen de movilización estándar, (esto es, un tratamiento de 7 días de rhG-CSF), donantes de SCT desacoplados a HLA experimentan una media de 4 leucoferasas para recoger la dosis diana de células CD34+ (12×10^6 células de CD34+/kg de peso corporal), con una proporción sustancial de donantes (de 20 a 25%) que fracasan en el suministro de la dosis diana de células CD34+.

35 A pesar de que la edad, el sexo, el programa del tratamiento con citoquinas así como la quimio-radioterapia previa pueden afectar a la movilización de células madre^{27, 28, 29}, no se han identificado claramente características específicas como factores de predicción de la movilización de citosinas. Por tanto, es de esperar que, cualquier procedimiento aplicable a pacientes de cáncer o donantes normales y capaz de aumentar el rendimiento de progenitores circulantes en ausencia de toxicidad añadida, tendrá un impacto profundo sobre la factibilidad, toxicidad y costes de SCT autólogo y alogeno.

45 Se puede conseguir una movilización aumentada de PBPC usando moléculas capaces de interferir con el(los) mecanismo(s) que regula(n) el tráfico de células madre hematopoyéticas, esto es, la transmigración a través de el endotelio luminal a los espacios extravasculares de la médula espinal en el alojamiento y la reversión en la movilización^{30, 31, 32, 33}. Un enfoque adicional para intensificar la movilización de PBPC se basa en el uso de combinaciones de citocinas, tales como el factor recombinante humano (rh) estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (rhGM-CSF) más rhG-CSF³⁴, interleucina-3 (rhIL-3) más rhG-CSF o rhGM-CSF³⁵ y PIXY-321³⁶.
50 Finalmente, se puede conseguir la intensificación de la movilización de PBPC por incorporación en el régimen estándar de movilización, de citosinas de actuación temprana, tales como el factor de células madre estándar (rhSCF)^{37, 38} del ligando flt-3³⁹, capaz de expandir los progenitores de la médula, aumentando así el número de células susceptibles de posterior movilización por rhG-CSF.

Los sustituidos o adjuntos de rhG-CSF fracasaron en mejorar sustancialmente la movilización de progenitores de sangre activados con rhG-CSF solos, o dieron por resultado una mejora contrarrestada por una toxicidad sustancialmente incrementada de la toxicidad.

5 El factor de crecimiento placentario (P1FG) es un miembro de la familia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y funciona como un amplificador señalador a través del receptor-1 de VEGF (VEGFR1). Recientemente, la administración de un vector adenoviral que expresa P1GF (h) humano ha demostrado que ejerce efectos hematopoyéticos complejos, incluida la intensificación de la recuperación de médula ósea después de mielosupresión y movilización de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, la administración de factores de crecimiento después de inyección de vectores adenovirales presenta varias diferencias importantes con la inyección
10 directa de un factor purificado, y es posible no poder predecir sus efectos cuando se administra de acuerdo con las modalidades usadas en el contexto clínico.

Descripción de la invención

Debido al relevante impacto clínico de cualquier procedimiento capaz de mejorar la movilización de células madre, se ensayó la actividad de movilización de P1GF en modelos animales que permiten estimular la movilización de PBPC
15 como se presenta en una situación clínica. Se inyectó intraperitonealmente (IP) en ratones BALB/c normales durante 5 días, vehículo de control (PBS(MSA), rhG-CSF solo (10 µg/d) o una combinación de rhG-CSF (10 µg/d) y P1GF recombinante de murino (rh) (2,5-5 µg/día). Se recogieron muestras de sangre 2 horas después de la última inyección de citocinas y se evaluaron los parámetros siguientes: recuento de leucocitos (WBC), frecuencia y número absoluto de células formadoras de colonia (CFC), número absoluto de células de inicio d cultivo a largo plazo (LTC-
20 IC).

En las Tablas 1-4 de más adelante se ilustran los efectos de rmP1GF. Es evidente que rmP1GF inyectado solo no tiene efecto sobre la movilización de WBC, CFC y LTC-IC en comparación con mG-CSF solo.

Además, se ensayó la actividad de movilización de combinaciones de P1GF/G-CSF en un modelo no humano de primate (macacos de la India). Los resultados obtenidos en ratones se confirmaron en este modelo animal. En
25 particular, la combinación de P1GF/G-CSF mejoró la movilización de WBC, CFC, HPP-CFC y LTC-C en términos de cinética, frecuencia y números absolutos.

Los estudios indicados antes se han realizado usando procedimientos y condiciones que se asemejan íntimamente a la administración de factores de crecimiento hematopoyéticos a pacientes humanos. Los resultados demuestran claramente la presencia de un efecto sinérgico por G-CSF y rhP1GF en la movilización de células progenitoras de
30 sangre periférica.

Es objetivo de la invención, por tanto, una preparación combinada de G-CSF y P1GF útil para estimular la movilización de células madre de sangre en un paciente o sujeto que lo necesita. Tal como se usan aquí, los términos "paciente" y "sujeto" se refieren preferiblemente a individuos humanos, aunque también pueden referirse a animales, especialmente mamíferos preferiblemente mamíferos. Entre los ejemplos de estados de enfermedad, afecciones y enfermedades que se pueden beneficiar de la movilización de células madre de sangre figuran, no limitativamente, trasplante de órganos o células y quimio-radioterapia de tumores, en particular SCT autólogo^{1,2} o
35 alógeno en pacientes con NHL, recidiva de HL⁴, MM⁵, o en la fase de recuperación que sigue a quimioterapia mielosupresora.

Los ingredientes activos de la preparación combinada se pueden administrar simultánea o separadamente en formulación con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Se prefiere la administración por vía parenteral. Los procedimientos para la preparación de composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral son conocidos en la técnica; se pueden encontrar detalles en "Remington: The Science and Practice of Pharmacie", Mack Publishing Co. La cantidad de ingredientes activos en las preparaciones combinadas de acuerdo con la invención pueden variar dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración, del efecto buscado o la
45 afección a tratar, y de la respuesta del paciente. Como regla general, una cantidad de G-CSF o P1GF eficaz es capaz de producir la respuesta deseada en términos de movilización de células madre. La respuesta del paciente/sujeto se puede controlar durante el tratamiento, por ejemplo, por recuento de células madre de sangre y, si es necesario, las dosificaciones se pueden modificar consecuentemente. En una realización preferente de la invención, se usan hG-CSF recombinante y rhP1GF en forma de soluciones inyectables que suministran una
50 cantidad diaria del compuesto activo comprendida entre 1 y 150, preferiblemente entre 5 y 20 µg/kg de G-CSF y entre 10 y 300, preferiblemente entre 20 y 150 µg/kg de P1GF.

Los ejemplos siguientes ilustran más la invención.

Ejemplos 1-11. Efectos movilizadores de la combinación de PIGF/G-CSF en un modelo de ratón**Materiales y procedimientos**

Animales

Se compraron ratones BALBc hembra de 6 a 8 semanas de un peso de 20 a 25 g, de Charles River (Milán, Italia, EEUU). Se realizaron con animales procedimientos experimentales de acuerdo con las directrices del United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UK Coordinating Committee on Cancer Research, UKCCCR) para el bienestar de animales en la neoplasia experimental. Br. J. Cancer, 58:109-113,1998). A los ratones se administro diariamente por inyección, intraperitonealmente (IP), durante 5 días, vehículo de control (PBS/MSA), rhG-CSF solo (10 µg/d) o una combinación de rhG-CSF (10 µg/d) con murino recombinante (rm)P1GF (2,5-5 µg/d). Cada experimento se realizó al menos en tres ocasiones separadas y se usaron de tres a cuatro ratones al tiempo por grupo.

Citocinas

El factor recombinante estimulante de colonias de granulocitos humanos (rhG-CSF, Neupogen®) era de Roche (Milán Italia, EEUU); se compró rmP1GF de R&D Systems Inc., Abingdon, RU); rhP1GF se obtuvo de Geymonal SpA (Anagni, Italia, EEUU).

15 Protocolos de movilización

El protocolo estándar de movilización incluía el tratamiento de BA-L-B/c rhG-CSF-(10 g/ratón, IP) una vez al día durante 5 días, como agente individual o en combinación con rhG-CSF.

A los controles se inyectó PBS/MSA,

Parámetros de movilización

20 La movilización se evaluó por recuento de leucocitos, frecuencia y números absolutos de células formadoras de colonia (CFC), número absoluto de células que comienzan el cultivo a largo plazo (LTC-IL). A no ser que se establezca lo contrario, los animales se sacrificaron dos horas después del último tratamiento.

Recolección y separación de muestras

25 Se cosechó PB del plexo orbital en tubos que contenían heparina. Después del recuento de leucocitos, se diluyó PB (1:4, v/v) con PBS y se separaron células mononucleares (MC) por centrifugación (280 g, 30 min, temperatura ambiente) a un gradiente discontinuo de densidad de Ficoll. Las células se lavaron luego dos veces en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, Seromed, Berlin, Alemania, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Stem Cell, Technologies Vancouver, Canadá), L-glutamina 2 mM y antibióticos.

Recuento de leucocitos (WBC)

30 Se realizaron recuentos de leucocitos usando sangre anticoagulada con heparina y un contador automatizado (ADVIA 120, Bayer, Milán, Italia, EEUU).

Ensayo de células formadoras de colonia (CFC)

35 Se estimaron en cultivos estándar de metilcelulosa células formadoras de colonia (CFC) en total, esto es, unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM), unidades que forman estallidos de eritroides (BFU-E) y CFU de multilinaje (CFU-GEMM). En resumen, se cultivaron alícuotas de 1 ml de sangre (5×10^4 a 2×10^5 MNC) en discos Petri de 35 mm en medio basado en metilcelulosa (HCC-3434; Stem Cell Technologies) suplementado con factor recombinante de células madre de ratón (rmSCF, 50 ng/ml), interleucina-3 rm de ratón (rmIL-3, 10 ng/ml), interleucina-6 recombinante humana (rh) (rhIL-6, 10 ng/ml) y eritropoietina rh (rhEpo, 3 U/ml). Las colonias se puntuaron de acuerdo con criterios estándar después de 12-14 días de incubación a 37°C en atmósfera humedecida de 5% de CO₂ en aire (Humphries, R.K. y otros, Blood, 53:746-763, 1979).

Ensayo de células de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC)

45 Las LTC-IC se estimaron en cultivos a granel (Carlo-Stella C. y otros, Blood. 199;93:3973-82). En resumen, se pusieron en suspensión células de ensayo ($5 - 8 \times 10^6$) en medio completo (Myelocult^{MC} 5100, Stem Cell Technologies) y se sembraron en cultivos que contenían una capa de alimentación de células AFT024 de murino irradiadas (2.000 cGy) (suministradas amablemente por el Dr. K. Moore, Princeton University, Princeton, NJ, USA) (Moore y otros, Blood, 1997; 89:4337-47).

El medio completo estaba constituido por medio alfa 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 μ M) más hidrocortisona disuelta recientemente (10^{-6} M). Los cultivos se alimentaron semanalmente reemplazando la mitad del medio de cultivo con medio de cultivo fresco. Después de 4 semanas de cultivo, se reunieron células no adherentes y adherentes cosechadas por tripsinización, se lavaron y se ensayaron en cuanto a células clonogénicas en cultivos de metilcelulosa. El número total de células clonogénicas (esto es, CFU-GEMM más BFU-E más CFU-GM) presentes en LTC de 4 semanas proporciona una medición relativa del número de LTC-IL originalmente presente en la suspensión de ensayo. Los valores absolutos de LTC-IC se calcularon dividiendo el número total de células clonogénicas por 4, que es una producción media de células clonogénicas por LTC-IC (Sutherland HJ y otros, Blood. 1989; 74: 1563-70).

Ejemplo 1

Tabla 1: Recuento de leucocitos (WBC) en ratones tratados con rmP1GF y/o rhG-CSF

Régimen de movilización *	WBC/ μ l de sangre	
	Mediana (intervalo)	Media \pm d.e.
PBS/MSA	2.000 (850-4.000)	2.165 \pm 929
rhG-CSF (10 μ g/d)	6.000 (5.200-21.650)	9.577 \pm 5.575
rmP1GF (5 μ g/d)	2.450 (1.350-2.950)	2.450 \pm 141
rhG-CSF (10 μ g/d) + rmP1GF (2,5 μ g/d)	5.600 (4.600-13.700)	7.040 \pm 3.778
rhG-CSF (10 μ g/d) + rmP1GF (5 μ g/d)	9.500 (4.800-18.400)	9.980 \pm 5.715

* Se inyectó a ratones BALB/c IP durante 5 días PMS/MSA, rhG-CSF solo (10 μ g/d) o una combinación de rhG-CSF (10 μ g/d) con rmP1GF (2,5-5 μ g/d). Las muestras de sangre se recogieron 2 horas después de la última inyección de rmP1GF y/o rhG-CSF.

Ejemplo 2

Tabla 2: Frecuencia de CFC circulantes en ratones tratados con rmP1GF y/o rhG-CSF

Régimen de movilización*	CFC/ 10^5 MNC	
	Mediana (intervalo)	Media \pm d.e.
PBS/MSA	7 (2-15)	8 \pm 3
rhG-CSF (μ g/d)	76 (51-148)	82 \pm 29
rmP1GF (5 μ g/d)	8 (7-9)	8 \pm 1
rhG-CSF (10 μ g/d) + rmP1GF (2,5 μ g/d)	115 (93-184)	130 \pm 37
rhG-CSF (10 μ g/d) + rmP1GF (5 μ g/d)	195 (113-253)	180 \pm 58

* Se inyectó a ratones BALB/c IP durante 5 días PMS/MSA, rhG-CSF solo (10 μ g/d) o una combinación de rhG-CSF (10 μ g/d) con rmP1GF (2,5-5 μ g/d). Las muestras de sangre se recogieron 2 horas después de la última inyección de rmP1GF y/o rhG-CSF. Los CSF incluyen CFC de granulocitos/macrófagos (CFU-GM), unidad formadora de estallido de eritroides (BFU-E) y CFC multipotente (CFU-mezcla). Los datos de CFU derivan de cultivos cuatuplicados en muestras de cada animal.

Ejemplo 3:

Tabla 3: Número absoluto de CFC circulantes en ratones tratados con rmP1GF y/o rhG-CSF

Régimen de movilización*	CFC por ml de sangre	
	Mediana (intervalo)	Media \pm d.e.
PBS/MSA	57 (9-288)	81 \pm 75
rhG-CSF (μ g/d)	3.129 (1.042-5.518)	2.977 \pm 1.126
rmP1GF (5 μ g/d)	96 (87-105)	96 \pm 13
rhG-CSF (10 μ g/d) + rmP1GF (2,5 μ g/d)	2.568 (1.480-5.885)	3.198 \pm 1.928
rhG-CSF (10 μ g/d) + rmP1GF (5 μ g/d)	6.143 (2.486-11.520)	6.015 \pm 3.674

5 * Se inyectó a ratones BALB/c IP durante 5 días PMS/MSA, rhG-CSF solo (10 µg/d) o una combinación de rhG-CSF (10 µg/d) con rmP1GF (2,5-5 µg/d). Las muestras de sangre se recogieron 2 horas después de la última inyección de rmP1GF y/o rhG-CSF. Los CSF incluyen CFC de granulocitos/macrófagos (CFU-GM), unidad formadora de estallido de eritroides (BFU-E) y CFC (CFU-mezcla) multipotente. Los datos de CFU derivan de cultivos cuatuplicados en muestras de cada animal. El número absoluto de CFC circulantes en sangre es una función de la frecuencia de CFC multiplicada por el número total de MNC por ml de sangre.

Ejemplo 4

Tabla 4: Número absoluto de LTC-IC circulantes en ratones tratados con rmP1GF y/o rhG-CSF

Régimen de movilización*	LTC-IC por ml de sangre	
	Mediana (intervalo)	Media ± d.e.
PBS/MSA	7 (3-39)	9 ± 5
rhG-CSF (µg/d)	194 (57-337)	208 ± 98
rmP1GF (5 µg/d)	4 (3-5)	4 ± 2
rhG-CSF (10 µg/d) + rmP1GF (2,5 µg/d)	565 (279-852)	565 ± 405
rhG-CSF (10 µg/d) + rmP1GF (5 µg/d)	1.173 (852-2.070)	1.365 ± 364

10 * Se inyectó a ratones BALB/c IP durante 5 días PMS/MSA, rhG-CSF solo (10 µg/d) o una combinación de rhG-CSF (10 µg/d) con rmP1GF (2,5-5 µg/d). Las muestras de sangre se recogieron 2 horas después de la última inyección de rmP1GF y/o rhG-CSF. El número absoluto de LTC-IC circulantes se ensayó en cultivos a granel. Se sembraron células de ensayo (5 – 8 x 10⁶) en cultivos que contenían una capa de alimentación de células AFT024 de murino irradiadas. Después de 4 semanas en cultivo, se reunieron células no adherentes y células adherentes cosechadas por tripsinización, se lavaron y ensayaron juntas en cuanto a células clonogénicas. El número total de células clonogénicas (esto es, CFU-mezcla más BFU-E más CFU-GM) presente en LTC de 4 semanas proporciona una medición relativa del número de LTC-IL originalmente presente en la suspensión de ensayo. El número absoluto de LTC-IC circulantes es una función de la frecuencia de CFC multiplicada por el número total de MNC por ml de sangre.

20 **Ejemplos 5-11 Efectos movilizadores de combinaciones de PIGF/G-CSF en un modelo no humano de primate**

Materiales y procedimientos

Diseño experimental

25 Se movilizó inicialmente con G-CSF sola (100 µg/d, SC, 5 días) (ciclo 1) una cohorte de macacos de la India (n = 4) y después de un período de lavado de 6 semanas, se realizó una segunda movilización que consistió en rhP1GF (130 µg/kg, IV, durante 5 días) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días) (ciclo 2). Después de un período adicional de lavado de 6 semanas, se realizó una tercera movilización que consistió en rhPIGF (260 µg/kg/día, IV, durante 5 días) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días) (ciclo 3), que se administró a la misma cohorte de monos.

Parámetros de movilización

30 Se analizó la cinética de movilización de leucocitos así como la frecuencia y número absoluto de células formadoras de colonia involucradas (CFC), progenitores potenciales muy proliferativos (HPP-CFC) y células de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC). Se analizaron diariamente los parámetros de movilización durante el tratamiento (días 1 a 5) y 3 y 5 días después del cese de la terapia. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena femoral de primates anestesiados (cetamina, intramuscularmente) usando técnicas asépticas

35 Recuento de leucocitos

Los recuentos de leucocitos se realizaron usando sangre coagulada con EDTA y un contador automatizado (ADVIA 120, Bayer, Milán, Italia, EEUU).

Ensayos de CFC y HPP-CFC

40 Se ensayaron el total de CFC [esto es, unidades que forman colonias de granulocito-macrófago (CFU-GM), unidades que forman estallido de eritroides (BFU-E) y CFU de multilinaje (granulocitos, eritrocitos, macrófagos, magacariocitos) (CFU-GEMM)] y HPP-CFC usando sangre heparinizada de acuerdo con una técnica descrita previamente (41, 42). En resumen, se cultivaron células mononucleares (MNC) (1 x 10⁴ a 2 x 10⁵ obtenidas por centrifugación en un gradiente discontinuo de Ficoll (densidad = 1,077 g/ml) por cuatuplicado en discos Petri en

medio basado en metilcelulosa (HCC-4100, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado con factor recombinante de células madre humanas (rhSCF, 50 ng/ml, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), interleucina-3 (rhIL-3, 20 ng/ml, Stem Cell Technologies), interleucina-6 (rhIL-6, 20 ng/ml, Stem Cell Technologies), rhG-CSF (20 ng/ml, Stem Cell Technologies), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (rhG-CSF, 20 nmg/ml, Stem Cell Technologies) y eritropoietina (rhEpo, 3U/ml, R&D Systems Inc., Abingdon, RU). Las CFC se puntuaron después de 12-14 días de incubación (37°C, 5% de CO₂) de acuerdo con criterios estándar. Las HPP-CFC, definidas como colonias macroscópicamente visibles de diámetro >1 mm de crecimiento compacto de la colonia, se puntuaron después de 28 días de incubación en cultivo de metilcelulosa suplementado con rhSCF (50 ng/ml), rhIL-3 (20 ng/ml), rhIL-6 (20 ng/ml), rhG-CSF (20 ng/ml), rhGM-CSF (20 ng/ml) y rhEpo (3 U/ml) (43). El número absoluto de CFC circulantes o HPP-CFC en sangre es función de la frecuencia de CFC o HPP-CFC multiplicada por el número total de las MNC por ml de sangre.

Ensayos de LTC-IC

La frecuencia de LTC-IC se estimó en condiciones de dilución limitativa (44). En resumen, diluciones seriales de células de ensayo (2×10^5 a 3×10^3 se pusieron nuevamente en suspensión de 150 µl de medio completo (Myelocult^{MC} 5100, Stem Cell Technologies) consistente en medio alfa 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 µM) más hidrocortisona recientemente disuelta (10^{-6} M) y se cultivaron en placas de fondo plano de 96 pocillos. Para cada dosis de células se cultivaron de 16 a 22 replicados. Las células de ensayo se sembraron en placas que contenían una capa de alimentación de células M2-10B4 de murino irradiadas (8.000 cGy) (3×10^4 /cm², proporcionadas amablemente por el Dr. C. Eaves, Terry Fox Laboratory, Vancouver, Canadá), diseñadas por ingeniería por transferencia retroviral de genes para producir IL-3 humano y G-CSF (45). Los cultivos se alimentaron semanalmente reemplazando la mitad del medio de crecimiento con medio completo fresco. Después de 5 semanas de cultivo, se cosecharon por tripsinización células no adherentes y adherentes de pocillos individuales, se lavaron y ensayaron juntas en cuanto al crecimiento de las CFC. Después de 12 a 14 días de incubación, se puntuaron los cultivos como positivos (≥ 1 colonia) o negativos (no hay colonia) y se calcularon las frecuencias de LTC-IC usando software L-Calc (Stem Cell Technologies). Los números absolutos de LTC-IC circulantes se estimaron en cultivos a granel (46). En resumen, células de ensayo ($5-8 \times 10^6$) se pusieron nuevamente en suspensión en medio completo y se sembraron en cultivos que contenían una capa de alimentación de células M2-10B4 de murino (3×10^4 /cm²). Después de 5 semanas de cultivo, se reunieron células no adherentes y células adherentes cosechadas por tripsinización, se lavaron y ensayaron juntas en cuanto a células clonogénicas. El número total de células clonogénicas (esto es, CFU-GEMM más BFU-E más CFU-GM) presentes en LTC de 5 semanas proporciona una medición relativa del número de LTC-IL originalmente presente en la suspensión de ensayo. Los valores absolutos de LTC-IC se calcularon dividiendo el número total de células clonogénicas por 4, que es una producción media de células clonogénicas por LTC-IC.

Ejemplo 5

Leucocitos circulantes

Una administración durante 5 días de rhG-CSF solo indujo un incremento medio de 5 veces en el número medio (\pm d.e.) de leucocitos en comparación con valores antes de tratamiento. La adición de 130 a 260 µg/kg de rhPIGF a rhG-CSF dio por resultado un incremento modesto de los valores de WBC en día 5 de tratamiento.

Tabla 5: Recuento de leucocitos en macacos de la India tratados con rhG-CSF solo o rhPIGF más rhG-CSF

Recuento de leucocitos por µl de sangre*			
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Día	rhG-CSF (100 µl/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (130 µg/kg, IV, durante 5 días)+rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (260 µg/kg, IV, durante 5 días)+rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)
1	8.708 \pm 2.458	13.498 \pm 5.514	8.370 \pm 1.585
2	31.313 \pm 3.889	24.533 \pm 2.789	41.180 \pm 7.364
3	40.600 \pm 6.274	35.388 \pm 2.207	44.085 \pm 6.588
4	43.055 \pm 6.562	39.440 \pm 6.744	37.960 \pm 3.598
5	43.523 \pm 13.790	60.040 \pm 9.508	49.048 \pm 7.120
8	14.363 \pm 4.163	23.073 \pm 9.017	17.783 \pm 5.964
10	12.145 \pm 5.421	16.398 \pm 8.314	11.150 \pm 2.915

5 * Macacos de la India (n= 4) recibieron tres ciclos de movilización separados por un período de lavado de 6 semanas. La movilización se edujo en el ciclo 1 por rhG-CSF solo (100 µg/kg/día, SC, días 1-5), en el ciclo 2 por una combinación de rhPIGF (130 µg/kg/día, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5) y en el ciclo 3 por una combinación de rhPIGF (260 µg/kg, V, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5). Los recuentos de leucocitos se analizaron diariamente durante el tratamiento (días 1 a 5), así como los días 3 y 5 después del cese de la terapia. Los datos se expresan como media ± d.e.

Ejemplo 6

Frecuencia de CFC

10 En comparación con los valores de la línea de base, las frecuencias medias de CFC en sangre (por 10⁵ MNC) detectadas el día 5 de movilización se aumentaron en 19, 53 y 52 veces con rhG-CSF solo, rhG-CSF/rhPIGF (130 µg/kg) y rhG-CSF/rhPIGF (260 µg/kg), respectivamente. En comparación con rhG-CSF solo, el tratamiento combinado con rhPIGF/rhG-CSF indujo un aumento de 2 veces de la frecuencia de CFC el día del pico.

Tabla 6: Frecuencia de CFC circulantes en macacos de la India tratados con rhG-CSF solo o rhPIGF más rhG-CSF

Día	CFC/10 ⁵ de MNC*		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
	rhG-CSF (100 µl/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (130 µg/kg, IV, durante 5 días)+rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (260 µg/kg, IV, durante 5 días)+rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)
1	6 ± 1	4 ± 1	5 ± 3
2	4 ± 2	9 ± 1	19 ± 8
3	9 ± 1	39±13	48 ± 26
4	114 ± 51	213 ± 87	245 ± 151
5	63 ± 26	196 ± 26	261 ± 83
8	66 ± 11	40 ± 11	60 ± 39
10	10 ± 7	19 ± 10	21 ± 18

15
20 * Macacos de la India (n= 4) recibieron tres ciclos de movilización separados por un período de lavado de 6 semanas. La movilización se edujo en el ciclo 1 por rhG-CSF solo (100 µg/kg/día, SC, días 1-5), en el ciclo 2 por una combinación de rhPiGF (130 µg/kg/día, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5) y en el ciclo 3 por una combinación de rhPIGF (260 µg/kg, V, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5). Las CLC se analizaron diariamente durante el tratamiento (días 1 a 5), así como los días 3 y 5 después del cese de la terapia. Los datos se expresan como media ± d.e. CFC incluye granulocitos-macrófagos (CFU-GM), unidad que forma eclosión de eritroides (BFU-E) y CFC multipotente (CFU-mezcla). Los datos de CFC derivan de cultivos por cuatuplicado sobre muestras de cada animal.

Ejemplo 7

25 Valores absolutos de CFC

30 Los números absolutos de CFC circulantes en sangre se calcularon en función de la frecuencia de las CFC multiplicada por el número total de MNC por ml de sangre. En comparación con los valores de la línea de base, el tratamiento con rhG-CSF solo, rhCSF/rhPIGF (130 µg/kg) y rhG-CSF/rhPIGF (260 µg/kg) dio por resultado en un aumento de las CFC de 85, 335 y 358 veces, respectivamente. En los ciclos 2 y 3, los niveles de pico de las CFC se aumentaron en 4 y 5 veces sobre el ciclo 1 (rhG-CSF solo).

Tabla 7: Número absoluto de CFC circulantes en macacos de la India tratados con rhG-CSF solo o rhPIGF más rhG-CSF

Día	CFC por ml de sangre*		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
	rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (130 µg/kg, IV, durante 5 días)+rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (260 µg/kg, IV, durante 5 días)+rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)
	1.134 ± 9	138 ± 38	170 ± 120
2	344 ± 207	724 ± 254	6.552 ± 4.365
3	472 ± 60	6.420 ± 4.775	9.634 ± 7.006
4	11.406 ± 4.093	32.347 ± 14.206	53.002 ± 25.250
5	5.397 ± 3.074	46.283 ± 8.287	60.777 ± 8.563
8	3.952 ± 2.666	46.283 ± 8.287	3.719 ± 1.899
10	224 ± 164	448 ± 168	943 ± 994

* Macacos de la India (n= 4) recibieron tres ciclos de movilización separados por un período de lavado de 6 semanas. La movilización se edujo en el ciclo 1 por rhG-CSF sola (100 µg/kg/día, SC, días 1-5), en el ciclo 2 por una combinación de rhPIGF (130 µg/kg/día, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5) y en el ciclo 3 por una combinación de rhPIGF (260 µg/kg, V, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5). Las CFC se analizaron diariamente durante el tratamiento (días 1 a 5), así como los días 3 y 5 después del cese de la terapia. Los datos se expresan como media ± d.e. CFC incluye granulocitos-macrófagos (CFU-GM), unidad que forma eclosión de eritroides (BFU-E) y CFC multipotente (CFU-mezcla). Los datos de CFC derivan de cultivos por cuatuplicado sobre muestras de cada animal. El número absoluto de CFC circulantes en sangre es función de la frecuencia de CFC multiplicada por el número total de MNC por ml de sangre.

Ejemplo 8

Frecuencia de HPP-CFC

En comparación con los valores de la línea de base, las frecuencias medias de HPP-CFC en sangre (por 10⁵ MNC) detectadas el día 5 de movilización se aumentaron en 5 y 12 veces con rhG-CSF solas o rhG-CSF/rhPIGF (130 µg/kg) respectivamente. En comparación con rhG-CSF solo el tratamiento combinado con rhPIGF/rhG-CSF indujo un aumento de 2 veces de la frecuencia de HPP-CFC el día del pico.

Tabla 8. Frecuencia de HPP-CFC circulantes en macacos de la India tratados con rhG-CSF solo o rhPIGF más rhG-CSF

Día	HPP-CFC/10 ⁵ de MNC*	
	Ciclo 1	Ciclo 2
	rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (130 µg/kg, IV, durante 5 días), +rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)
1	4 ± 1	3 ± 1
2	6 ± 1	3 ± 1
3	13 ± 4	11 ± 3
4	15 ± 4	27 ± 10
5	20 ± 9	37 ± 8
8	18 ± 6	6 ± 4
10	6 ± 1	5 ± 4

* Macacos de la India (n = 4) recibieron tres ciclos de movilización separados por un período de lavado de 6 semanas. La movilización se edujo en el ciclo 1 por rhG-CSF solo (100 µg/kg/día, SC, días 1-5), en el ciclo 2 por una combinación de rhPIGF (130 µg/kg/día, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5) y en el ciclo 3 por una combinación de rhPIGF (260 µg/kg, V, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5). Las HPP-CFC se analizaron diariamente durante el tratamiento (días 1 a 5), así como los días 3 y 5 después del cese de la terapia. Los datos se expresan como media ± d.e. Los datos de HPP-CFC derivan de cultivos por cuatuplicado sobre muestras de cada animal.

Ejemplo 9

Valores absolutos de HPP-CFC

El número absoluto de las HPP-CFC por ml de sangre detectados el día 5 de la terapia de rhG-CSF fue 17 veces más alto que los valores de pretratamiento. Los monos que recibieron el tratamiento combinado de rhG-CSF/rhPIGF (130 µg/kg) presentaron un aumento de 158 veces de HPP-CFC en comparación con los valores de la línea de base. En el ciclo 2, el nivel de HPP-CFC el día 5 aumentó en 5 veces sobre el ciclo 1.

Tabla 9. Números absolutos de HPP-CFC circulantes en macacos de la India tratados con rhG-CSF solo o rhPIGF más rhG-CSF

Día	HPP-CFC por ml de sangre*	
	Ciclo 1 rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	Ciclo 2 rhPIGF (130 µg/kg, IV, durante 5 días), +rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)
1	96 ± 17	54 ± 49
2	493 ± 218	258 ± 34
3	683 ± 156	1.709 ± 989
4	1.521 ± 332	3.883 ± 1.309
5	1.593 ± 405	8.557 ± 1.142
8	998 ± 541	603 ± 384
10	121 ± 52	121 ± 87

* Macacos de la India (n = 4) recibieron tres ciclos de movilización separados por un período de lavado de 6 semanas. La movilización se edujo en el ciclo 1 por rhG-CSF solo (100 µg/kg/día, SC, días 1-5), en el ciclo 2 por una combinación de rhPiGF (130 µg/kg/día, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5) y en el ciclo 3 por una combinación de rhPIGF (260 µg/kg, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5). Los recuentos de HPP-CFC se analizaron diariamente durante el tratamiento (días 1 a 5), así como los días 3 y 5 después del cese de la terapia. Los datos se expresan como media ± d.e. Los datos de HPP-CFC derivan de cultivos por cuatuplicado sobre muestras de cada animal. El número absoluto de HPP-CFC circulantes es función de la frecuencia de HPP-CFC multiplicada por el número total de MNG por ml de sangre.

Ejemplo 10.

Frecuencia de LTC-IC

El análisis de la frecuencia de las LTC-IC por un ensayo de dilución limitativa demostró que la administración combinada de rhPIGF (130 µg/kg) y rhG-CSF dio por resultado un aumento medio de la frecuencia de LTC-IC de 11 veces (1 en 5.829 células frente a 1 en 64.064 células), en comparación con rhG-CSF solo.

Tabla 10. Frecuencia de LTC-IC circulantes en macacos de la India que reciben un tratamiento de 5 días de rhG-CSF solo o rhPIGF más rhG-CSF

Animal nº	Régimen de movilización	Frecuencia media* de LTC-IC	95% de CI		LTC-ICx10 ⁵ por MNC
			Frecuencia inferior	Frecuencia superior	
1	rhG-CSF	1/84.265	1/69.209	1/102.598	1,2
2	rhG-CSF	1/65.835	1/54.341	1/79.761	1,5
3	rhG-CSF	ne**	ne	ne	ne
4	rhG-CSF	1/42.091	1/34.837	1/50.854	2,4
1	rhPIGF (130 µg/kg) +rhG-CSF	1/42.009	1/5.977	1/2.689	24,9
2	rhPiGF (130 µg/kg) +rhG-CSF	1/7.562	1/11.100	1/5.152	13,2
3	rhPIGF (130 µg/kg) +rhG-CSF	ne	ne	ne	ne
4	rhPIGF (130 µg/kg) +rhG-CSF	1/5.916	2/8.725	1/4.011	16,9

* La frecuencia de LTC-IC se ensayó en condiciones de dilución limitativas usando la línea de células de murino M2-10B4 como capa estromal. Las muestras de sangre se recogieron el día 5 de la terapia de movilización. Diluciones seriales de las células de ensayo (de 2 x 10⁵ a 3 x 10³) se cultivaron durante 5 semanas y se cultivaron de 16 a 22 replicados para cada dosis de células de ensayo. Después de 5 semanas se ensayaron células no adherentes y adherentes de pocillos individuales en cuanto a células clonogénicas y las frecuencias de LTC-IC se calcularon usando estadística de Poisson y el procedimiento de máxima probabilidad.

Ejemplo 11.

Valores absolutos de LTC-IC

Bajo rhG-CSF solo, los números absolutos de LTC circulantes aumentaron en 53 veces en comparación con los valores de la línea de base. El tratamiento combinado de rhG-CSF/rhPIGF (130 µg/kg) aumentó LTC-IC en 389 veces en comparación con los valores pretratamiento y en 15 veces en comparación on rhG-CSF solo.

Tabla 11. Números absolutos de LTC-IC circulantes en macacos de la India tratados con rhG-CSF solos o rhPIGF más rhG-CSF

Día	LTC-IC por ml de sangre*	
	Ciclo 1	Ciclo 2
	rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)	rhPIGF (130 µg/kg, IV, durante 5 días), +rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, durante 5 días)
1	4 ± 7	8 ± 5
2	92 ± 43	56 ± 20
3	111 ± 30	624 ± 340
4	211 ± 41	742 ± 176
5	130 ± 25	3.115 ± 988
8	63 ± 22	533 ± 270
10	6 ± 2	112 ± 40

* Macacos de la India (n = 4) recibieron tres ciclos de movilización separados por un período de lavado de 6 semanas. La movilización se efectuó en el ciclo 1 por rhG-CSF solo (100 µg/kg/día, SC, días 1-5), en el ciclo 2 por una combinación de rhPIGF (130 µg/kg/día, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5) y en el ciclo 3 por una combinación de rhPIGF (260 µg/kg, IV, días 1-5) más rhG-CSF (100 µg/kg/día, SC, días 1-5). Los recuentos de LTC-IC se analizaron diariamente durante el tratamiento días 1 a 5) así como los días 3 y 5 después del cese del tratamiento. Los datos se expresan como media ± d.e. derivados de cultivos por cuatuplicado sobre muestras de cada animal en ese momento. El número absoluto de LTC-IC circulantes se ensayó en cultivos de lote. Las células de ensayo ($5-8 \times 10^6$) se sembraron en cultivos que contenían una capa de alimentación de células M2-10B4 de murino irradiadas. Después de 5 semanas de cultivo, se reunieron células no adherentes y células adherentes cosechadas por tripsilación, se lavaron y ensayaron juntas en cuanto a células clonogénicas. El número total de células clonogénicas (esto es, CFU-mezcla más BFU-E más CFU-GM) presente en LTC de 5 semanas proporciona una medición relativa del número de LTC-IC originalmente presentes en la suspensión de ensayo. El número absoluto de LTC-IL circulantes en sangre es función de la frecuencia de LTC-IC multiplicada por el número total de MNC por ml de sangre.

Bibliografia

- cells and lymphoid subsets in normal donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol.* 1996;93 :940-942.
25. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, et al. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood.* 1995;86:4437-4445.
26. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 1998;339:1186-1193.
27. Mifflin G, Charley C, Stainer C, Anderson S, Hunter A, Russell N. Stem cell mobilization in normal donors for allogeneic transplantation: analysis of safety and factors affecting efficacy. *Br J Haematol.* 1996;95:345-348.
28. Anderlini P, Przepiorka D, Seong C, et al. Factors affecting mobilization of CD34+ cells in normal donors treated with filgrastim. *Transfusion.* 1997;37:507-512.
29. de la Rubia J, Arbona C, de Arriba F, et al. Analysis of factors associated with low peripheral blood progenitor cell collection in normal donors. *Transfusion.* 2002;42:4-9.
30. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood.* 1997;90:4779-88.
31. King AG, Horowitz D, Dillon SB, et al. Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRO β . *Blood.* 2001;97:1534-42.
32. Pruijt JF, van Kooyk Y, Figdor CG, Lindley IJ, Willemze R, Fibbe WE. Anti-LFA-1 blocking antibodies prevent mobilization of hematopoietic progenitor cells induced by interleukin-8. *Blood.* 1998;91:4099-105.
33. Carlo-Stella C, Di Nicola M, Magni M, et al. Defibrotide in combination with granulocyte colony-stimulating factor significantly enhances the mobilization of primitive and committed peripheral blood progenitor cells in mice. *Cancer Res.* 2002;62:6152-7.
34. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Randomized cross-over trial of progenitor-cell mobilization: high-dose cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus G-CSF. *J Clin Oncol.* 2000;18:1824-30.
35. Rosenfeld CS, Bolwell B, LeFever A, et al. Comparison of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17):179-83.
36. Bishop MR, Jackson JD, O'Kane-Murphy B, et al. Phase I trial of recombinant fusion protein PIXY321 for mobilization of peripheral-blood cells. *J Clin Oncol.* 1996;14:2521-6.
37. Shpall EJ, Wheeler CA, Turner SA, et al. A randomized phase 3 study of peripheral blood progenitor cell mobilization with stem cell factor and filgrastim in high-risk breast cancer patients. *Blood.* 1999;93:2491-501.
38. Facon T, Harousseau JL, Maloisel F, et al. Stem cell factor in combination with filgrastim after chemotherapy improves peripheral blood progenitor cell yield and reduces apheresis requirements in multiple myeloma patients: a randomized, controlled trial. *Blood.* 1999;94:1218-25.
39. Brasel K, McKenna HJ, Charrier K, Morrissey PJ, Williams DE, Lyman SD. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood.* 1997;90:3781-8.
40. Hattori K, Heissig B, Wu Y, et al. Placental growth factor reconstitute hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone marrow microenvironment. *Nature Med.* 2002;8:841-9.
41. MacVittie TJ, Farese AM, Davis TA, Lind LB, McKeam JP. Myelopoietin, a chimeric agonist of human interleukin 3 and granulocyte colony-stimulating factor receptors, mobilizes CD34+ cells that rapidly engraft lethally x-irradiated nonhuman primates. *Exp Hematol.* 1999; 27:1557-68.
42. Carlo-Stella C, Di Nicola M, Longoni P, Milani R, Milanese M, Guidetti A, Haanstra K, Jonker M, Cleris L, Magni M, Formelli F, Gianni AM. Mobilization of primitive and committed hematopoietic progenitors in nonhuman primates treated with defibrotide and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol.* 2004; 32:68-75.
43. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA-4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood.* 1997; 90:4779-88.
44. Lemieux ME, Rebel VI, Lansdorp PM, Eaves CJ. Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood.* 1995;86:1339-1347.
45. Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Tacker JD, Hogge DE. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood.* 1991; 78:666-72.
46. Carlo-Stella C, Regazzi E, Sammarelli G, et al. Effects of the tyrosine kinase inhibitor AG957 and an Anti-Fas receptor antibody on CD34+ chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood.* 1999;93:3973-82.
47. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska AC, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood.* 1989; 74:1563-70.

REIVINDICACIONES

1. Preparación farmacéutica combinada que contiene G-CSF y P1GF como sustancias activas, para uso en la estimulación de la movilización de células progenitoras de sangre periférica (PBPC) para aumentar la factibilidad y eficacia del trasplante de órganos o células y de protocolos de quimio-radioterapia en pacientes con tumores.
- 5 2. Preparación farmacéutica combinada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el mencionado trasplante de células es un trasplante de células madre autólogo o alógeno realizado en pacientes con linfoma no hodgkiano (NHL), recidiva de linfoma de Hodgkin (EL), mieloma múltiple o la fase de recuperación que sigue a un trasplante mielosupresor quimioterapéutico.
- 10 3. Preparación combinada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que G-CSF y P1GF se administran simultánea o separadamente al mencionado paciente o sujeto.
4. Preparación combinada para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para administración parenteral.
5. Preparación combinada para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que contiene hG-CSF y rhPILG recombinantes.
- 15 6. Preparación combinada para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, que contiene de 1 a 150 µg/kg de G-CSF y de 10 a 300 µg/kg de P1GF.