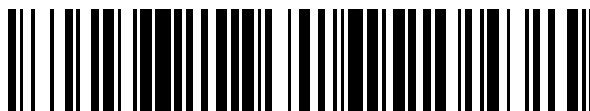


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 290**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03712209 .0**
96 Fecha de presentación: **06.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1465653**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54 Título: **APLICACIÓN TERAPÉUTICA DEL G-CSF.**

30 Prioridad:
18.01.2002 FR 0200610

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.12.2011

73 Titular/es:
**POURQUIER, DIDIER
3 BIS, RUE DES CORONILLES
34070 MONTPELLIER, FR y
MOUKOKO, DIDIER**

72 Inventor/es:
**Pourquier, Didier y
Moukoko, Didier**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 370 290 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

Aplicación terapéutica del G-CSF.

5 La presente invención se refiere a una nueva aplicación terapéutica del G-CSF y del SCF, y más particularmente a su utilización para la preparación de un medicamento útil en medicina humana o veterinaria.

10 El G-CSF (abreviatura de "Granulocyte Colony-Stimulating Factor", es decir "Factor de estimulación de las colonias de granulocitos"), el GM-CSF (abreviatura de "Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor", es decir "Factor de estimulación de las colonias de granulocitos y de macrófagos") y el SCF (abreviatura de "Stem Cell Factor", es decir "Factor de células madre") son factores de crecimiento. Corresponden a tres de las clases de citoquinas denominadas factores de crecimiento hematopoyético o CSF (Colony Stimulating Factors). Los CSF forman una familia de glicoproteínas que presentan unas funciones esenciales en la formación de las células sanguíneas.

15 El G-CSF estimula la producción de células hematopoyéticas y de forma predominante la producción de polinucleares. El G-CSF es una glicoproteína y el producto de la expresión de un gen situado en el cromosoma 17. Está producido por diferentes células, tales como los fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, y células epiteliales. El G-CSF es detectable en la sangre, y se puede purificar a partir de los sobrenadantes de cultivos de células tumorales humanas.

20 La ingeniería biológica permite también producir un alotipo humano del G-CSF, el G-CSF recombinante humano (rHuG-CSF).

25 En Francia, están disponibles dos medicamentos que pertenecen a la clase del G-CSF: el Neupogen[®] (r-metHugG-CSF, Filgrastime, comercializado por Amgen/Produits Roche) y el Granocyte[®] (rHugG-CSF, Lénograstime, comercializado por los laboratorios Aventis/Chugai). Estos dos medicamentos se utilizan por vía de inyección subcutánea o por perfusión intravenosa, para una administración sistémica, a unas dosis generalmente comprendidas entre 5 y 10 ug por kilogramo de peso corporal y por día.

30 Las indicaciones actuales del G-CSF en terapéutica humana son el tratamiento de las neutropenias crónicas severas, la reducción de las neutropenias inducidas por los tratamientos quimioterapéuticos anticancerosos mielotóxicos, la reducción de las neutropenias inducidas por las terapias mielosupresivas (quimioterapia o radioterapia) seguidas del trasplante de médula en el tratamiento de los cánceres o de las leucemias, la movilización de las células madre hematopoyéticas para la constitución de un trasplante con vistas a un trasplante de médula (autotrasplante o alotrasplante).

35 Se debe destacar que, en esta última utilización, el objetivo del tratamiento es sacar de la médula ósea las células madre hematopoyéticas y de hacerlas pasar a la sangre circulante. Estas células madre son entonces recogidas por citaféresis sucesivas y constituirán el injerto. Se trata por lo tanto de movilizar al máximo hacia la sangre circulante este contingente de células madre hematopoyéticas que, en el estado normal, se encuentran en cantidad muy reducida en la sangre circulante, lo cual no permite constituir un trasplante con una calidad suficiente (esto se resume en el término "movilización" de la médula ósea).

40 Esta técnica de recogida del trasplante por citaféresis después de la movilización de las células madre sustituye ventajosamente la recogida directa de la médula ósea por citopunción que requiere anestesia del paciente y múltiples punciones de la médula. El trasplante así constituido se trasfunde a continuación al paciente, cuya propia médula ósea ha sido destruida por la quimioterapia o la radioterapia; constituye por lo tanto la nueva fuente de producción de las células sanguíneas.

45 EL G-CSF se utiliza de forma habitual para estas diferentes indicaciones. Su inocuidad muy reconocida permite utilizarlo también en personas que gozan de buena salud para constituir unos trasplantes de la médula en el marco de los alotrasplantes.

50 EL SCF (abreviatura de "Stem Cell Factor", es decir "Factor de células madre") es a su vez un factor de crecimiento. Actúa en particular como factor de crecimiento sobre los progenitores hematopoyéticos, y puede movilizar las células madre de la médula hacia la sangre. Actúa también sobre la diferenciación y el funcionamiento de los mastocitos. Actúa por medio de un receptor específico de la familia de las tirosinas quinasas de tipo III (c-KIT). El gen que codifica la producción del SCF se encuentra en el cromosoma 12. En Francia, el SCF no es de uso clínico habitual, está disponible en ensayos terapéuticos en forma de recombinante humano (Ancestim, Recombinant-methionyl Human Stem Cell Factor (R-metHuSCF) (denominación inglesa), bajo el nombre de Stemgen[®] (denominación inglesa) producto de la compañía Amgen).

55 Se debe destacar que los recombinantes humanos del G-CSF son eficaces en otras especies animales (Gratwohl *et al*: Transplantation of G-CSF mobilized allogeneic peripheral blood stem cells in rabbits. Bone Marrow Transplant 1995; 16(1): 63-68); Nohynek GJ *et al*; Comparison of potency of glycosylated and non glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factors in neutropenic and non neutropenic CD rats (Cancer Chemother

Pharmacol, 1997; 39: 259-266).

Se debe destacar que las nuevas clases de moléculas pueden aumentar el poder movilizador de los factores de crecimiento sobre la médula ósea (Kronenwett R *et al*: The role of cytokines and adhesion molecules for mobilisation of peripheral blood stem cells, *Stem Cells* 2000; 18: 320-330; Pless M *et al*: Synergy of growth factors during mobilization of peripheral blood precursors cells with recombinant Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor in rabbits. *Exp Hematol* 1999; 27: 155-161; Kikuta T *et al*: Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol*. 2000; 28:311-317; Sweeney EA *et al*: Increase in circulating SDF-1 after treatment with sulfated glycans. The role of SDF-1 in mobilization. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938:48-52; Papayannopoulou R *et al*: Synergistic mobilization of hematopoietic progenitor cells using concurrent beta 1 and beta 2 integrin blockade or beta2-deficient mice. *Blood* 2001; 97:1282-1288; Christ O *et al*: Combining G-CSF with a blockade of adhesion strongly improves the reconstitutive capacity of mobilized hematopoietic progenitor cells. (*Exp Hematol* 2001; 29: 380-390).

Sin embargo, el G-SCF presenta a su vez un poder de movilización indirecto de la médula ósea además de su efecto proliferativo sobre la línea hematopoyética (Levesque JP *et al*; Vascular cell adhesion molecule-1 (CD-106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; 98:1289-1297).

Es conveniente recordar que la médula ósea, repartida en los diferentes huesos del organismo, es el lugar de producción de las células sanguíneas maduras (eritrocitos, plaquetas, polinucleares, monocitos, linfocitos). La producción de las células sanguíneas tiene lugar a partir de la multiplicación y de la diferenciación de una población de células madre (célula madre hematopoyética, abreviada "CSH"). Estas últimas representan cuantitativamente una fracción muy reducida de la población celular de la médula ósea. Se caracterizan clásicamente por la expresión de un marcador celular denominado CD34 (Grupo de diferenciación 34).

Sin embargo, se ha descrito otro tipo de células madre de la médula ósea. Esta población de células madre constituye, también, en el estado normal un contingente muy reducido de los elementos celulares de la médula ósea, pero presenta la capacidad de diferenciarse en múltiples direcciones de naturaleza conjuntiva (hueso, cartílago, fibro-tendón, músculo, grasa) (Pittenger *et al*: Multilineage potential of human mesenchymal stem cells, *Science* 1999; 284: 143-147; Dennis *et al*: A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999; 14 (5): 700-709; Seshi *et al*: Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal stem lineage. *Blood Cell Mol Dis* 2000 (3): 234-246), pero también de naturaleza nerviosa (Woodbury D *et al*: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-370; Sanchez-Ramos J *et al*: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000; 164:247-256; Mezey E *et al*: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1672-1674; Azizi SA *et al*: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in brains of albino rats- similarities to astrocytes graft. *Proc Nat Acad Sci*. 1998; 95:3908-3913; Kopen GC *et al*: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum; and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Nat Acad Sci*: 1999; 96: 10171-10176; Brazelton TR *et al*: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-1779); endotelial (Shi Q *et al*: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367; Asahara T *et al*: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post natal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228) o incluso hepática (Lagasse E *et al*: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*, 2000; 6:1229-1234).

La médula ósea, como fuente particularmente potente de células madre pluripotentes, está claramente indicada por la reciente publicación de Krause *et al* (Krause D *et al*: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377), mediante la re-inseminación, en este último estudio, de la totalidad del tejido hematopoyético a partir de una única célula trasplantada, y unas vías de diferenciación *in vivo* muy numerosas con unas células "hijas" encontradas en múltiples órganos (hígado, tubo digestivo, pulmón, piel). Estas células madre se denominan células madre pluripotentes (abreviada "CSP") o también células madre adultas por oposición a las células madre procedentes de embriones.

Se debe destacar que la médula ósea no es la única fuente de células madre. Determinadas zonas del cerebro pueden producir unas células madre pluripotentes (Bjornson CRR *et al*: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1998; 283:534-537; Rietze RL *et al*: Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001; 412:736-739), así como el músculo (Jackson KJ *et al*: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 14482-14486) o la piel (Fu X *et al*: Redifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo: *Lancet* 2001; 358: 1067-1068; Toma JG *et al*: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 778-784).

Sin embargo, en la actualidad, la médula ósea es la fuente mejor conocida de células madre, y también la fuente

más fácilmente "manipulable" farmacológicamente, en particular, debido a la amplia experiencia clínica adquirida en el campo de la hematología y de la oncología.

Esta población de células madre es objeto actualmente de una actividad intensa de investigación, en particular en los campos de la reparación ósea, de la cardiología, de la neurología, de la hematología, todo ello en el marco de los campos emergentes de la medicina que son la ingeniería tisular y la terapia celular. Sin embargo, como estas células madre constituyen en principio una cantidad particularmente pequeña de células, los procedimientos utilizados recurren muy a menudo a un paso *in vitro*. Para resumir, se recoge la médula ósea, y después *in vitro* se separa el contingente de las células madre del resto de las células de la médula, y estas células se cultivan después y se multiplican siempre *in vitro*. Eventualmente también pueden crecer artificialmente para conseguir una diferenciación específica. A continuación son re-inyectadas o re-implantadas en un lugar anatómico en el que contribuyen a la reconstitución de un tejido deteriorado, que puede ser un hueso (Bruder *et al*: Bone regeneration by implantation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Ortho Res 1998; 16 (2): 155-162) o bien un tendón (Awad HA *et al*: Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. Tissue Eng 1999; 5: 267-277; Butler DL *et al*: Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair. Clin Orthop 1999; 367 Suppl: S 324-332), músculo cardíaco (Jackson KA *et al*: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest 2001; 107: 1395-1402; Orlic D *et al*: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001; 410: 702-705). Sin embargo, estas técnicas requieren una colaboración con unos laboratorios muy especializados, lo cual limita su uso clínico habitual.

Las células madre de la médula son también de gran interés en el marco de la terapia génica donde se pueden utilizar como soporte para la transferencia de genes. Varios campos de la patología están implicados (Schwarz EJ *et al*: Multipotential marrow stroma cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in rat model of Parkinson disease. Hum Gene Ther 1999; 10: 2539-2545; Ding L *et al*: Bone marrow stromal cells as a vehicle for gene transfer. Gene Ther 1999; 6: 1611-1616).

Aunque inicialmente haya dado lugar a discusiones (Purton LE *et al*: Monocytes are the likely candidate "stromal" cell in G-CSF mobilized peripheral blood. Bone Marrow Transplant. 1998; 21: 1075- 1076), la presencia de un contingente circulante de células madre pluripotentes (Células madre pluripotentes circulantes, abreviado "CSPC") actualmente está cada vez más documentada (Huss R *et al*: Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34 (+/- low) hematopoietic stem cells clones with mesenchymal stem cell characteristics. Stem Cell 2000; 18 (4): 252-260; Zvaifler NJ *et al*: Mesenchymal precursor cells in blood of normal individuals; Arthritis Res 2000; 2: 477-488; Lange *et al*: Hematopoietic reconstruction of syngenic mice with a peripheral blood derived monoclonal CD34, Sca-1+, Thy 1 (low) c-kit+ stem cell lineage. J Hematother Stem Cell Res. 1999; 8 (4): 335-342; Kuznetsov SA *et al*: Circulating skeletal stem cells; J Cell Biol 2001; 153: 1133-1140). También se ha explorado la vía de diferenciación endotelial de estas células (Rafii S: Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. J Clin Invest 2000; 105: 17-19, Boyer M *et al*: Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. J Vasc Surg 2000; 31: 181-189). También están documentados la movilización de células madre desde la médula ósea hacia la sangre por la isquemia tisular (Takahashi T *et al*: Ischemia and cytokine induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularization Nature Medicine 1999; 5: 434-438), los traumatismos vasculares o las quemaduras. (Gill M *et al*: Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 (+) AC133 (+) endothelial precursor cells. Cir Res 2001; 88 :167-174). El VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) sería uno de los mediadores implicados en el proceso de movilización (Asahara T *et al*: VEGF contributes to postnatal neovascularisation by mobilizing bone-marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J 1999; 18: 1364-1372); Moore MA *et al*: Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF and angiopoietin-1. Ann N Y Acad Sci 2001; 938:36-45). Estos últimos estudios podrían indicar que un proceso de movilización de las células madre de la médula ósea es un mecanismo fisiopatológico ya utilizado por el organismo en unas determinadas situaciones patológicas.

Al igual que para las células madre de la médula, las CSPC son un apoyo para la transferencia de genes (Bodine DM *et al*: Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment by granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. Blood 1994; 84: 1482-1481).

Unos estudios recientes han sugerido también un mecanismo de reclutamiento de las CSPC en los procesos de cicatrización fibroconjuntiva en unos modelos animales *in vivo* (Abe R *et al*: Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathways and migration to wound sites. The J Immunol 2001; 166:7556-7562; Bucala R *et al*: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med. 1994; 1: 71-81). Asimismo se sospecha que las CSPC también participan en la patogénesis del proceso de fibrosis patológica (esclerodermia) (Chesney J *et al*: Peripheral blood fibrocytes: mesenchymal precursor cells and the patogénesis of fibrosis. Curr Rheumatol Rep. 2000; 2: 501-505). Sin embargo ya se sospechaba con anterioridad que estas células madre circulantes estaban implicadas en determinadas patologías específicas (Labat ML *et al*: Monocytic origin of fibroblasts: spontaneous transformation of blood monocytes into neofibroblastic structures in osteomyelolerosis and Engelmann's disease. Biomed Pharmacother. 1991; 45: 289-299; Labat ML *et al*: Possible monocytic origin of chondrosarcoma: in vitro transdifferentiation of blood monocytes-like cells from a patient with chondrosarcoma into chondrocyte-like cell. Biomed Pharmacother. 1997; 51: 79-93). Unos mecanismos inmunológicos originales también

controlarían la proliferación y la diferenciación de estas CSPC (Labat ML *et al*: Regulation by phagocytic T-lymphocytes of a pluripotent organ stem cell present in adult human blood. A beneficial exception to self-tolerance. Biomed Pharmacother. 2001; 55: 79-80).

5 Se debe recordar también que a lo largo de los procesos de reparación tisular, existe de un modo general una contribución de células madre locales. Las células basales de la epidermis contribuyen también a la reparación de la piel, las células satélite del músculo contribuyen también a la reparación muscular, y los elementos celulares de la capa basal del periostio contribuyen clásicamente a la reconstrucción ósea. Determinados tejidos, tales como el hueso en caso de fractura o la piel en el caso de una quemadura superficial, son capaces de una reconstitución "*ad integrum*".

Otros tejidos, tales como el corazón y el cerebro, eran hasta la actualidad conocidos por ser incapaces de regenerarse después de su destrucción (infarto de miocardio o accidente vascular cerebral). Sin embargo, unos estudios recientes han demostrado de hecho una cierta capacidad del tejido cardíaco para regenerarse a partir de células del borde de las zonas lesionadas. (Beltrami AP *et al*: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. New Engl J Med 2001; 344: 1750-1757). Se ha discutido también la activación de células madre ya presentes a nivel del cerebro (Kondo T *et al*: Oligodendrocytes precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells: Science 2000: 289; 1754-1757) poniendo en duda antiguos conceptos, en particular el carácter irreversible de la diferenciación celular. El lugar de las CSPC en estos procesos de regeneración todavía se discute, pero los estudios de terapia celular recientes indican unas posibilidades importantes para el corazón (Jackson KA *et al*: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest 2001; 107: 1395-1402; Orlic D *et al*: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001; 410:702-705; Kocher AA *et al*: Neovascularisation of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblast prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nature Medicine. 2001; 7: 430-436). Se debe destacar que en el caso de los estudios de Kocher AA *et al*, el "trasplante" de células madre se realiza no sólo a partir de una extracción directa de la médula, sino a partir de las células madre movilizadas desde la médula ósea hacia la sangre, sugiriendo el mismo potencial biológico para las CSPC como para las CSP de la médula ósea. El estudio de Jackson KA *et al* también tiene gran interés puesto que después de la irradiación y el trasplante de médula de células madre marcadas, estos estudios indican una migración de las células madre marcadas hacia el lugar intracardíaco del infarto de miocardio. Se encuentra en este caso la noción de reclutamiento específica de las células madre circulantes en el espacio tisular a lo largo de la reconstrucción.

En el marco de la patología cerebral, la liberación local de las células madre parece aportar un beneficio terapéutico (Eglitis Ma *et al*: Targeting of bone marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. Neuroreport 1999; 10: 1289-1292; Lu D *et al*: Intraarterial, administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. J Neurotrauma 2001; 18: 813-819; Chen J *et al*: Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. J Neurol Sci. 2001; 189: 49-57; Mahmood A *et al*: Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. J Neurosurg 2001; 94: 589-595).

En resumen, se desprende del conjunto de estas observaciones que la médula ósea constituye una reserva principal de células madre pluripotentes. Estas células madre se encuentran en la sangre circulante, el número de CSPC se puede incrementar mediante la utilización de los factores de crecimiento como el G-CSF, el GM-CSF o el SCF mediante la movilización de las estas células madre de la médula ósea hacia la sangre. Este proceso de movilización de las células madre de la médula ósea hacia la sangre podría existir en el estado natural como mecanismo de respuesta a unas situaciones de sufrimiento o de agresión tisular. También se discute un mecanismo de reclutamiento en el estado natural de las CSPC, en particular en el proceso de reparación fibrocicatrizal, pero también se han sugerido en unos modelos experimentales de sufrimiento tisular y unos modelos patológicos específicos. Los solicitantes han expuesto ampliamente en el marco de la patología osteo-articular el interés de la movilización de las células madre de la médula ósea mediante el G-CSF y la existencia del reclutamiento de estas células en los espacios titulares de reconstrucción del hueso.

Los diferentes estudios de los solicitantes ya han indicado que en el marco de la patología osteo-articular se ha puesto en funcionamiento un mecanismo de reclutamiento local de las CSPC durante las fracturas óseas en particular mediante la activación del periostio. Estas células madre, al salir de los vasos sanguíneos, se ponen a la disposición del proceso de reconstrucción tisular local como unos "ladrillos" que contribuyen a la construcción de un edificio y completan el aporte directo de las células madre locales. En términos cuantitativos, la importancia del reclutamiento local de CSPC depende no obstante del número de células madre presentes en el torrente sanguíneo, a nivel de los vasos situados en la zona de reconstrucción tisular. Tal como se ha mencionado anteriormente, esta población de células madre es, en el sujeto sano, cuantitativamente muy reducida en la médula ósea y la sangre circulante. Sin embargo, el G-CSF, el GM-CSF y el SCF presentan un poder proliferativo potente y de movilización de la médula ósea. A pesar de que la línea hematopoyética esté sobre todo implicada por este poder proliferativo, el contingente de células madre pluripotentes está también implicado; estos diferentes factores de crecimiento al aumentar el número de CSPC en la sangre circulante pueden poner a disposición del proceso de reconstrucción tisular un número de células madre superior al que la naturaleza hubiera podido suministrar en el estado natural. A partir de la misma hipótesis fisiopatológica, se había demostrado la utilidad del G-CSF como tratamiento adyuvante

al proceso de reparación ósea y cartilaginosa en los estudios de los solicitantes. Los estudios recientes realizados en el campo de la patología cardíaca parecen reforzar esta hipótesis con un beneficio terapéutico del G-CSF combinado con el SCF para el tratamiento del infarto de miocardio reduciendo la superficie final del infarto y conservando la función cardíaca (Orlic D *et al*: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10344-10349).

En este contexto, los solicitantes han ensayado *in vivo* la influencia de un tratamiento con factores de crecimiento sobre un accidente vascular cerebral. Partiendo de los datos anteriores, los solicitantes han estudiado la influencia de la estimulación de la médula ósea por el G-CSF, el GM-CSF y el SCF sobre el proceso de reparación del tejido nervioso.

Los solicitantes han descubierto, de forma sorprendente, una nueva aplicación terapéutica del G-CSF y del SCF como los definidos anteriormente. Se ha descubierto, tras estos estudios, que el G-CSF y el SCF se podían utilizar para la preparación de un medicamento para el tratamiento adyuvante al proceso de reconstrucción de los tejidos nerviosos en un ser vivo, siendo el medicamento administrado por vía general.

De acuerdo con la invención, se pueden utilizar por lo menos uno de estos dos factores, o bien un sólo factor, o bien los dos factores.

Se debe recordar que el accidente vascular cerebral isquémico es la consecuencia de la obstrucción de un vaso sanguíneo que irriga el tejido cerebral. La destrucción del tejido nervioso privado de oxígeno en el territorio anatómico afectado implica un déficit funcional de tipo motor, sensitivo o cognitivo; existen también unos accidentes vasculares de tipo hemorrágico (por ejemplo a consecuencia de una crisis de hipertensión arterial o por la rotura de un aneurisma). En este caso el parénquima cerebral se destruye por la sufusión hemorrágica, provocando los traumatismos craneales y los traumatismos de la médula espinal unas destrucciones directas del tejido nervioso.

A continuación se describirá un ejemplo experimental.

Se constituyen dos grupos de animales:

Un primer grupo (A) (grupo control) presentaba 20 ratas adultas jóvenes, y en este grupo se provocaba un accidente vascular cerebral mediante la ligadura de la arteria cerebral media durante dos horas.

Un segundo grupo (B) presentaba un número idéntico de animales de la misma edad y del mismo peso y se provocaba el mismo tipo de accidente vascular. Sin embargo, inmediatamente después de la intervención y los cuatro días siguientes a la intervención, se administraba una inyección de rmetHuG-CSF (Neupogen® {Filgrastime}) por vía subcutánea a una dosis de 10 µg (1 MU) por kilogramo de peso corporal.

Para poder trabajar verdaderamente "a ciegas" y con el fin de no influir en la calidad de los gestos quirúrgicos de ligadura arterial y de la retirada de ligadura realizados en cada grupo, el cirujano ignoraba si el animal operado pertenecía al grupo A o al grupo B.

A continuación, se dejaba a los dos grupos de animales sin ningún tratamiento, excepto el aporte de agua y de alimento necesario para las necesidades vitales. Quince días después de la fecha de la intervención se sometía los animales a unos ensayos funcionales neurológicos (ensayo de Rotarod, escala de gravedad neurológica modificada). Los resultados indicaban una reducción de los déficits funcionales en el grupo B con respecto al grupo control.

La invención se refiere por lo tanto más particularmente a la utilización de por lo menos uno de los factores seleccionados de entre el G-CSF y el SCF en la preparación de un medicamento para el tratamiento adyuvante en los procesos de reconstrucción de los tejidos nerviosos, estando el medicamento destinado a una administración por vía general. Estos factores encuentran también una aplicación nueva e interesante en las terapias quirúrgicas y/o médicas utilizadas en el marco de la patología del sistema nervioso.

De acuerdo con la invención, el G-CSF y el SCF se pueden utilizar como medicamento en el tratamiento de los accidentes vasculares cerebrales isquémicos o hemorrágicos, de los traumatismos cerebrales, de los accidentes vasculares hemorrágicos o isquémicos de la médula espinal, y de los traumatismos de la médula espinal. En estas diferentes aplicaciones, el G-CSF y el SCF están destinados a la administración por vía general.

Asimismo, entra en el marco de la invención utilizar el G-CSF o el SCF como medicamento destinado a la administración por vía general y combinarlo con por lo menos otro factor destinado a la administración local o por vía general. La expresión "administración local" significa que la administración del principio terapéutico se efectúa sobre el sitio anatómico en el que se desea reconstruir el tejido nervioso.

Este otro factor se selecciona ventajosamente de entre por lo menos uno de los factores siguientes: BMP (Bone Morphogenetic Protein), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulina-like growth

- 5 factor), insulina, KGF (keratinocyte growth factor), TGF (transforming growth factor), interferón, interleucina, VEGF (vascular endotelial growth factor), TNF (tumor necrosing factor), GDNF (glial cell ligne-derived neurotrophic factor), NGF (neurotrophin nerve growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), eritropoyetina, PDGF (platelet-derived growth factor), heparano sulfato, prostaglandinas, osteoglicina (osteoinductive factor), BCDF (B cell differentiation factor), GDF-5 (growth and differentiation factor-5), hormona de crecimiento; M-CSF (macrophage colony stimulating factor); cualquier factor de crecimiento conocido de origen humano o animal, de extracción o recombinante; cualquier factor biológico que refuerza el poder de movilización de las células madre de la médula ósea hacia la sangre circulante.
- 10 Para realizar la invención, el G-CSF y el SCF son ventajosamente un recombinante humano (para la medicina humana), el Filgrastime, el Lenograstime, y el Ancestime.
- 15 El G-CSF y el SCF utilizados serán preferentemente de un alotipo humano en el marco del tratamiento de una persona. La dosis utilizada será generalmente de 0,1 a 1.000 µg por kilogramo de peso corporal y por día. De forma preferida, se utilizará una dosis de 5 a 10 µg por kilogramo de peso corporal y por día.
- 20 El principio de la invención quiere que el G-CSF y el SCF se administren por vía general, lo cual significa que el G-CSF y el SCF entran en la circulación sanguínea general. El modo de liberación para obtener una administración por vía general puede comprender un modo por inyección intravascular directa, un modo por inyección subcutánea, por inyección intramuscular, por inyección intra-articular, una liberación por vía digestiva, inyección intraperitoneal, liberación transpulmonar, transcutánea, transbucal, transnasal, transrectal, transconjuntiva, o intrarraquídea.
- 25 El principio biológico de la invención es movilizar las CSP de la médula ósea hacia la sangre circulante. Este incremento en el número de células madre en la circulación sanguínea permite que el proceso biológico de reconstrucción del tejido nervioso reclute una cantidad de CSPC superior a la cantidad de CSPC que la naturaleza hubiera podido proporcionar en el estado fisiológico.
- La invención se describirá a continuación haciendo referencia a un ejemplo clínico.
- 30 En el marco del tratamiento de los accidentes vasculares cerebrales, se utilizará el tratamiento estándar de reanimación médica, de investigación y de tratamiento de la causa del accidente vascular cerebral.
- 35 El tratamiento adyuvante implicará una primera dosis de 10 µg (1 MU) por kilogramo de peso corporal de G-CSF (Neupogen[®], Filgrastime) que se inyectará por vía subcutánea al paciente desde su ingreso en el hospital. Se inyectará la misma dosis diariamente durante los cuatro días siguientes.
- Se podrá aplicar el mismo principio de tratamiento adyuvante a los traumatismos cerebrales y a los traumatismos de la médula espinal.
- 40 Evidentemente, el ejemplo anterior se proporciona únicamente a título ilustrativo y no pretende limitar el alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización del G-CSF (Factor de estimulación de las colonias de granulocitos) para la preparación de un medicamento útil como tratamiento adyuvante en un proceso de reconstrucción de los tejidos nerviosos en un ser vivo, estando el medicamento destinado a la administración por vía general.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque el G-CSF se utiliza como medicamento en el tratamiento de los accidentes vasculares cerebrales isquémicos o hemorrágicos, de los traumatismos cerebrales, de los accidentes vasculares hemorrágicos o isquémicos de la médula espinal, de los traumatismos de la médula espinal y está destinado a la administración por vía general.
- 15 3. Utilización según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el G-CSF se utiliza como medicamento destinado a la administración por vía general y se combina con por lo menos otro factor destinado a la administración local o por vía general.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada porque este otro factor se selecciona de entre por lo menos uno de los factores siguientes: BMP (Bone Morphogenetic Protein), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulina-like growth factor), insulina, KGF (keratinocyte growth factor), TGF (transforming growth factor), interferón , interleucina, VEGF (vascular endotelial growth factor), TNF (tumor necrosing factor), GDNF (glial cell ligne-derived neurotrophic factor), NGF (neurotrophin nerve growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), eritropoeytina, PDGF (platelet-derived growth factor), heparano sulfato, prostaglandinas, osteoglicina (osteoinductive factor), BCDF (B cell differentiation factor), GDF-5 (growth and differentiation factor-5), hormona de crecimiento; M-CSF (macrophage colony stimulating factor); cualquier factor de crecimiento conocido de origen humano o animal, de extracción o recombinante; cualquier factor biológico que refuerza el poder de movilización de las células madre de la médula ósea hacia la sangre circulante.
- 25 5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el G-CSF es un recombinante humano.
- 30 6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el G-CSF es el Filgrastime.
- 35 7. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el G-CSF es el Lenograstime.
8. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el medicamento se utiliza a una dosis de G-CSF de 0,1 a 1.000 µg, preferentemente de 5 a 10 µg por kilogramo de peso corporal y por día.
9. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el medicamento se utiliza en medicina humana.
- 40 10. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el medicamento se utiliza en medicina veterinaria.