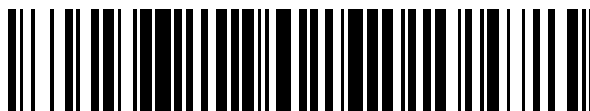


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 009**

51 Int. Cl.:
A61K 31/33 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02750370 .5**
96 Fecha de presentación: **30.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1411918**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Métodos para movilizar las células madre/progenitoras**

30 Prioridad:
31.07.2001 US 309196 P
20.05.2002 US 382155 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

73 Titular/es:
GENZYME GLOBAL S.A.R.L.
9, PARC D'ACTIVITÉ SYRDALL
5365 MÜNSBACH, LU

72 Inventor/es:
BRIDGER, Gary, J.;
ABRAMS, Michael, J.;
HENSON, Geoffrey, W.;
MACFARLAND, Ronald, Trevor;
CALANDRA, Gary, B.;
DALE C. David y
BROXMEYER, Hal E.

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 380 009 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

Métodos para movilizar las células madre/progenitoras

Campo Técnico

5 La invención está en el campo de terapéuticos y química medicinal. Más particularmente, la invención se refiere a los métodos para movilizar las células progenitoras/madre en sujetos, mediante la administración de ciertas poliaminas.

Antecedentes de la Técnica

10 Las células sanguíneas juegan una parte crucial en el mantenimiento de la salud y la viabilidad de animales, incluyendo humanos. Los glóbulos blancos incluyen neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y basófilos/células mastoides así como las células B y T del sistema inmune. Los glóbulos blancos se reemplazan continuamente vía el sistema hematopoyético, mediante la acción de factores estimuladores de colonias (CSF) y varias citoquinas en células madre y células progenitoras en tejidos hematopoyéticos. Las secuencias de nucleótido que codifica un número de estos factores de crecimiento han sido clonadas y secuenciadas. Tal vez el más ampliamente conocido de estos es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el cual ha sido probado para su uso en
15 contrarrestar los efectos negativos de la quimioterapia, mediante la estimulación de la producción de glóbulos blancos y las células progenitoras (movilización de la célula madre de sangre periférica). Una discusión de los efectos hematopoyéticos de este factor se pueden encontrar, por ejemplo, en U. S. Patent No. 5,582,823.

20 Se han reportado otros factores para incrementar los glóbulos blancos y las células progenitoras en ambos sujetos humanos y animales. Estos agentes incluyen factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-3 (IL-3), Interleucina-8 (IL-8), PIXY-321 (proteína de fusión GM-CSF/IL-3), de una proteína inflamatoria de macrófagos, factor de célula madre, trombopoyetina y oncogen relacionado con el crecimiento, como agentes únicos o en combinación (Dale, D., et al., Am. J. of Hefnatol. (1998) 57: 7-15; Rosenfeld, C., et al., Bone Marrow Transplantation (1997) 17: 179-183; Pruijt, J., et al., Cur. Op. ira Hematol. (1999) 6: 152-158; Broxmeyer, H., et al., Exp. Hemato. (1995) 23: 335-340; Broxmeyer, et al., Blood Cells, Molecules and Diseases (1998) 24: 14-30; Glaspy, J., et al., Cancer Chemother. Pharmacol. (1996) 38 (suppl) : S53-S57 ; Vadhan-Raj, S., et al., Aran. Inter[^]rz. Med. (1997) 126: 673-81 ; King, A., et al., Blood (2001) 97:1534-1542; Glaspy, J., et al., Blood (1997) 90: 2939-2951).

30 Mientras que los factores de crecimiento endógenos son efectivos farmacológicamente, las desventajas bien conocidas de emplear proteínas y péptidos como productos farmacéuticos subyace la necesidad de añadir al repertorio de tales factores de crecimiento con agentes que sean moléculas pequeñas. En otro aspecto, tales moléculas pequeñas tienen ventajas sobre las proteínas y péptidos cuando se desea una producción de grandes cantidades.

35 Se ha descrito un número de agentes antivirales de poliamina cíclica, en una serie de solicitudes y patentes de EE. UU., en los últimos años. Estas son las patentes, U. S. Patent Nos. 5,021, 409; 6,001, 826; 5, 583, 131; 5,698, 546; y 5,817, 807. PCT publications WO 00/02870 basada en la solicitud presentada el 8 de Julio de 1998 y WO 01/44229, basada en la solicitud presentada el 17 de Diciembre de 1999, la cual describe los compuestos adicionales. Estas publicaciones describen las características estructurales de los agentes antivirales de poliamina cíclica.

40 Las características estructurales de un número de agentes antivirales de amina no-cíclica, también han sido descritas en una serie de solicitudes de EE. UU., ahora publicadas como publicaciones PCT. Estas publicaciones son, WO 00/56729, basada en la solicitud presentada el 24 de Marzo del 2000; WO 02/22600, basada en las solicitudes presentadas el 15 y 20 de Septiembre del 2000; WO 02/22599, basada en las solicitudes presentadas el 15 y 22 de Septiembre del 2000, así como WO 02/34745 publicada el 2 de Mayo del 2002.

45 Además, métodos mejorados para la preparación de algunos de los compuestos de poliamina cíclica, se describen en U. S. Patent Nos. 5,612, 478; 5,756, 728; 5,801, 281; y 5,606, 053 y PCT publication WO 02/26721, basada en la solicitud presentada el 29 de Septiembre del 2000.

50 Previamente hemos encontrado, y se han revelado en PCT publication WO 02/58653, basada en la solicitud presentada el 1 de Febrero del 2000, que algunos de los agentes antivirales de poliamina descritos en las publicaciones mencionadas anteriormente tienen el efecto de incrementar el recuento de glóbulos blancos. Ahora se ha encontrado que los agentes antivirales de poliamina descritos en las publicaciones mencionadas anteriormente también tienen el efecto de incrementar las células progenitoras y/o las células madre.

El desarrollo y maduración de glóbulos rojos es un proceso complejo. Los glóbulos rojos maduros se derivan de células precursoras hematopoyéticas, células (progenitoras) y células madre presentes en tejidos hematopoyéticos

específicos incluyendo la médula ósea. Dentro de estos ambientes las células hematopoyéticas proliferan y se diferencian antes de entrar en circulación. El receptor de quimiocina CXCR4 y su factor-1 derivado de la célula estromal del ligando natural (SDF-1), parece que es importante en este proceso (para comentarios ver Maekawa, T., et al., *Internal Med.* (2000) 39:90-100; Nagasawa, T., et al., *Int. J. Hematol.* (2000) 72:408-411). Esto se demuestra mediante informes de que ratones carentes de CXCR4 o SDF-1 muestran defectos hematopoyéticos (Ma, Q., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1998) 95:9448-9453; Tachibana, K., et al., *Nature* (1998) 393:591-594; Zou, Y-R., et al., *Nature* (1998) 393:595-599). También se conoce que las células progenitoras CD34+ expresan CXCR4 y necesitan SDF-1 producido por las células estromales de la médula ósea para quimioatracción e injerto (Peled, A., et al., *Science* (1999) 283:845-848) y que *in vitro*, SDF-1 es quimiotáctico para ambas células CD34+ (Aiuti, A., et al., *J. Exp. Med.* (1997) 185:111-120; Viardot, A., et al., *Ann. Hematol.* (1998) 77:194-197) y para las células progenitoras/madre (Jo, D-Y., et al., *J. Clin. Invest.* (2000) 105:101-111). SDF-1 también es un importante quimioatrayente, que señala la vía del receptor CXCR4, para otras varias células progenitoras y glóbulos rojos maduros más comprometidos incluyendo linfocitos-T y monocitos (Bleul, C., et al., *J. Exp. Med.* (1996) 184:1101-1109), linfocitos pro-y pre-B (Fedyk, E. R., et al., *J. Leukoc. Biol.* (1999) 66:667-673; Ma, Q., et al., *Immunity* (1999) 10:463-471) y megacariocitos (Hodohara, K., et al., *Blood* (2000) 95:769-775; Riviere, C., et al., *Blood* (1999) 95:1511-1523; Majka, M., et al., *Blood* (2000) 96:4142-4151; Gear, A., et al., *Blood* (2001) 97:937-945; Abi-Younes, S., et al., *Circ. Res.* (2000) 86:131-138).

Así, en resumen, parece que SDF-1 es capaz de controlar el posicionamiento y la diferenciación de las células que llevan los receptores CXCR4 si estas células son células madre (i.e., células que son CD34+) y/o células progenitoras (que resultan en la formación de tipos específicos de colonias en respuesta a estímulos particulares; que pueden ser CD34+ o CD34-) o células que son algo más diferenciadas.

Recientemente, una considerable atención se ha centrado en el número de células CD34+ movilizadas en la mezcla de células progenitoras de sangre periférica utilizada para el trasplante de células madre. Se piensa que la población de CD34+ es el componente en primer lugar responsable del tiempo de recuperación mejorado después de la quimioterapia y las células más comúnmente responsables para el injerto a largo plazo y la restauración de la hematopoyesis (Croop, J. M., et al., *Bone Marrow Transplantation* (2000) 26:1271-1279). El mecanismo por el cual las células CD34+ se re-injertan puede ser debido a los efectos quimiotácticos de SDF-1 en las células que expresan CXCR4 (Voermans, C. *Blood*, 2001, 97, 799-804; Ponomaryov, T., et al., *J. Clin. Invest.* (2000) 106: 1331-1339). Más recientemente, se demostró que las células hematopoyéticas madre adultas eran capaces de restaurar el tejido cardíaco dañado en ratones (Jackson, K., et al., *J. Clin. Invest.* (2001) 107:1395-1402; Kocher, A., et al., *Nature Med.* (2001) 7:430-436).

Así, el papel del receptor CXCR4 en la administración del posicionamiento y diferenciación celular, ha asumido una significancia considerable.

La citación de los documentos anteriores, no tiene la intención de ser una admisión de que cualquiera de lo anterior es pertinente a la técnica anterior. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o la representación en cuanto a los contenidos de estos documentos se basa en la información disponible a los aplicantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

Divulgación de la Invención

La invención está dirigida a los métodos para obtener las células progenitoras y/o madres de sujetos animales, en particular, sujetos veterinarios y humanos. Las células progenitoras y/o madres se pueden cultivar y utilizar en el trasplante de células. Los métodos de la invención emplean el compuesto 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciotetradecano o las sales farmacéuticamente aceptables y los complejos metálicos de este.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención está dirigida a un método para obtener células progenitoras y/o células madre de un sujeto, método que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad del compuesto anterior o una sal farmacéuticamente aceptable o complejo metálico de este, suficiente para movilizar los niveles de células progenitoras y/o células madre en la sangre periférica de dicho sujeto, seguido por la recolección de dichas células progenitoras y/o madres. En una modalidad, las células progenitoras y/o madres de la médula ósea se movilizan para la reparación del miocardio.

La invención también se dirige a un compuesto para utilizar en un método, para tratar un déficit hematopoyético en un sujeto, en donde dicho método comprende:

(a) la administración a dicho sujeto de una cantidad de un compuesto, suficiente para movilizar las células progenitoras y/o madres en la sangre periférica de dicho sujeto,

(b) la recolección de dichas células progenitoras y/o madres, y

(c) el trasplante de dichas células progenitoras y/o madres a dicho sujeto, en donde dicho compuesto es el 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano o una sal farmacéuticamente aceptable o complejo metálico de este.

Las formas preferidas de los compuestos de la invención se discuten a continuación.

5 Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra una gráfica de obtención de progenitoras mieloides en respuesta al tratamiento con el 1,1'-[1,4-fenileno-bis (metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (AMD3100) en combinación con una proteína inflamatoria de macrófagos después de la administración de G-CSF.

Modos de Llevar a Cabo la Invención

10 Los compuestos útiles en la invención son el 1,1'-[1,4-fenileno-bis(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano y las sales farmacéuticamente aceptables y los complejos metálicos de este.

15 Los compuestos anteriores inhiben la replicación del VIH vía inhibición del CXCR4, el co-receptor necesario para la fusión y la entrada de cepas de VIH T-tropicas, y también inhiben el enlace y la señalización inducida por el ligando natural, la quimiocina SDF-1. Mientras que no desea estar unidos por ninguna teoría, los compuestos anteriores que inhiben el enlace de SDF-1 con CXCR4 ocasionan un aumento en la células madre y/o progenitoras en virtud de dicha inhibición. La estimulación de las células madre y/o progenitoras en sangre es útil en tratamientos para aliviar los efectos de los protocolos que afectan adversamente la médula ósea, tales como aquellos que resultan en la leucopenia. Estos son efectos secundarios conocidos de la quimioterapia y radioterapia. Los compuestos anteriores también mejoran el éxito del trasplante de la médula ósea, mejoran la cicatrización de heridas y tratamiento de quemaduras, y ayudan en la restauración de tejido del órgano dañado. También combaten las infecciones bacterianas que son prevalentes en leucemia. Los compuestos anteriores se utilizan para movilizar y recolectar las células CD34+ vía aféresis con y sin combinaciones con otros factores de movilización. Las células cultivadas se utilizan en tratamientos que necesitan trasplantes de células madre.

25 Como se utiliza en este documento, el término "células progenitoras" se refiere a las células que, en respuesta a ciertos estímulos, pueden formar células mieloides o hematopoyéticas diferenciadas. La presencia de las células progenitoras se puede evaluar por la capacidad de las células en una muestra para formar las unidades formadoras de colonias de varios tipos, incluyendo, por ejemplo, CFU-GM (unidades formadoras de colonias, granulocito-macrófago); CFU-GEMM (unidades formadoras de colonias, multipotencial); BFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides en ramilletes); HPP-CFC (células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo); u otros tipos de colonias diferenciadas, que se pueden obtener en cultivo utilizando protocolos conocidos.

30 Como se utiliza en este documento, las células "madre" son formas de células progenitoras menos diferenciadas. Por lo general, tales células a menudo son positivas para CD34. Sin embargo, algunas células madre no contienen este marcador. Estas células CD34+ se pueden evaluar utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y por lo tanto su presencia se puede evaluar en una muestra, utilizando esta técnica.

35 En general, las células CD34+ están presentes solo en bajos niveles en la sangre, pero están presentes en grandes números en la médula ósea. Mientras otros tipos de células tales como células endoteliales y células mastoides también pueden mostrar este marcador, CD34 se considera un índice de la presencia de células madre.

40 Las modalidades particularmente preferidas de los compuestos anteriores incluyen el 1,1'-[1,4-fenileno-bis(metileno)]-bis- 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, establecido en U.S. Patent No. 5,583,131, y designado en este documento como AMD3100.

Los métodos para sintetizar los compuestos útiles en la invención se establecen en las patentes de EE.UU y la solicitud, incorporadas anteriormente por referencia.

45 Como se proporciona anteriormente, AMD3100 es un antagonista con el receptor CXCR4 de la quimiocina (Gerlach et al., J.Biol. Chem. (2001) 276:14153-14160). Este compuesto interfiere con el enlace de la célula estromal de la médula ósea derivada de SDF-1 con CXCR4 en las células madre, lo que conduce a la liberación de las células hematopoyéticas madre a partir de la médula ósea en la circulación (Broxmeyer et al., Blood (2001) 98:811a (Abstract)). En una Fase 1 del estudio en la Universidad de Washington, Seattle, una dosis única de 80 µg/kg de AMD-3100 resulta en un recuento de WBC de 17,000/µl y un aumento de máximo 6-veces en la circulación de células CD34+ progenitoras/madre en el momento de 6 horas (Liles et al., Blood 2001 98:737a (Resumen)). En otro estudio reciente, los ratones fueron inyectados con rhG-CSF y Factor de Células Madre de rata recombinantes (rrSCF) con el fin de movilizar grandes números de células madre de la médula ósea en la circulación y luego se les indujo un ataque al corazón. La combinación de rrSCF y rhG-CSF proporciona un número máximo de células madre

circulantes después de 5 inyecciones diarias. A los 27 días después de la cirugía hubo un 68% en la mejora de supervivencia en el grupo tratado en comparación con los controles. En este momento el tejido muerto se reemplazó con la regeneración del miocardio y todos los parámetros funcionales probados se mejoraron en comparación con los controles (Orlic et al., PNAS (2001) 98:10344-10349).

5 Los compuestos de la invención se pueden preparar en la forma de profármacos, i.e., formas protegidas que liberan los compuestos de la invención después de la administración al sujeto. Por lo general, los grupos protectores se hidrolizan en fluidos corporales tales como en la corriente sanguínea, liberando así el compuesto activo o se oxidan o reducen *in vivo* para liberar el compuesto activo. Una discusión de los profármacos se encuentra en Smith and Williams Introduction to the Principles of Drug Design, Smith, H.J.; Wright, 2nd ed., London (1988).

10 Los compuestos de la invención, ya que son poliaminas, se pueden administrar preparados en las formas de sus sales de adición de ácido o complejos metálicos de este. Las sales de adición de ácido apropiadas incluyen sales de ácidos inorgánicos que sean biocompatibles, incluyendo HCl, HBr, sulfúrico, fosfórico y similares, así como ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, butírico y similares, así como ácidos que contienen más de un grupo carboxilo, tales como oxálico, glutárico, adípico y similares. Por lo general, a pH fisiológico, los compuestos de la invención están en las formas de las sales de adición de ácido. Se prefieren particularmente los clorhidratos. Además, cuando se preparan como formas purificadas, los compuestos también pueden ser cristalizados como los hidratos.

20 Los compuestos de la invención se pueden administrar como ingredientes activos solos, y/o en mezcla con ingredientes activos adicionales que sean terapéutica o nutricionalmente útiles, tales como antibióticos, vitaminas, extractos herbales, anti-inflamatorios, glucosa, antipiréticos, analgésicos, factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-3 (IL-3), Interleucina-8 (IL-8), PIXY-321 (proteína de fusión GM-CSF/IL-3), de una proteína inflamatoria de macrófagos, factor de célula madre, trombopoyetina, oncogen relacionado con el crecimiento o quimioterapia y similares.

25 Los compuestos de la invención se pueden formular para la administración a un sujeto animal utilizando técnicas de formulación entendidas normalmente bien conocidas en el oficio. Las formulaciones que son apropiadas para modos de administración particulares y para los compuestos anteriores se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Company, Easton, PA.

30 Preferiblemente, los compuestos se administran por inyección, más preferiblemente por inyección intravenosa, pero también por inyección subcutánea o intraperitoneal, y similares. Rutas adicionales de administración parenteral incluyen inyección intramuscular e intraarticular. Para la administración intravenosa o parenteral, los compuestos se formulan en forma líquida apropiada con excipientes según sea necesario. Las composiciones pueden contener liposomas u otros portadores apropiados. Para inyección vía intravenosa, la solución se hace isotónica utilizando preparaciones estándar tales como la solución de Hank.

35 Además de la inyección, otras rutas de administración también se pueden utilizar. Los compuestos se pueden formular en comprimidos, cápsulas, jarabes, polvos, u otras formas apropiadas para la administración por vía oral. Utilizando excipientes apropiados, estos compuestos también pueden ser administrados a través de la mucosa utilizando supositorios o aerosoles intranasales. La administración transdérmica también se puede realizar mediante el uso de penetrantes apropiados y que controlen la velocidad de liberación.

40 La formulación y ruta de administración elegida será ajustada al sujeto individual, la naturaleza de la condición que se trata en el sujeto, y en general, el juicio del médico tratante.

45 Los rangos de dosificación apropiados para los compuestos anteriores variará de acuerdo con estas consideraciones, pero en general, los compuestos se administran en el rango de aproximadamente 0.1 µg/kg-5 mg/kg del peso corporal; preferiblemente el rango es aproximadamente 1 µg/kg-300 µg/kg del peso corporal; más preferiblemente cerca de 10 µg/kg-100 µg/kg del peso corporal. Para un típico sujeto humano de 70-kg, por lo tanto, el rango de dosificación es de aproximadamente 0.7 µg-350 mg; preferiblemente cerca de 700 µg-21 mg; más preferiblemente cerca de 700 µg-7 mg. Las dosificaciones pueden ser mayores cuando los compuestos se administran por vía oral o transdérmica en comparación con, por ejemplo, la administración i.v.

Los compuestos se pueden administrar como una dosis de bolo única, una dosis en el tiempo, como en administración por vía transdérmica o i.v., o en múltiples dosificaciones.

50 Además, para dirigir la administración al sujeto, los compuestos anteriores se pueden utilizar en protocolos de tratamiento *ex vivo* para preparar los cultivos celulares que luego se utilizan para recargar los glóbulos rojos del sujeto. El tratamiento *ex vivo* se puede conducir en células autólogas cultivadas a partir de la sangre periférica o la médula ósea o a partir de injertos de donantes compatibles. La concentración del compuesto anterior o los

compuestos solos o en combinación con otros agentes, tales como proteína inflamatoria de macrófagos es un asunto de optimización rutinaria.

5 Los sujetos que responden favorablemente al método de la invención incluyen médicos y sujetos veterinarios generalmente, incluyendo pacientes humanos. Entre otros sujetos para los cuales los métodos de la invención son útiles, están los gatos, perros, animales grandes, aves tales como pollos, y similares. En general, cualquier sujeto que se beneficie de una elevación de células progenitoras y/o células madre, o cuyas células progenitoras y/o células madre son deseables para el trasplante de células madre son apropiados para la administración del método de la invención.

10 Las condiciones típicas que se pueden mejorar o se han beneficiado por la invención incluyen trastornos hematopoyéticos, tales como anemia aplásica, leucemias, anemias inducidas por los fármacos, y déficit hematopoyéticos a partir de la quimioterapia o radioterapia. La invención también es útil para potenciar el éxito del trasplante durante y después de los tratamientos inmunosupresivos, así como para realizar una cicatrización de heridas más eficiente y tratamiento de inflamación bacteriana. La presente invención además es útil para tratar los sujetos que estén inmunocomprometidos o cuyo sistema inmune, por otra parte, este deteriorado. Las condiciones
15 típicas que se mejoran o se han beneficiado por la presente invención, incluyen aquellos sujetos que se infectan con un retrovirus y más específicamente que se infecten con virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Así, la invención se dirige a un amplio espectro de condiciones para las cuales la elevación de las células progenitoras y/o las células madre en un sujeto sería beneficiosa o, cuando la recolección de las células progenitoras y/o células madre para el posterior trasplante de células madre sería beneficiosa.

20 Los compuestos de la invención también se administran para regenerar el miocardio mediante la movilización de las células madre de la médula ósea.

Ahora se ha descrito de forma general la invención, la misma se comprenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no tienen la intención de ser limitantes de la presente invención, salvo que se especifique.

25 **Ejemplo 1**

Elevación de los Niveles de Células Progenitoras de Ratón

30 Los efectos de la administración subcutánea (s.c.) del 1,1'-[1,4-fenileno-bis(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (AMD3100) para ratones C3H/H3 J en números de células progenitoras de macrófago granulocito (CFU-GM), eritroide (BFU-E), y multipotencial (CFU-GEMM) por mL de sangre, fueron determinados. Las progenitoras fueron estimuladas para formar colonias *in vitro* con la combinación de 1U/ml de rhu Epo, 50 ng/ml de rhu SLF, 5% ^{Vol}/_{Vol} medio condicionado de células de bazo de ratón pokeweed mitogen (PWMSM), y hemina 0.1 mM. Las placas fueron valoradas 7 días después de la incubación.

Los efectos dependientes del tiempo en el número de progenitoras movilizadas con AMD3100 son para una inyección s.c. única de 5 mg/Kg y se muestran en la Tabla 1.

35 Tabla 1

	Progenitoras Absolutas Por ML de Cultivo de Metilcelulosa en sangre		
	CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM
Control	289.8	49.4	25.8
AMD3100: 15"	791.6	134.5	90.4
AMD3100:30"	1805.5	209.3	113.5
AMD3100: 120"	828.7	102.3	47.6

Para determinar los efectos dependientes de la dosis, AMD3100 fue administrada a 1, 2.5, 5 y 10 mg/Kg vía una inyección s.c. única y el número de progenitoras por mL de sangre se determinó a 1 hora después de la administración, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Número Absoluto de Progenitoras Por ML de Cultivo de Metilcelulosa en sangre		
	CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM
Solución salina	188.1	16	19
AMD3100: 10mg/kg	825.6	120.5	79.8
AMD3100: 5mg/kg	608.4	92.8	69.5
AMD3100: 2.5mg/kg	687.6	98.9	70.6
AM D3 100: 1mg/kg	424	62	27.1

Veces de Cambio en Comparación con el Tiempo 0

Tiempo	Cultivo de Metilcelulosa de Progenitoras		
	GM	BFU-E	CFU-GEMM
15"	2.73	2.72	3.51
30"	6.23	4.24	4.41
2'	2.86	2.07	1.85

- 5 La movilización máxima de progenitoras de ratón se logra a una dosis de 2.5 a 10 mg/kg de AMD3100, aproximadamente 0.5 a 1 hora después de la inyección, como se muestra en la Tabla 3.

Ejemplo 2

Movilización de Células Progenitoras de Ratón en Combinación con MIP-1 α y G-CSF

- 10 La capacidad de movilización de las células progenitoras de AMD3100 en combinación con una proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α) de ratón (*mu*) fue probada con o sin la administración previa de rhu G-CSF. Se ha demostrado previamente que MIP-1 α moviliza las células progenitoras en ratones y humanos (Broxmeyer, H. E., et al., Blood Cells, Molecules, and Diseases (1998) 24(2):14-30).

- 15 Los grupos de ratones fueron aleatorizados para recibir diluyente control (solución salina) o G-CSF a una dosis de 2.5 μ g por ratón, dos veces al día, durante dos días vía inyección s.c.. Once horas después de la inyección final de solución salina o G-CSF, los ratones se dividieron en grupos para recibir MIP-1 α administrado I.V. a una dosis total de 5 μ g, AMD3100 se administró s.c. a una dosis de 5 mg/Kg, o una combinación de ambos MIP-1 α y AMD3100 a las mismas dosis. Una hora después, los ratones se sacrificaron y el número de células progenitoras por mL de sangre fue determinado. Estos datos se resumen en la Figura 1.

- 20 AMD3100 actúa en un aditivo para una forma de aditivo mayor para la movilización de células progenitoras cuando se utiliza en combinación con una proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α de ratón (*mu*), cada uno proporcionada 11 horas después de la adición de rhu G-CSF o diluyente control (solución salina) y 1 hora antes de la evaluación de la sangre.

Ejemplo 3

Elevación Clínica de los Niveles de Células Progenitoras

5 Cinco voluntarios sanos humanos que tienen recuentos de glóbulos blancos iniciales de 4,500-7,500 células/mm³ se utilizaron en el estudio. A cada paciente se le proporcionó una inyección subcutánea (s.c.) única de 80 µg/kg de AMD3100 (i.e., 1,1'-[1,4-fenileno-bis (metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazacicotetradecano) en 0.9% de solución salina, a partir de una solución stock de 10 mg/mL de AMD3100 en solución salina, bajo condiciones estériles. Las muestras de sangre fueron obtenidas vía catéter antes de la dosis, y varias veces hasta 24 horas después de la dosificación.

10 Las muestras de sangre fueron evaluadas para las glóbulos blancos totales, las células progenitoras positivas CD34 (vía análisis FACS) como un porcentaje de glóbulos blancos totales, así como los números absolutos por mL y estado de ciclación de células progenitoras de macrófago granulocito (CFU-GM), eritroide (BFU-E), y multipotencial (CFU-GEMM).

Como se muestra en las Tablas 3 y 4, la administración de AMD3100 causó una elevación del recuento de glóbulos blancos y de las células progenitoras positivas CD34 en los voluntarios humanos, la cual se maximiza 6 horas después de la administración.

15 Tabla 3

Movilización inducida por AMD3100 de los glóbulos blancos en voluntarios individuales (x 10 ³ WBC's).									
ID	Filtro	Línea Base	TRATAMIENTO						
			30 Min	1 Hr	2 Hr	4 Hr	6 Hr	9 Hr	2 Días
P1	7.4	6.41	8.02	14.8	21.4	23.2	26.2	22.3	7.07
P2	6.04	5.45	6.53	8.93	13.5	18.00	19.2	19.6	8.03
P3	4.38	5.8	7.14	9.28	ND	18.10	17.9	18.4	4.98
P4	5.08	5.31	4.37	7.38	12.4	14.6	15.8	13.9	4.98
P5	4.53	5.02	6.08	8.43	ND	16.90	19.3	19.00	4.57

Tabla 4

Movilización inducida por AMD3100 de células positivas CD34, expresada como el porcentaje del WBC's total en voluntarios individuales.						
ID	Línea Base	TRATAMIENTO				
		1 Hr	3 Hr	6 Hr	9Hr	2 Día
P1	.07	.04	.07	.11	.11	.08
P2	.08	.06	.08	.13	.11	.12
P3	.07	.16	.06	ND	.11	.07
P4	.05	.07	.09	.09	.1	.1
P5	.12	.12	.13	.2	.2	.16

La sangre también se analizó para AMD3100 movilizado de estas progenitoras.

5 Los números absolutos de células nucleadas sin separar y de baja densidad (Fico-hypaque separadas) por ml de sangre, así como los números absolutos por ml y el estado de ciclación de las células progenitoras del macrófago granulocito (CFU-GM), eritroide (BFU-E), y multipotencial (CFU-GEMM) fueron determinados en donantes normales inyectados s.c. con AMD3100. Los parámetros anteriores fueron evaluados antes de la inyección y a 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la inyección de AMD3100. Todos los resultados de las células progenitoras se basan en la valoración de 3 placas del cultivo por ensayo por punto.

10 Para los números de células progenitoras y el estado de ciclación, los números de CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM en cultivos de metilcelulosa por estimulación de las células con 1 Unidad (U)/ml de eritropoyetina recombinante humana (rhu), 100 U/ml de rhu del factor estimulante de colonias macrófagos-granulocitos (GM-CSF), 100 U/ml de rhu de interleucina-3 (IL-3) y 50 ng/ml de rhu de factor steel (SLF = factor de célula madre (SCF)). Las CFU-GM también fueron evaluadas en cultivos de agar estimuladas con 100 U/ml de rhu de GM-CSF y 50 ng/ml de rhu de SLF. Para ambos tipos de ensayos, las colonias fueron valoradas después de 14 días de incubación en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y tensión de O₂ baja (5%). El estado de ciclación de la célula de las progenitoras fue determinado utilizando una técnica de matar de timidina tritiada de alta actividad específica como se describe previamente (Broxmeyer, H. E., et al., Exp. Hematol. (1989) 17:455-459).

15 Los resultados se proporcionan en primer lugar, como la media de las veces de cambio en números absolutos de las células nucleadas y progenitoras a 1, 3, 6, 9 y 24 horas en comparación con la preinyección (=Tiempo (T) 0) recuentos para los cinco donantes, como se ve en las Tablas 5-7.

En las tablas a continuación,

20 STD - Desviación estándar

STE - Error estándar

PBL-US - sangre periférica-sin separar

PBL-LD - sangre periférica-densidad baja (Ficoll Separated) P - Significancia utilizando un test t de 2 colas

Tabla 5

Veces de Cambio en Comparación con el TIEMPO =0 (Media de 5 donantes)										
	CELULARIDAD NUCLEADA									
	PBL-US					PBL-LD				
	MEDIA	STD	STE	%CHG	P	MEDIA	STD	STE	%CHUG	P
T=0	1.00	0.00	0.00	0.0%		1.00	0.00	0.00	0.0%	
T=1	1.69	0.00	0.00	68.6%	0.017	1.86	0.00	0.00	86.2%	0.000
T=3	2.80	0.51	0.23	180.2%	0.000	2.86	0.28	0.12	185.6%	0.000
T=6	3.26	0.61	0.27	225.8%	0.000	3.66	0.43	0.19	266.3%	0.001
T=9	3.09	0.89	0.31	209.4%	0.000	3.64	1.18	0.53	264.3%	0.001
T=24	1.07	0.85	0.29	7.0%	0.553	1.05	1.19	0.53	4.6%	0.815

25

Tabla 6

	CULTIVO DE METILCELULOSA														
	CFU-GM					BFU-E					CFU-GEMM				
	MEDIA	STD	STE	%CHG	P	MEDIA	STD	STE	%CHG	P	MEDIA	STD	STE	%CHG	P
T=0	1.00	0.00	0.00	0.0%		1.00	0.00	0.00	0.0%		1.00	0.00	0.00	0.0%	
T=1	4.77	0.00	0.00	376.7%	0.001	1.99	0.00	0.00	98.9%	0.002	2.32	0.00	0.00	131.8%	0.000
T=3	13.66	1.56	0.70	1266.5 %	0.001	3.21	0.50	0.22	221.3%	0.004	433	0.44	0.20	332.5%	0.000
T=6	21.71	5.78	2.58	2070.6 %	0.000	8.01	1.25	0.56	500.5%	0.008	10.07	0.59	0.27	907.2%	0.002
T=9	10.47	5.09	228	947.3%	0.000	4.34	2.99	1.34	334.4%	0.000	5.25	4.54	2.03	425.4%	0.014
T=24	1.58	3.01	1.34	65.5%	0.005	1.26	1.02	0.45	26.3%	0.194	1.53	3.04	1.36	53.2%	0.199

Tabla 7

	CULTIVO DE AGAR CFU-GM				
	MEDIA	STD	STE	%CHG	P
T=0	1.00	0.00	0.00	0.0%	
T=1	2.81	0.00	0.00	180.8%	0.001
T=3	8.54	0.75	0.34	754.1%	0.000
T=6	17.93	1.62	0.72	1692.8%	0.000
T=9	10.25	4.57	2.04	924.9%	0.000
T=24	2.08	2.06	1.03	108.3%	0.073

Los resultados luego se muestran como las veces de cambio de niveles de T=0 para cada donante individual, Como se muestra en las Tablas 8-10.

5

Tabla 8

	VECES DE CAMBIO EN COMPARACIÓN CON EL TIEMPO=0 para cada paciente individual (P)									
	CELULARIDAD NUCLEADA									
	PBL-US					PBL-LD				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
T=0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T=1	2.54	138	1.38	1.36	1.78	2.07	1.99	1.48	1.66	2.10
T=3	3.55	2.74	2.02	2.48	3.23	2.83	3.25	2.17	2.82	3.20
T=6	3.97	2.94	2.74	2.60	4.04	4.07	3.90	227	2.78	5.30
T=9	3.27	330	2.69	2.24	3.96	3.65	4.43	2.47	2.48	5.17
T=24	1.21	1.43	0.96	0.77	0.99	1.01	1.71	0.79	0.60	1.12

Tabla 9

	PROGENITORAS														
	CULTIVO DE METILCELULOSA														
	CFU-GM					BFU-E					CFU-GEMM				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
T=0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T=1	5.09	5.33	3.70	6.87	2.84	2.58	1.48	2.30	1.46	2.13	2D7	2.26	2.22	1.96	3.07
T=3	7.12	17.02	15.07	20.72	8.40	5.13	1.98	2.61	2.60	3.75	425	3.47	4.34	5.14	4.43
T=6	14.66	23.96	20.99	28.54	20.39	9.14	3.67	4.54	3.34	9.35	7.47	9.35	6.52	9.10	17.92
T=9	6.26	12.51	9.42	14.08	10.09	5.43	4.61	3.71	2.93	5.05	2.64	7.09	2.47	4.52	9.55
T=24	1.10	1.91	1.43	1.51	1.83	1.06	1.88	1.14	0.79	1.44	1.12	2.62	0.69	0.98	2.25

Tabla 10

	CULTIVO DE AGAR CFU-GM				
	P1	P2	P3	P4	P5
T=0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T=1	3.05	3.74	1.67	2.71	2.87
T=3	8.88	9.49	7.47	10.46	6.40
T=6	17.77	24.01	14.04	13.07	20.75
T=9		1028	7.72	10.22	12.78
T=24		3.69	1.13	1.30	2.20

- 5 La célula nucleada actual y los números de células progenitoras por ml de sangre y el estado de ciclación (= % progenitoras en fase de síntesis de ADN (S) del ciclo celular) de progenitoras para cada uno de los cinco donantes (#s P1, P2, P3, P4, y P5) se muestra en las Tablas 11 y 12.}

Tabla 11

	CFU-GM		BFU P1		CFU-GM M		CFU-GM		BFU P2		CFU-GM M	
	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras
T=0	247	6%	261	0%	127	6%	273	0%	410	2%	120	0%
T=1	1259	1%	674	0%	264	0%	1455	0%	608	3%	272	6%
T=3	1760	1%	1340	13%	540	7%	4646	2%	809	0%	418	0%
T=6	3624	0%	2388	0%	949	0%	6540	0%	1502	0%	1126	0%
T=9	1547	2%	1418	11%	335	0%	3416	0%	1886	0%	854	4%
T=24	271	0%	278	0%	142	0%	521	3%	768	2%	316	0%

	CFU-GM				BFU				CFU-GM M				BFU				CFU-GM M				
	P3				P4																
	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	del # de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	del # de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	del # de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	del # de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	del # de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	del # de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado ciclo Progenitoras	
T=0	281	0%	0%	351	0%	0%	140	0%	0%	138	0%	0%	480	0%	0%	101	0%	0%	138	0%	0%
T=1	1040	0%	0%	808	0%	0%	312	0%	0%	947	0%	0%	672	0%	0%	199	0%	0%	947	0%	0%
T=3	4233	1%	0%	915	0%	0%	610	0%	0%	2857	5%	9%	1195	9%	9%	519	0%	0%	2857	5%	9%
T=6	5895	0%	0%	1593	0%	0%	916	0%	0%	3936	0%	0%	1533	0%	0%	920	8%	8%	3936	0%	0%
T=9	2647	0%	0%	1302	0%	0%	347	0%	0%	1942	0%	0%	1348	0%	0%	457	0%	0%	1942	0%	0%
T=24	402	0%	0%	402	0%	0%	97	0%	0%	208	5%	3%	362	3%	3%	99	0%	0%	208	5%	3%

ES 2 380 009 T3

	CFU-GM		BFU		CFU-GM M	
	P5					
	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras	# absoluto de Progenitoras por 1.1L	Estado del ciclo de Progenitoras
T=0	169	0%	343	1%	55	0%
T=1	481	0%	730	0%	169	0%
T=3	1423	5%	1288	3%	244	0%
T=6	3454	0%	3208	1%	987	0%
T=9	1710	0%	1731	0%	526	0%
T=24	310	0%	495	0%	124	0%

5 Los resultados para los cinco donantes fueron muy consistentes con las veces máximas de incrementos en los niveles de células progenitoras en circulación vistos 6 horas después de la inyección de AMD3100 en los sujetos donantes humanos. Las progenitoras estuvieron en un estado lento o de no-ciclación antes de y 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la inyección de AMD3100.

Ejemplo 4

Células Madre de la Médula Espinal Movilizadas para la reparación del miocardio

10 Ratas adultas se anestesiaron y una toracotomía se realizó. La rama descendente de la arteria coronaria izquierda se liga y no se reperfusióna. Dentro de 4 a 6 horas después de la ligadura los animales se inyectan con la dilución límite de AMD-3100 o AMD-3100 más rhG-CSF. Las ratas control no se trataron con los reactivos. Los animales se monitorean a intervalos de una semana por ecocardiografía y MRI. El experimento se termina a 2, 6 a 12 semanas Después de la cirugía. En el día del sacrificio, las funciones hemodinámicas se analizaron para presión diastólica final del ventrículo izquierdo, presión desarrollada del ventrículo izquierdo y la velocidad de subida y caída de la presión del ventrículo izquierdo. El corazón luego se detiene en diástole y es perfundio vía la aorta abdominal para purgar la sangre residual de la red vascular del miocardio. Esto se sigue por la perfusión del corazón con 10% de formalina. Se hicieron varios cortes a lo largo del corazón fijo y estos se embebieron en parafina y secciones. Las secciones se tiñen y analizan por microscopio de luz para determinar el tamaño del infarto en los animales control y los tratados. Las secciones del tejido de los corazones tomadas de 2 semanas después de la cirugía se tiñen con anticuerpos específicos para proteínas inmaduras, que desarrollan miocitos y proteínas de vasos sanguíneos y se analizan mediante microscopía confocal. El análisis inmunohistoquímico involucra la identificación de los factores de transcripción y los marcadores de superficie expresados en las etapas tempranas del desarrollo de miocitos. Los resultados de este experimento mostrarán que cuando el reactivo AMD-3100 se administró dentro de las horas después de la inducción de isquemia cardíaca, junto con o sin rhG-CSF, este reactivo moviliza las células madre de la médula ósea rápidamente, y dará lugar a un bloqueo para la remodelación cardíaca y la formación de cicatrices y conducirá a la regeneración del miocardio muerto.

15

20

25

REIVINDICACIONES

- 1.** Un método para obtener células progenitoras y/o madres de un sujeto, método que comprende
- (a) la administración a dicho sujeto de una cantidad de un compuesto suficiente para movilizar dichas células progenitoras y/o madres en la sangre periférica de dicho sujeto, seguido por
- 5 (b) la recolección de dichas células progenitoras y/o madres, en donde dicho compuesto es el 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano o una sal farmacéuticamente aceptable o complejo metálico de este.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto es el 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 10 **3.** El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable del 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 4.** El método de la reivindicación 3, en donde el compuesto es una sal clorhidrato del 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 15 **5.** El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto es un complejo metálico del 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 6.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde las células progenitoras y/o madres se recolectan mediante aféresis.
- 7.** El método de cualquier reivindicación precedente, que además comprende la administración de una proteína inflamatoria de macrófagos con la sangre periférica o la médula ósea de dicho sujeto.
- 20 **8.** El método de cualquier reivindicación precedente, que además comprende la administración de G-CSF con la sangre periférica o la médula ósea de dicho sujeto.
- 9.** Un compuesto para utilizar en un método para tratar un déficit hematopoyético en un sujeto, en donde dicho método comprende
- 25 (a) la administración a dicho sujeto de una cantidad de un compuesto suficiente para movilizar las células progenitoras y/o madres en la sangre periférica de dicho sujeto,
- (b) la recolección de dichas células progenitoras y/o madres, y
- (c) el trasplante de dichas células progenitoras y/o madres a dicho sujeto, en donde dicho compuesto es el 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano o una sal farmacéuticamente aceptable o complejo metálico de este.
- 30 **10.** El compuesto para utilizar de la reivindicación 9, en donde el compuesto es el 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 11.** El compuesto para utilizar de la reivindicación 9, en donde el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 35 **12.** El compuesto para utilizar de la reivindicación 11, en donde el compuesto es una sal clorhidrato del 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 13.** El compuesto para utilizar de la reivindicación 9, en donde el compuesto es un complejo metálico del 1,1'-[1,4-fenileno-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 14.** El compuesto para utilizar de cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde dicho déficit hematopoyético es un resultado de la quimioterapia.

15. El compuesto para utilizar de cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde dicho déficit hematopoyético es un resultado de radioterapia.

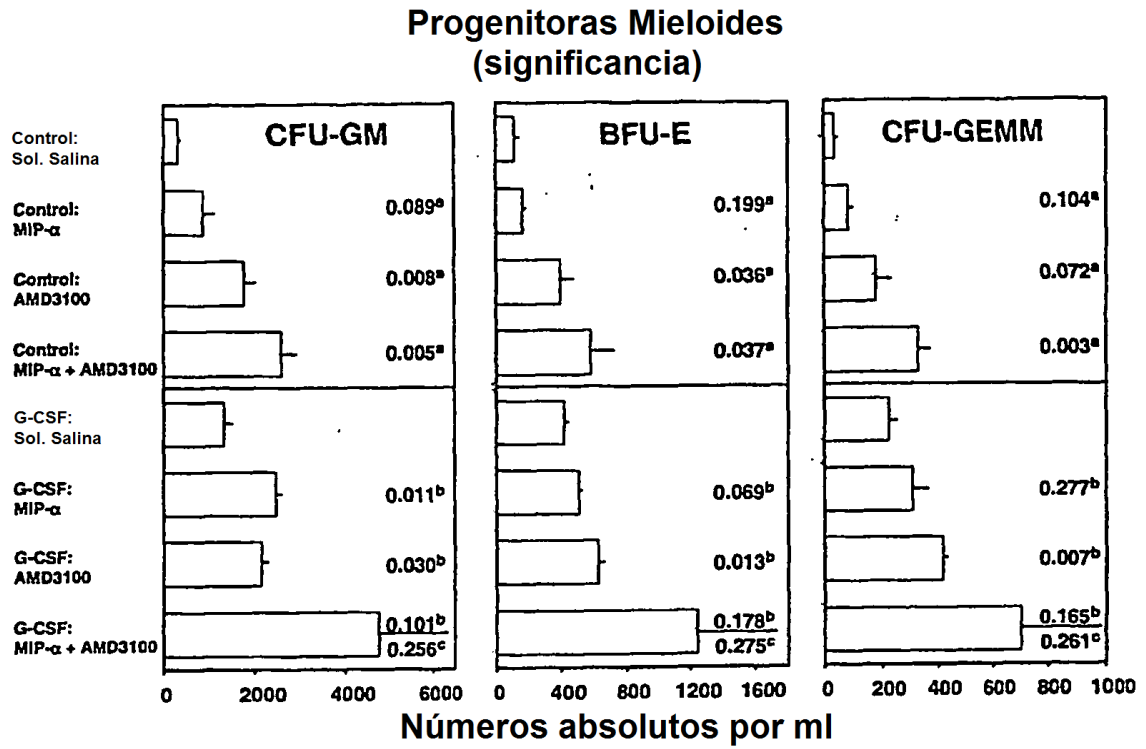
16. El compuesto para utilizar de cualquiera de las reivindicaciones 9-15, en donde las células progenitoras y/o madres se recolectan mediante aféresis.

5 **17.** El compuesto para utilizar de cualquiera de las reivindicaciones 9-16, en donde dicho método además comprende la administración de una proteína inflamatoria de macrófagos con la sangre periférica o la médula ósea de dicho sujeto.

18. El compuesto para utilizar de cualquiera de las reivindicaciones 9-17, en donde dicho método además comprende la administración de G-CSF con la sangre periférica o la médula ósea de dicho sujeto.

10

Figura 1.



a = valor P en comparación con Control/Salina
 b = valor P en comparación con G-CSF/Salina
 c = valor P en comparación con Control/MIP-1 α +AMD3100