

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 219**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61K 35/14** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2004** **E 11178173 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014** **EP 2441465**

54 Título: **Composiciones y métodos para un embarazo saludable**

30 Prioridad:

**24.10.2003 US 514472 P**

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

**30.04.2014**

73 Titular/es:

**NORA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**530 Lytton Avenue, 2nd Floor**  
**Palo Alto, CA 94301 , US**

72 Inventor/es:

**CARTER, DARRYL, L.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 458 219 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

Composiciones y métodos para un embarazo saludable

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para prevenir el aborto espontáneo durante la reproducción asistida.

**5 Antecedentes de la invención**

La concepción, el embarazo y el parto requieren una interacción complicada y delicada de la fisiología y la anatomía. La implantación y placentación del embrión son procesos complejos que implican cambios hormonales y anatómicos en la madre y la migración y división celular del embrión.

10 El aborto espontáneo tiene lugar en el 15 % de los embarazos diagnosticados en mujeres entre quince y cuarenta y cinco años de edad. Los abortos espontáneos recurrentes se definen como la pérdida de tres o más embarazos consecutivos y tienen lugar en aproximadamente 3-4 % de estas mujeres. El riesgo de pérdida del embarazo aumenta desde el 15-20 % en el primer embarazo hasta el 40 % después de un aborto espontáneo.

15 Aunque la mayor parte de los embarazos que se pierden en el primer trimestre son debidos a causas fetales; el aborto espontáneo, la pérdida del producto de la concepción antes de la semana 20 de embarazo, es un trastorno de etiología desconocida. Se ha teorizado sobre que los abortos espontáneos son el rechazo natural de un feto con anomalías incompatibles con la vida, sin embargo, esta teoría aún no ha sido confirmada.

20 Los factores de riesgo de aborto incluyen la edad, el peso y el estado de salud de la mujer. La prevalencia de aborto espontáneo aumenta con el aumento de la edad materna, aunque no con la gestación. El riesgo empieza a aumentar rápidamente a la edad de 35 años. El riesgo de aborto espontáneo a la edad de 40 años es aproximadamente el doble que a la edad de 20. Como las familias se planifican cada vez más tarde en la vida, la frecuencia de aborto espontáneo solamente aumentará sin métodos de prevención eficaces.

25 Acompañando el aumento de la edad de los padres aspirantes va el uso creciente de técnicas de reproducción asistida tales como la fertilización *in vitro*, transferencia de gametos a las trompas de Falopio (GIFT), y similares. Estas técnicas tienen sus propios riesgos asociados, especialmente para la mujer durante la hiperestimulación ovárica. Además, la reproducción asistida y la fertilización *in vitro* son caras, requieren mucho tiempo y tienen una alta tasa de fallos, produciéndose el embarazo solamente en aproximadamente el 25 % de los casos. (véase Merck Manual 17th edition, 1999, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey, p. 1995).

30 La amenaza de aborto generalmente se presenta como un dolor cólico y hemorragia cuyo tratamiento es el reposo en cama. Este tratamiento conservador proporciona cuidados paliativos para la madre pero modifica muy poco el pronóstico. El uso de hormonas generalmente está contraindicado debido al riesgo de anomalías congénitas, incluyendo la malformación de los vasos cardíacos del embrión y posibles anomalías genitales en la descendencia femenina.

35 La preeclampsia y otros trastornos hipertensivos de la gestación son una causa general importante de enfermedad y mortalidad maternal y de los recién nacidos. Los síntomas de preeclampsia incluyen hipertensión, edema y proteinuria con ganancia súbita de peso, cefaleas y visión borrosa. La preeclampsia puede impedir que llegue suficiente flujo sanguíneo a la placenta lo que puede causar un bajo peso de nacimiento y otros problemas para la criatura. Aunque la mayor parte de las mujeres con preeclampsia todavía tienen bebés sanos, algunas desarrollan eclampsia, una condición grave que amenaza la vida de la madre y del feto.

40 El riesgo de preeclampsia es más alto en las mujeres con embarazos múltiples, en las madres adolescentes y en las mujeres mayores de 40 años. Típicamente, la preeclampsia tiene lugar al final del segundo o tercer trimestre (mitad a final de la gestación) aunque ocasionalmente aparece más pronto. La preeclampsia afecta aproximadamente al 5% de todos los embarazos.

45 La preeclampsia leve se trata de forma conservadora con estricto reposo en cama con revisiones continuas de la tensión arterial. El progreso del trastorno se trata con fluidos, antihipertensivos y sulfato de magnesio pero el único remedio es el parto del feto.

En adición a la carga física de estos trastornos, la pérdida de un embarazo deseado supone una tremenda carga emocional para los padres aspirantes y expectantes. La pérdida de un embarazo puede llevar a sentimientos de incompetencia, desesperanza y culpabilidad que pueden tener un efecto devastador sobre los individuos y sobre una pareja.

50 Se necesitan siempre nuevos métodos y composiciones para reducir los riesgos para la salud de la madre y del feto asociados con el embarazo. La prevención eficaz del aborto espontáneo puede permitir a las mujeres, especialmente a las mujeres en riesgo, tener embarazos con éxito, y el tratamiento o prevención eficaces de la preeclampsia puede reducir o eliminar uno de los riesgos para la salud más comunes del embarazo. La prevención del fracaso de la implantación durante la reproducción asistida, puede llevar a embarazos logrados, reducir los

riesgos para la mujer y ahorrar tiempo y dinero. La prevención del parto prematuro aumentará la probabilidad de nacimientos normales.

### Sumario de la invención

5 Para reducir la frecuencia de aborto espontáneo recurrente, la presente invención se refiere a composiciones y kits que comprenden un factor estimulante de las colonias de granulocitos (GCSF o G-CSF) en una cantidad eficaz para prevenir el aborto espontáneo. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el GCSF puede reducir o eliminar las aberraciones mediadas por el sistema inmunitario que se asocian con el aborto espontáneo o con el fracaso de la implantación. Basándose en este descubrimiento, también se describen aquí métodos para utilizar las células madres de la sangre periférica movilizadas por GCSF para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación, y métodos que utilizan el GCSF para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona el G-CSF para uso en la reducción del riesgo de aborto espontáneo en un sujeto femenino según la reivindicación 1. El G-CSF se puede administrar a cualquier sujeto femenino en riesgo de aborto espontáneo. Las pacientes en riesgo se pueden identificar según los métodos descritos aquí o según métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Como se indica en la reivindicación 1, la paciente está en las primeras 20 semanas de gestación. En ciertas realizaciones, la paciente está en el primero o segundo mes de embarazo.

20 Para prevenir o reducir el riesgo de aborto espontáneo, se puede administrar a la paciente una cantidad profilácticamente eficaz de GCSF. El GCSF se puede administrar por cualquier modo de administración conocido por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el GCSF se administra subcutáneamente. La dosis de GCSF puede ser determinada por un facultativo experto en la técnica como se describe en detalle más adelante. Se puede continuar la dosis tanto como sea necesario para prevenir el aborto espontáneo según el criterio del facultativo experto en la técnica. En ciertas realizaciones, se administra la dosis durante todo el primer trimestre de embarazo. En otras realizaciones, se administra la dosis durante cuatro, tres, dos o una semanas. En realizaciones particulares, se administra la dosis durante cinco, cuatro, tres, dos o un día.

25 Se describe aquí un método para prevenir el aborto espontáneo administrando a una paciente células madre de sangre periférica movilizadas. En este método, se administra el GCSF a una primera paciente. Preferiblemente, la paciente no está embarazada. Se puede administrar el GCSF opcionalmente junto con terapia quimioterapéutica o inmunodepresora. Después de la administración de GCSF, se recogen los granulocitos de la paciente. Estos granulocitos se conservan opcionalmente, típicamente por criopreservación, para administración posterior. Preferiblemente, los granulocitos comprenden células madre de sangre periférica, y en particular, células madre CD34+ de sangre periférica.

35 Las células madre, que pueden ser histocompatibles, se pueden administrar a una paciente embarazada. La administración puede ser autóloga, esto es, la paciente receptora es la primera paciente donante de la que se recogieron las células mononucleares sanguíneas. Sin embargo, la administración también puede ser alogénica, esto es, la paciente receptora no es la primera paciente donante. Se administra a la paciente una cantidad de las células mononucleares sanguíneas eficaz para prevenir el aborto espontáneo según métodos conocidos por el facultativo experto en la técnica.

40 Se describen aquí métodos para prevenir el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida. Los métodos se pueden administrar a cualquier paciente con riesgo de fracaso de la implantación. Las pacientes con riesgo se pueden identificar según los métodos descritos aquí o según los métodos conocidos por el facultativo experto en la técnica. La reproducción asistida puede consistir en fertilización *in vitro* y transferencia de un embrión.

45 Con el fin de evitar el fracaso de la implantación, se administra a la paciente una cantidad profilácticamente eficaz de GCSF. El GCSF se puede administrar por cualquier modo de administración conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el GCSF se administra subcutáneamente. La dosis de GCSF puede ser determinada por un facultativo experto en la técnica como se describe en detalle más adelante. Se puede administrar diariamente a la paciente una dosis de 10 mcg/kg hasta 500 mg. Se puede continuar la administración tanto como sea necesario para prevenir el fracaso de la implantación según el criterio del facultativo experto en la técnica. Se puede administrar la dosis durante todo el primer trimestre de embarazo. Se puede administrar la dosis durante cuatro, tres, dos o una semanas. Se puede administrar la dosis durante cinco, cuatro, tres, dos o un día.

55 Se describen aquí métodos para prevenir el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida administrando a una paciente células madre de sangre periférica movilizadas por GCSF, que pueden ser histocompatibles, como se ha descrito antes y se describe en detalle más adelante. En este método, las células madre sanguíneas se administran a una mujer que está sometida a la reproducción asistida. La administración puede ser autóloga, esto es, la paciente receptora es la misma que la primera paciente donante de la que se recogieron las células mononucleares sanguíneas. Sin embargo, la administración también puede ser alogénica, esto es, la paciente receptora no es la primera paciente donante. Se administra a la paciente una cantidad de las

células madre sanguíneas eficaz para prevenir el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida, según métodos conocidos por los facultativos expertos en la técnica.

El GCSF se puede administrar a una paciente sometida a la reproducción asistida antes o durante la estimulación ovárica para mejorar la calidad, la viabilidad y/o el número de oocitos disponibles para recuperación.

5 Se describen aquí métodos para tratar o prevenir la preeclampsia y el parto prematuro administrando a una paciente que lo necesite una cantidad eficaz de GCSF. Se pueden administrar los métodos a cualquier paciente en riesgo de preeclampsia o de parto prematuro. Las pacientes en riesgo se pueden identificar según los métodos descritos aquí o según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, la paciente está en el segundo o tercer trimestre de embarazo.

10 Para tratar o prevenir la preeclampsia y el parto prematuro, se administra a la paciente una cantidad eficaz de GCSF. El GCSF se puede administrar por cualquier modo de administración conocido por los expertos en la técnica. El GCSF se puede administrar subcutáneamente. El GCSF se puede formular en cualquier preparación conocida por los expertos en la técnica según el modo de administración. La dosis de GCSF puede ser determinada por un facultativo experto en la técnica como se describe en detalle más adelante. Se puede administrar diariamente a la paciente una dosis desde 10 µg/kg hasta 500 mg. Se puede continuar la dosis tanto como sea necesario para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro según el criterio del facultativo experto en la técnica. Se puede administrar la dosis hasta el final del embarazo. Se puede administrar la dosis durante cuatro, tres, dos o una semanas. Se puede administrar la dosis durante cinco, cuatro, tres, dos o un día.

20 Como se ha descrito antes y se describe en detalle en las secciones que siguen, los métodos, kits y composiciones descritos aquí tienen utilidad para prevenir el aborto espontáneo, el fracaso de la implantación y para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro.

#### **Descripción detallada de la invención**

Como se usan aquí, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

25 Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" como se usan aquí, se refieren a un método para aliviar o eliminar un trastorno y/o sus síntomas asociados. Los términos "prevenir" o "prevención", como se usan aquí, se refieren a un método para evitar que un paciente adquiera un trastorno y/o sus síntomas asociados. En ciertas realizaciones, los términos "prevenir" o "prevención" se refieren a un método para reducir el riesgo de adquirir un trastorno y/o sus síntomas asociados.

30 El término "aborto espontáneo" se refiere al parto o la pérdida del producto de la concepción antes de la semana 20 de embarazo. El término aborto espontáneo incluye pero no está limitado a la interrupción del embarazo, la amenaza de aborto, el aborto espontáneo inevitable, el aborto espontáneo incompleto, el aborto espontáneo habitual o recurrente o el aborto retenido.

El término "interrupción del embarazo" es sinónimo de aborto espontáneo.

35 El término "amenaza de aborto espontáneo" se refiere a cualquier hemorragia o dolor cólico del útero en las primeras 20 semanas de gestación.

El término "aborto espontáneo inevitable" se refiere a hemorragia o ruptura de las membranas acompañada de dolor y dilatación del cuello del útero.

El término "aborto espontáneo incompleto" se refiere a la expulsión de parte de los productos de la concepción o ruptura de las membranas.

40 El término "aborto espontáneo habitual" o "aborto espontáneo recurrente" se refiere a tres o más abortos espontáneos consecutivos.

El término "aborto retenido" se refiere a un retraso prolongado en la expulsión de un feto muerto.

45 El término "reproducción asistida" se refiere a técnicas clínicas y de laboratorio utilizadas para mejorar la fertilidad en los seres humanos y en los animales, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la fertilización *in vitro*, la transferencia de gametos a las trompas de Falopio (GIFT), la inseminación artificial y similares.

50 El término "fertilización *in vitro*" se refiere al procedimiento que implica la hiperestimulación ovárica, la recogida de oocitos de la futura madre o de una donante, la fertilización fuera del cuerpo de la paciente, el cultivo del embrión y la transferencia del embrión. Como se usa aquí, la transferencia del embrión se refiere al procedimiento que implica la transferencia al útero de una paciente, de los embriones o pre-embriones en desarrollo o escindidos, denominados también embriones de preimplantación.

El término "fracaso de la implantación" se refiere al fallo de un embrión producido por reproducción asistida para implantar en el útero de una paciente receptora.

El término "preeclampsia" se refiere al desarrollo de hipertensión con albuminuria o edema entre la semana 20 de embarazo y el final de la primera semana postparto. Cualquier paciente embarazada que desarrolla una tensión arterial de 140/90 mm de Hg, edema del rostro o manos o albuminuria de  $\geq 1+$  o cuya tensión arterial sube 30 mm de Hg la sistólica o 15 mm de Hg la diastólica (incluso si es inferior a 140/90 mm Hg) se considera preeclámpsica.

- 5 El término "factor estimulante de colonias" o "CSF" se refiere a un factor de crecimiento que promueve y contribuye a la madurez de las células, tales como, las células hematopoyéticas y sanguíneas. Los ejemplos de moléculas de CSF incluyen, pero sin limitarse a ellos, eritropoyetina, GCSF, GMCSF, CSF de macrófagos, interleucina (IL)-3, IL-6 y factores de células madre.

- 10 El término "factor estimulante de colonias de granulocitos" o "G-CSF" se refiere a compuestos o factores que estimulan la proliferación, diferenciación, compromiso y la activación funcional celular final de los granulocitos en un animal, incluyendo un sujeto humano. El G-CSF incluye derivados, miméticos, variantes y compuestos modificados químicamente o híbridos de los mismos descritos en las patentes de Estados Unidos números 5.399.345; 5.416.195; 5.981.551; 6.166.183 y 6.261.550. El G-CSF está comercialmente disponible con los nombres de filgrastim, (Neupogen®, Amgen y Granocyte®, Merck), pegfilgrastim (Neulasta® Amgen) y lenograstim (Neutrogrin®, Chugai).

- 15 El término "granulocitos" se refiere a células sanguíneas que contienen gránulos, especialmente a los leucocitos (glóbulos blancos o corpúsculos) que contienen gránulos neutrófilos, basófilos o eosinófilos en su citoplasma.

- 20 El término "factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos" o "GMCSF" se refiere a compuestos o factores que estimulan la proliferación, diferenciación, compromiso y la activación funcional celular final de monocitos y granulocitos en un animal, incluyendo un sujeto humano. El GM-CSF incluye derivados, miméticos, variantes y compuestos modificados químicamente o híbridos de los mismos descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 5.895.646; 5.891.429 y 5.908.763. El GM-CSF está comercialmente disponible con los nombres de fábrica Leukine®, Berlex y Leucomax®, Wyeth.

El término "macrófago" se refiere a una célula fagocítica, mononuclear, que puede salir de la circulación y entrar en espacios tisulares.

- 25 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un agente activo que se administra de forma suficiente para prevenir el desarrollo o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o trastorno a ser tratado.

- 30 El término "parto precoz" conocido también como parto prematuro, se refiere al comienzo de las contracciones regulares que hacen que empiece la dilatación y el borramiento del cuello uterino antes de la semana 37 de embarazo.

El término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un agente activo que se administra de forma suficiente para prevenir el trastorno o prevenir uno o más de los síntomas del trastorno a ser tratado. En ciertas realizaciones, el término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un agente activo que se administra de forma suficiente para reducir el riesgo del trastorno o uno o más de los síntomas del trastorno.

- 35 El término "sujeto o paciente" se refiere a animales tales como los mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, primates (tales como los seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En las realizaciones preferidas, el paciente es una mujer.

El término "etiqueta" se refiere a una presentación en forma impresa o gráfica sobre el envase inmediato de un artículo, por ejemplo el material escrito presentado sobre un vial que contiene un agente farmacéuticamente activo.

- 40 El término "etiquetado" se refiere a todas las etiquetas y otros materiales escritos, impresos o gráficos sobre cualquier artículo o sobre cualquiera de sus envases o envolturas o que acompañan a dicho artículo, por ejemplo, un prospecto o vídeos de instrucciones o dispositivos de almacenamiento de datos de ordenador, tales como CDs y DVDs, que acompañan o que se asocian con un envase de un agente farmacéuticamente activo.

- 45 Se describen aquí métodos para prevenir el aborto espontáneo y el fracaso de la implantación y métodos para tratar o prevenir la preeclampsia descrita en detalle más adelante.

Se describen aquí métodos para prevenir el aborto espontáneo administrando a una paciente que lo necesite una cantidad profilácticamente eficaz de un GCSF.

- 50 Sin pretender restringirse a ninguna teoría de operación particular, se cree que el aborto espontáneo y el aborto espontáneo recurrente son causados o están asociados con respuestas inmunitarias inapropiadas en una paciente embarazada. En particular, se cree que las pacientes en riesgo de aborto espontáneo y aborto espontáneo recurrente presentan citocinas inmunes inapropiadas asociadas con una respuesta inmune de células T-ayudadoras 1 (Th1) conocida por los expertos en la técnica. (Véase, Kwak-Kim *et al.*, 2003, Hum. Reprod. 18(4): 676-773). En contraste, las pacientes que tienen embarazos saludables típicamente presentan citocinas inmunes asociadas con una respuesta inmune de células T-ayudadoras 2 (Th2). Se cree que la administración de GCSF puede reducir la

respuesta Th1 inapropiada y/o aumentar una respuesta inmune de células T-ayudadoras 2 (Th2) en una paciente. Esta invención se basa por tanto, en parte, sobre el descubrimiento de que la administración de GCSF puede aumentar la respuesta inmune de una paciente hacia una respuesta Th2 saludable durante el embarazo y de este modo reducir o eliminar el riesgo de aborto espontáneo.

5 El sujeto puede ser cualquier sujeto mamífero con riesgo de un aborto espontáneo y es una mujer. En ciertas realizaciones, la paciente ha tenido previamente uno o más abortos espontáneos. En otras realizaciones, la paciente ha tenido previamente dos o más abortos espontáneos. En otras realizaciones, la paciente ha tenido previamente abortos espontáneos recurrentes, esto es, tres o más abortos espontáneos.

10 En otras realizaciones, el sujeto puede ser cualquier paciente de una población en riesgo de aborto espontáneo. Por ejemplo, la paciente puede ser una mujer de un grupo de edad con riesgo de aborto espontáneo. En realizaciones particulares, la paciente puede ser una mujer mayor de 35 años, mayor de 40 años o mayor de 45 años. En otras realizaciones particulares, la paciente puede ser una mujer menor de 20 años o menor de 15 años. Sin embargo, esencialmente una mujer de cualquier edad que presente un trastorno reproductivo, tal como aborto espontáneo, preeclampsia y parto prematuro, es un candidato para obtener los materiales y métodos de la presente invención.

15 En otras realizaciones, la paciente puede ser también de cualquier otra población en riesgo de aborto espontáneo determinada por un facultativo experto en la técnica. En ciertas realizaciones, la paciente tiene amenaza de aborto. En otras realizaciones, la paciente es obesa, con obesidad mórbida, tiene poca salud general o condiciones asociadas con la morbilidad que indican un riesgo de aborto espontáneo según los facultativos expertos. En ciertas realizaciones, estas condiciones pueden ser, cuello uterino insuficiente, anomalías uterinas, hipotiroidismo, diabetes mellitus, nefritis crónica, infección aguda, uso de drogas ilícitas (tales como cocaína o crack), problemas inmunológicos, shock emocional grave e infección vírica (especialmente citomegalovirus, herpes virus y rubeola) (véase Merck Manual 17th edition, 1999, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey, p. 2053).  
 20 En ciertas realizaciones, la paciente había tenido un fracaso de la implantación durante un procedimiento previo de reproducción asistida. Otras pacientes de riesgo incluyen aquellas con respuestas inmunes Th1 inusualmente altas o con respuestas inmunes Th2 inusualmente bajas. En otras realizaciones, la paciente puede ser también de cualquier otra población en riesgo de aborto espontáneo determinado por un facultativo experto en la técnica.

El GCSF se administra durante las primeras 20 semanas de embarazo.

El GCSF puede ser cualquier GCSF conocido por los expertos en la técnica que sea eficaz para modular el sistema inmunitario de la paciente. Por lo tanto, se pueden realizar una serie de modificaciones a las moléculas de GCSF de tipo natural siempre que se mantenga la actividad moduladora conocida del sistema inmunitario por parte del GCSF.  
 30 Hay una serie de ensayos que se pueden usar para asegurar que cualquier GCSF modificado retiene la actividad moduladora del sistema inmunitario deseada. El GCSF se puede formular según cualquier formulación para administración conocida por los expertos en la técnica. Se pueden administrar moléculas de GCSF de tipo plural en la práctica de la presente invención. Se pueden administrar las moléculas de GCSF plurales consecutivamente o secuencialmente. En las realizaciones preferidas, las formulaciones de GCSF son las comercialmente disponibles de filgrastim (Neupogen® Amgen), pegfilgrastim (Neulasta®, Amgen) o lenograstim (Neutrogrin®, Chugai). Otras moléculas y formulaciones de GCSF eficaces se describen en detalle en las secciones que siguen.

La formulación de GCSF se administra en una cantidad profilácticamente eficaz, esto es, una cantidad eficaz para reducir o eliminar el riesgo de aborto espontáneo en la paciente. La cantidad puede ser determinada por el facultativo experto guiado por la descripción de esta memoria y el conocimiento de la técnica. En las realizaciones preferidas, la cantidad puede ser cualquier cantidad de GCSF que reduzca la respuesta Th1 de la paciente. En otras realizaciones, la cantidad puede ser cualquier cantidad suficiente para aumentar o iniciar una respuesta Th2 en la paciente. Los ensayos para determinar las respuestas Th1 y Th2 en la paciente son bien conocidos por los expertos en la técnica (Véase Schust and Hill, 1996, J. Soc. Gynecol. Investig 3:259-61, Xing *et al.*, 2001, Chin. Med. J. 114:921-4, Raghupathy *et al.*, 1999, Cell Immunol. 196:122-30, Mauri *et al.*, 1996, J. Immunol. 26:1511-8, Doncorli *et al.*, 1997, Eur. J. Imm. 27:1451-8, Raziuddin, 1998, J. Rheumatol. 25:329-33, Moverare *et al.*, 2000, Allergy 55: 171-5). Se administran a la paciente 1 a 100 mcg/kg, de G-CSF.

Se puede administrar la dosis a la paciente diariamente hasta que el riesgo de aborto espontáneo se reduzca o se elimine y siempre que no se presenten síntomas de toxicidad. En otras realizaciones, se administra la dosis diariamente hasta la semana 20 de embarazo. En realizaciones particulares, se administra la dosis diariamente durante cuatro, tres, dos o una semana durante el primero o segundo trimestre de embarazo. En realizaciones particulares, se administra la dosis durante cinco días consecutivos durante el primero o segundo trimestre de embarazo. Por ejemplo, los cinco días consecutivos pueden ser de la primera o de la segunda semana de embarazo.

55 Se puede administrar el GCSF según cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica. Los métodos preferidos de administración incluyen la administración subcutánea. Otros modos eficaces de administración se describen en detalle en las secciones que siguen.

Se describen aquí métodos para prevenir el aborto espontáneo administrando a una paciente que lo necesite una cantidad eficaz de células madre de sangre periférica movilizadas por el factor estimulante de colonias.

Sin pretender restringirse a ninguna teoría de operación particular, como se ha expuesto antes, se cree que el aborto espontáneo es causado o está asociado con una respuesta inmunitaria Th1 inapropiada. Se cree que la administración de células madre de sangre periférica puede evitar el aborto espontáneo al reducir la respuesta inmunitaria Th1 inapropiada y/o al aumentar una respuesta inmunitaria Th2 en una paciente en riesgo de aborto espontáneo. Se ha observado que el GCSF puede movilizar las células madre de sangre periférica, y que estas células madre, cuando se administran a una paciente, pueden aumentar la respuesta inmunitaria de la paciente hacia una respuesta Th2. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos basados, en parte, en el descubrimiento de que las células madre movilizadas por el GCSF pueden evitar el aborto espontáneo.

La paciente puede ser cualquier mujer con riesgo de un aborto espontáneo como se describe en la sección anterior. En ciertas realizaciones, la paciente ha tenido previamente uno o más, dos o más, o tres o más abortos espontáneos. En ciertas realizaciones, la paciente tiene amenaza de aborto o ha tenido más de una amenaza de aborto. En otras realizaciones, la paciente puede ser una mujer mayor de 35 años, mayor de 40 años o mayor de 45 años. En otras realizaciones particulares, la paciente puede ser una mujer menor de 20 años o menor de 15 años. Sin embargo cualquier mujer de cualquier edad con una salud reproductiva imperfecta debida, por ejemplo, a abortos espontáneos, preeclampsia o parto prematuro puede obtener los beneficios de la presente invención. En otras realizaciones, la paciente es obesa, con obesidad mórbida, tiene poca salud general o condiciones comórbidas que indican un riesgo de aborto espontáneo según los facultativos expertos. En ciertas realizaciones, estas condiciones pueden ser cuello uterino insuficiente, anomalías uterinas, hipotiroidismo, diabetes mellitus, nefritis crónica, infección aguda, uso de drogas ilícitas (tales como cocaína o crack), problemas inmunológicos, shock emocional severo e infección vírica (especialmente citomegalovirus, herpes virus y rubeola) (véase Merck Manual 17th edición, Merck Research Laboratories, p. 2053). Otras pacientes de riesgo incluyen aquellas con respuestas inmunes Th1 inusualmente altas o con respuestas inmunes Th2 inusualmente bajas. En otras realizaciones, la paciente puede pertenecer también a cualquier otra población con riesgo de aborto espontáneo determinado por un facultativo experto en la técnica.

Como se describe aquí, el GCSF se puede administrar a una primera paciente para movilizar las células madre de la sangre periférica que se deben recoger para la administración a una paciente con riesgo de aborto espontáneo. Las células madre de sangre periférica, que pueden ser histocompatibles, pueden comprender células madre CD34+ de sangre periférica. Preferiblemente, la primera paciente es una mujer que no está embarazada. Los métodos pueden ser autólogos. En estos métodos, se recogen las células madre de sangre periférica de la primera paciente y se administran después a la misma primera paciente. Por ejemplo, se pueden recoger las células cuando la paciente no está embarazada, se conservan, y más tarde se administran a la misma paciente antes o después de un test positivo de embarazo. Los métodos pueden ser alogénicos. Se recogen las células madre de sangre periférica de una primera paciente y se administran a una segunda paciente.

El GCSF puede ser cualquier GCSF conocido por los expertos en la técnica que sea eficaz para movilizar las células madre de la sangre periférica. El G-CSF se puede formular según cualquier formulación para la administración conocida por los expertos en la técnica. La formulación de G-CSF puede estar comercialmente disponible (Neupogen® Amgen), pegfilgrastim (Neulasta® Amgen) o lenograstim (Neutrogrin®, Chugai), Otras moléculas y formulaciones de G-CSF eficaces se describen en detalle en las secciones que siguen.

La formulación de G-CSF se puede administrar en una cantidad eficaz para movilizar las células madre de la sangre periférica a recoger de la paciente. La cantidad puede ser determinada por los facultativos expertos guiados por la descripción de esta memoria y los conocimientos en la técnica. La cantidad puede ser cualquier cantidad de G-CSF que movilice las células madre de la sangre periférica. Se puede administrar a la paciente una dosis de 1 a 100 mcg (microgramos) /kg, 1 a 20 mcg/kg o aproximadamente 10 µg/kg.

Se puede administrar la dosis a la paciente diariamente durante cualquier período de tiempo necesario para movilizar las células madre de la sangre periférica conocido por los expertos en la técnica. Se puede administrar la dosis diariamente durante cuatro, tres, dos o una semana. Se puede administrar la dosis durante cinco días consecutivos. Se puede administrar la dosis diariamente durante cinco, cuatro, tres, dos o un día.

El G-CSF se puede administrar según cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica. Los métodos de administración preferidos incluyen la administración subcutánea. Otros modos eficaces de administración se describen en detalle en las secciones que siguen.

El G-CSF se puede administrar como una monoterapia. El G-CSF se puede administrar con al menos uno de otros compuestos activos. El G-CSF y al menos uno de otros compuestos activos se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente, continuamente o intermitentemente. Por ejemplo, el otro ingrediente activo se puede administrar según las dosis y programas conocidos por los expertos en la técnica mientras que el G-CSF se administra según los métodos descritos aquí. Dicho al menos uno de otros compuestos activos puede ser otro CSF. El otro compuesto activo puede ser un fármaco usado comúnmente para tratar los trastornos de interés. El otro compuesto activo puede ser un fármaco que es un inmunodepresor. En las realizaciones preferidas, dicho al menos uno de otros

ingredientes activos es un agente quimioterapéutico o inmunodepresor no mieloablativo. Por ejemplo, el otro ingrediente activo puede ser ciclofosfamida o un análogo de nucleósido de purina tal como cladribina y fludarabina. Los agentes quimioterapéuticos o inmunodepresores no mieloablativos preferidos se describen en detalle en las secciones que siguen. El otro agente activo podría ser otro agente inmunodepresor/antiinflamatorio conocido, tal como la vitamina D (o uno de sus análogos) o la aspirina. En adición, dicho al menos uno de otros ingredientes activos podría ser uno que sea usado habitualmente de forma amplia para el tratamiento del exceso de citocina Th1 en el embarazo, tal como la heparina, inmunoglobulina intravenosa (IVIG) o progesterona.

Después de que se haya administrado una dosis eficaz de G-CSF a la primera paciente, se recogen los granulocitos de la primera paciente según cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede recoger la sangre entera de la primera paciente por cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los granulocitos, incluyendo las células madre de la sangre periférica, se pueden aislar de la sangre entera por cualquier método conocido por los expertos en la técnica tal como la citoforesis o incluyendo, la leucoféresis (conocidas también como citaféresis y leucaféresis). (Véase, Guidelines for Therapeutic Hemapheresis, revisada en Mayo 1993, American Association of Blood Banks, Bethesda, MD). Preferiblemente, los granulocitos de estos métodos de la invención comprenden las células madre de sangre periférica, en particular, células madre CD34+ de sangre periférica. Los ensayos para las células CD34+ son conocidos por los expertos en la técnica. (véase por ejemplo, Link and Arseniev 1997, *Leuk. Lymphoma* 26:451-65, Vogel *et al.*, 2000, *Stem Cells* 18:87-92, Dreger *et al.*, 1994, *Br. J. Haematol.* 87:609-613; y Berenson *et al.*, 1996, *Cancer Invest.* 14:589-96)

Estos granulocitos se pueden conservar para una administración posterior a la primera paciente o a otra paciente. Aunque la crioconservación es el método principal de conservación de los granulocitos, se están desarrollando otros métodos para la conservación a largo plazo de las células sanguíneas y se pueden usar en los métodos de la invención. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.150.085, Papadimitrion *et al.*, 2000, *J. Clin. Apheresis* 15:236-24:236-241; Arpaci *et al.*, 2000, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 30:154-88). Las formulaciones y los métodos de conservación tales como la conservación criogénica son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los granulocitos recogidos se pueden formular opcionalmente para administración a una paciente antes de la conservación o después de la conservación.

En estos métodos, los granulocitos recogidos se administran a una paciente para prevenir el aborto espontáneo. Se pueden administrar las células a la paciente antes del embarazo. Por ejemplo, se pueden administrar las células a una paciente que esté planificando o intentando quedarse embarazada. Se pueden administrar las células a una paciente embarazada. Se pueden administrar las células en cualquier momento durante el primero o segundo trimestre de embarazo, por ejemplo, se administran las células durante las primeras 20 semanas de embarazo.

Se administran las células en una cantidad profilácticamente eficaz, una cantidad eficaz para reducir o eliminar el riesgo de aborto espontáneo en la paciente. La cantidad puede ser determinada por los facultativos expertos guiados por la descripción de esta memoria y los conocimientos de la técnica. La cantidad puede ser cualquier cantidad de células que reduzca la respuesta Th1 de la paciente. La cantidad puede ser cualquier cantidad suficiente para aumentar o iniciar una respuesta Th2 en la paciente. Los ensayos para determinar las respuestas Th1 y Th2 en la paciente son bien conocidos por los expertos en la técnica (Véase por ejemplo, Schust and Hill, 1996, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 3:259-61, Xing *et al.*, 2001, *Chin. Med. J.* 114:921-4, Raghupathy *et al.*, 1999, *Cell Immunol.* 196:122-30, Mauri *et al.*, 1996, *Eur. J. Immunol.* 26:1511-8, Doncarli *et al.*, 1997, *Eur. J. Immunol.* 27:1451-8, Raziuddin, 1998, *J. Rheumatol.* 25:329-33, Moverare *et al.*, 2000, *Allergy* 55:171-5). En realizaciones particulares, se administran a la paciente aproximadamente 250-750 ml del material recogido por leucaféresis o aproximadamente 5 a 15 x 10<sup>6</sup> células CD34+.

Se pueden administrar las células a la paciente diariamente hasta que el riesgo de aborto espontáneo se reduzca o se elimine y siempre que no se presenten síntomas de toxicidad. Se pueden administrar las células diariamente durante todo el segundo trimestre de embarazo. Por ejemplo, se administran las células diariamente hasta la semana 20 de embarazo. Se pueden administrar las células diariamente durante cuatro, tres, dos o una semanas durante el primero o segundo trimestre de embarazo.

Las células madre de la sangre periférica se pueden administrar según cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica tal como la administración intravenosa.

Se describen aquí métodos para prevenir el fracaso de la implantación del embrión durante la reproducción asistida mediante la administración a una paciente que lo necesite de una cantidad profilácticamente eficaz del factor estimulante de colonias de granulocitos.

La fertilización *in vitro* es un procedimiento asistido para resolver los problemas de fertilidad causados, por ejemplo, por enfermedad de las trompas, endometriosis, oligospermia, anticuerpos anti-esperma e infertilidad no explicada. El procedimiento puede incluir la hiperestimulación ovárica con "fármacos de fertilidad" tales como estimulantes ováricos como citrato de clomifeno y hormonas liberadoras de gonadotropina. La hiperestimulación de los ovarios puede inducir el crecimiento del óvulo (oocito) y de sus células encapsuladoras, denominadas también colectivamente los folículos ováricos. Después de suficiente crecimiento folicular, se induce la maduración folicular final y se recuperan o recogen los oocitos. Los oocitos se fertilizan *in vitro* con espermia y se cultivan los embriones.

Se transfiere entonces al útero un pequeño número de embriones, generalmente 2-4. A pesar de la transferencia de embriones múltiples, la tasa de embarazos a término es solamente de aproximadamente 25 % (véase Merck Manual 17th edition, 1999, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey, p. 1995).

5 Sin pretender restringirse a ninguna teoría de operación particular, se cree que el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida es causado o está asociado con respuestas inmunes inapropiadas en la receptora del embrión. En particular, se cree que las pacientes con riesgo de fracaso de la implantación del embrión presentan una sobreproducción de citocinas T-ayudadoras 1 (Th1) y una infraproducción de citocinas T-ayudadoras 2 (Th2). Se han demostrado correlaciones positivas entre los modelos humanos y animales (véase, Kwak-Kim *et al.*, 2003, Human Reproduction 18: 767-73, Krishna *et al.*, 1996, J. Immunol. 156:633-62) pero permanece la controversia (véase, Chaouat *et al.*, 2003, J. Reproductive Immunol. 59:205-17). La citocina Th1 asociada con la sobreproducción puede ser interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Las citocinas Th2 asociadas con la infraproducción pueden ser interleucinas 10 y 4 (IL-10 e IL-4).

15 En los métodos de prevención, el G-CSF se administra típicamente hasta que se alcance la implantación del embrión en la pared uterina, hasta que el riesgo de fracaso de la implantación se reduce o se elimina o según el criterio de un facultativo experto en la técnica.

20 Se puede continuar la administración hasta que se confirme el embarazo. La administración puede empezar aproximadamente al tiempo de la hiperestimulación ovárica y puede continuar hasta aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 14 días o aproximadamente 30 días después de la transferencia del embrión al útero de la paciente. La administración puede empezar aproximadamente al tiempo de la hiperestimulación ovárica y puede continuar hasta aproximadamente el final del primer trimestre. Se puede administrar la dosis durante cinco días consecutivos aproximadamente al tiempo de la transferencia del embrión al útero de la paciente. Se puede continuar la administración hasta que la paciente presente una respuesta inmune Th1 normal para una paciente embarazada o una respuesta inmune Th2 normal para una paciente embarazada, o ambas, según el criterio de un facultativo experto en la técnica.

25 Se puede administrar una cantidad profilácticamente eficaz de G-CSF a una paciente con riesgo de fracaso de la implantación del embrión. Una paciente con riesgo puede ser una paciente que ha fallado uno o más procedimientos de fertilización *in vitro*. La paciente puede pertenecer también a cualquier otra población con riesgo de fracaso de la implantación del embrión determinado por un facultativo experto en la técnica. La paciente ha fracasado previamente en la reproducción asistida. La paciente puede haber tenido uno o más abortos espontáneos previos. Otras pacientes con riesgo incluyen aquellas con respuestas inmunes Th1 inusualmente altas o respuestas inmunes Th2 inusualmente bajas.

30 La paciente puede pertenecer también a cualquier otra población con riesgo de fracaso de la implantación del embrión determinado por un facultativo experto en la técnica.

35 El G-CSF se puede administrar a la paciente antes de la transferencia del embrión. Por ejemplo, el G-CSF se puede administrar a una paciente que esté planificando o intentando quedarse embarazada mediante reproducción asistida. Por lo tanto, el G-CSF se puede administrar a la futura madre durante el procedimiento de superovulación o si los óvulos son donados, antes de la implantación de los embriones. El G-CSF se puede administrar a una paciente después de recuperar o recoger los oocitos. Los oocitos y los embriones recuperados se pueden mantener y cultivar en medio que contiene G-CSF antes de ser implantados en la futura madre. El G-CSF se puede administrar en cualquier momento durante la reproducción asistida o el procedimiento de fertilización *in vitro*.

40 El G-CSF puede ser cualquier G-CSF conocido por los expertos en la técnica que sea eficaz para modular el sistema inmunitario de la paciente. El G-CSF se puede formular según cualquier formulación para administración conocida por los expertos en la técnica. En las realizaciones preferidas, la formulación de G-CSF es la comercialmente disponible de filgrastim (Neupogen®, Amgen), pegfilgrastim (Neulasta®, Amgen) o lenograstim (Neurogrin®, Chugai). Otras moléculas y formulaciones de G-CSF eficaces se describen en detalle en las secciones que siguen.

45 La formulación de G-CSF se administra en una cantidad profilácticamente eficaz, esto es, una cantidad eficaz para reducir o eliminar el riesgo de fracaso de la implantación en la paciente. La cantidad puede ser determinada por un facultativo experto guiado por la descripción de esta memoria y los conocimientos de la técnica. En las realizaciones preferidas, la cantidad puede ser cualquier cantidad de G-CSF que reduzca la respuesta Th1 de la paciente. En otras realizaciones, la cantidad puede ser cualquier cantidad suficiente para aumentar o iniciar una respuesta Th2 en la paciente. En realizaciones particulares, se administran diariamente a la paciente 1 a 100 mcg/kg, de G-CSF.

50 El G-CSF se puede administrar según cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica. Los métodos de administración preferidos incluyen la administración subcutánea. Otros modos eficaces de administración se describen en detalle en las secciones que siguen.

55 Se describen aquí métodos para prevenir el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida administrando a una paciente las células madre de sangre periférica movilizadas por el G-CSF. En estos métodos se

5 administra el G-CSF a una primera paciente y las células madre de la sangre periférica, particularmente células madre CD34+ de sangre periférica se recogen de la primera paciente como se describe en esta memoria. La administración puede ser autóloga. Sin embargo, la administración también puede ser alogénica, esto es, la paciente receptora no es la misma que la primera paciente donante. Se administra a la paciente una cantidad de las células madre sanguíneas, que pueden ser histocompatibles, eficaz para prevenir el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida, según los métodos descritos anteriormente. Se describen aquí métodos para prevenir el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida administrando las células madre de sangre periférica movilizadas por G-CSF a una paciente antes de la hiperestimulación ovárica. Se describen aquí métodos para administrar a la paciente aproximadamente 250-750 ml del material recogido por leucaféresis o aproximadamente 5 a 15 x 10<sup>6</sup> células CD34. Se describe aquí la administración de las células madre de sangre periférica desde aproximadamente el tiempo de la hiperestimulación ovárica y se continúa hasta aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 14 días o aproximadamente 30 días después de la transferencia del embrión al útero de la paciente.

15 Se describen aquí métodos para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro administrando a una paciente que lo necesite una cantidad eficaz del factor estimulante de colonias de granulocitos.

20 Sin pretender restringirse a ninguna teoría de operación particular, se cree que la preeclampsia y el parto prematuro son causados o están asociados con respuestas inmunes inapropiadas en una paciente embarazada. En particular, se cree que las pacientes con riesgo de preeclampsia o parto prematuro presentan citocinas inmunes inapropiadas asociadas con una respuesta inmune T-ayudadora 1 (Th1) conocida por los expertos en la técnica. En contraste, las pacientes que tienen embarazos saludables presentan típicamente citocinas inmunes asociadas con una respuesta inmune T-ayudadora 2. Se cree que la administración de G-CSF puede reducir la respuesta Th1 inapropiada y/o puede aumentar la respuesta inmune Th2 en una paciente. Esta invención se basa por tanto, en parte, en el descubrimiento de que la administración de G-CSF puede aumentar la respuesta inmune de una paciente hacia una respuesta Th2 saludable durante el embarazo y por lo tanto tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro.

25 En los métodos de tratamiento, se administra el G-CSF a una paciente que presenta uno o más síntomas de preeclampsia o de parto prematuro. La paciente puede ser cualquier paciente que presente cualquiera de los síntomas de preeclampsia durante el embarazo tales como hipertensión, hinchazón o edema y proteínas excesivas en la orina. Por ejemplo la paciente puede ser cualquier paciente que desarrolle hipertensión con albuminuria o edema entre la semana 20 de gestación y el final de la primera semana postparto. Las pacientes particulares incluyen pacientes embarazadas que desarrollan una tensión arterial de 140/90 mm de Hg, edema del rostro o manos o albuminuria de  $\geq 1+$  o cuya tensión arterial sube 30 mm de Hg la sistólica o 15 mm de Hg la diastólica (incluso si es inferior a 140/190 mm de Hg) entre la semana 20 de embarazo y el final de la primera semana postparto. Las pacientes particularmente preferidas son las mujeres.

35 En los métodos de tratamiento, se administra el G-CSF típicamente hasta que los síntomas de preeclampsia o de parto prematuro se alivian o se reducen siempre que el beneficio terapéutico sea mayor que el riesgo de sucesos adversos según el criterio de un facultativo experto en la técnica. Se puede continuar la administración siempre que la paciente no presente efectos tóxicos de la administración según el criterio de un facultativo experto en la técnica. En ciertos métodos, se continúa el tratamiento hasta que la paciente presente una respuesta inmune Th1 normal para una paciente embarazada o una respuesta Th2 normal para una paciente embarazada, o ambas, según el criterio de un facultativo experto en la técnica.

40 En los métodos de prevención, se administra el G-CSF a una paciente con riesgo de desarrollo de preeclampsia o parto prematuro. La paciente puede ser cualquier sujeto mamífero en riesgo de preeclampsia o parto prematuro. Las pacientes en riesgo incluyen pacientes con embarazos múltiples, pacientes menores de 20 años y pacientes mayores de 40 años. Otras pacientes incluyen las embarazadas por primera vez (primigrávidas), pacientes con hipertensión preexistente y pacientes con enfermedades vasculares preexistentes. Otras pacientes en riesgo incluyen aquellas con respuestas inmunes Th1 inusualmente altas o con respuestas inmunes Th2 inusualmente bajas. La paciente puede ser una mujer.

45 En los métodos de prevención, se administra el G-CSF siempre que la paciente esté en riesgo de preeclampsia y siempre que el beneficio terapéutico sea mayor que el riesgo de sucesos adversos y también siempre que no se observe toxicidad según el criterio de un facultativo experto en la técnica. Se puede administrar el G-CSF durante todo el embarazo. La administración se puede proporcionar durante el segundo y tercer trimestre de embarazo. Se puede continuar la administración después del parto durante aproximadamente una, aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro, aproximadamente cinco, aproximadamente seis, aproximadamente siete o aproximadamente ocho semanas después del parto. Se puede continuar el tratamiento hasta que la paciente presente una respuesta inmune Th1 normal para una paciente embarazada o una respuesta inmune Th2 normal para una paciente embarazada, o ambas, según el criterio de un facultativo experto en la técnica.

60 El G-CSF puede ser cualquier G-CSF conocido por los expertos en la técnica que sea eficaz en la modulación del sistema inmune de la paciente como se describe en las secciones anteriores. El G-CSF se puede formular según cualquier formulación para administración conocida por los expertos en la técnica. En las realizaciones preferidas, el

G-CSF está comercialmente disponible como filgrastim o pegfilgrastim. Otras moléculas y formulaciones de G-CSF eficaces se describen en detalle en las secciones que siguen.

5 La formulación de G-CSF se administra en una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz, esto es, una cantidad eficaz para prevenir o reducir o eliminar la preeclampsia o los síntomas de preeclampsia en la paciente. La cantidad puede ser determinada por los facultativos expertos guiados por la descripción de esta memoria y los conocimientos de la técnica. En las realizaciones preferidas, la cantidad puede ser cualquier cantidad de G-CSF que reduzca la respuesta Th1 de la paciente. En otras realizaciones, la cantidad puede ser cualquier cantidad suficiente para aumentar o iniciar una respuesta Th2 en la paciente. Los ensayos para determinar las respuestas Th1 y Th2 en la paciente son bien conocidos por los expertos en la técnica (Véase por ejemplo, Schust and Hill, 1996, J. Soc. Gynecol. Investig. 3:259-61, Xing *et al.*, 2001, Chin. Med. J. 114:921-4, Raghupathy *et al.*, 1999, Cell Immunol. 196:122-30, Mauri *et al.*, 1996 Eur. J. Immunol. 26:1511-8, Doncarli *et al.*, 1997, Eur. J. Immunol. 27: 1451-8, Raziuddin, 1998, J. Rheumatol. 25:329-33, Moverare *et al.*, 2000, Allergy 55:171-5). Se administran a la paciente 1 a 100 mcg/kg, de G-CSF.

15 El G-CSF se puede administrar según cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica. Los métodos de administración preferidos incluyen la administración subcutánea. Otros modos de administración eficaces se describen en detalle en las secciones que siguen.

20 Aunque generalmente una historia médica servirá para establecer las pacientes candidatas con necesidad de tratamiento como se describe aquí, se pueden utilizar ensayos de diagnóstico para establecer las pacientes que presentan ineficiencias reproductivas que están correlacionadas con parámetros inmunológicos particulares. Como se indica aquí, las pacientes con aborto espontáneo o interrupción del embarazo repetida, con preeclampsia, parto prematuro y similares presentan perfiles particulares de su estado del sistema inmunitario. Por lo tanto, las pacientes con alto número de células o alta actividad celular Th1 y/o con reducido número de células o reducida actividad celular Th2, o una relación aberrante de las dos pueden ser candidatas para obtener el presente tratamiento de interés.

25 Por lo tanto, un ensayo de diagnóstico de interés es uno que determina si aumenta o no el número de células o la actividad celular Th1. Otro ensayo de interés es uno que determina si disminuye o no el número de células o la actividad celular Th2. Otro ensayo más de interés es uno que determina una relación más alta del número de células Th1 al número de células Th2, o de la actividad celular Th1 a la actividad celular Th2.

30 Para realizar tales determinaciones, se puede usar un número de ensayos conocidos, por ejemplo, inmunoensayos o bioensayos. Por ejemplo, el interferón  $\gamma$ , el factor  $\beta$  de necrosis tumoral y la IL-2 son marcadores de las células Th1. Por lo tanto, los ensayos para uno o más de tales marcadores específicos de células pueden proporcionar la base para llegar a un estado de Th1 más alto que el normal. En cuanto a las Th2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 son marcadores conocidos de ese tipo de células. Por lo tanto, los ensayos para uno o más de tales marcadores específicos de células pueden proporcionar la base para llegar a la conclusión de un estado de Th2 más alto que el normal.

35 Como se ha descrito en detalle anteriormente, se describen aquí métodos para administrar una cantidad eficaz del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) para prevenir el aborto, el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida o para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro.

40 El G-CSF administrado en los métodos de la invención puede ser cualquier G-CSF conocido por los expertos en la técnica sin limitación. En ciertas realizaciones, el G-CSF puede ser cualquier G-CSF o cualquier derivado, variante, mimético, versión modificada químicamente o un híbrido de los mismos, como se describen en las patentes de Estados Unidos números 5.399.345; 5.416.195; 5.981.551; 6.166.183 y 6.261.550. En otras realizaciones, el G-CSF se puede administrar en la forma de una secuencia nucleotídica que codifica G-CSF o vectores de expresión que codifican G-CSF descritos en la patente de Estados Unidos N° 5.422.248.

45 En ciertas realizaciones, el G-CSF es un G-CSF comercialmente disponible, disponible como una composición farmacéutica, adecuada para administración a un animal, incluyendo un ser humano. Tales composiciones farmacéuticas comercialmente disponibles pueden ser, por ejemplo, filgrastim (Neupogen®, Amgen), pegfilgrastim (Neulasta®, Amgen) o lenograstim (Neutrogrin®, Chugai).

50 El filgrastim y el lenograstim son útiles para promover la proliferación de los neutrófilos y generalmente se administran a individuos que necesitan un aumento de neutrófilos, por ejemplo, pacientes que sufren quimioterapia. El filgrastim y el lenograstim están indicados para la quimioterapia mielodepresora, trasplante de médula ósea, recogida de células progenitoras de la sangre periférica y neutropenia crónica severa. Los usos no oficiales incluyen el tratamiento de la neutropenia en pacientes de SIDA, de anemia aplásica, de la leucemia de células pilosas, mielodisplasia, agranulocitosis inducida por fármacos y congénita y neutropenia neonatal aloinmune.

55 El tratamiento usual mielodepresor es de 5 mcg/kg/día, una vez al día ya sea subcutáneamente en bolo o por perfusión intravenosa corta (15-30 minutos) o por perfusión subcutánea o intravenosa continua. La administración es una vez al día empezando no antes de las 24 horas después de la quimioterapia y continuando durante 14 días o hasta que el recuento absoluto de neutrófilos del individuo sea de  $10.000/\text{mm}^3$ . Para los pacientes que sufren

trasplante de médula ósea, la dosis usual es 10 mcg/kg/día administrados como una perfusión intravenosa durante 4-24 horas o como una perfusión subcutánea continua de 24 horas. La primera dosis se administra generalmente al menos 24 horas después de la quimioterapia y al menos 24 horas después de la perfusión de la médula ósea. Durante la recuperación, se ajusta la dosis en 5 mcg/kg/día valorando el recuento total de neutrófilos del paciente.

5 La dosificación de filgrastim para las células progenitoras de sangre periférica generalmente empieza en 10 µg/kg/día subcutáneamente como un bolo o como perfusión continua. Se recomienda que el filgrastim sea administrado durante al menos cuatro días antes de la leucaféresis y se continúe hasta el último procedimiento de leucaféresis. La dosis de filgrastim para la neutropenia congénita es de 6 mcg/kg subcutáneamente dos veces al día mientras que la neutropenia idiopática o cíclica se trata generalmente con una dosis de 5 mcg/kg subcutáneamente una vez al día.

10 El pegfilgrastim es un conjugado de filgrastim con monometoxipolietilen-glicol. La composición farmacéutica está comercialmente disponible como soluciones exentas de conservantes de 10 mg/ml de pegfilgrastim en jeringas de dosis únicas precargadas. El pegfilgrastim está indicado para disminuir las infecciones en pacientes con neutropenia febril que están recibiendo quimioterapia mielodepresora. La dosis recomendada es una única inyección subcutánea de 6 mg administrada una vez por cada ciclo de quimioterapia.

15 Se describen aquí métodos para administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de G-CSF como monoterapia. En otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos para administrar a un paciente una cantidad eficaz de G-CSF en combinación con al menos otro agente activo. Otros agente activos incluyen la terapia inmunodepresora mieloablativa.

20 En un aspecto, la terapia inmunodepresora no mieloablativa puede ser cualquier terapia inmunodepresora no mieloablativa disponible para los expertos en la técnica. En un aspecto, la terapia inmunodepresora puede ser uno o más agentes antineoplásicos o quimioterapéuticos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antimitóticos, epipodofilotoxinas, antibióticos, hormonas, enzimas, complejos de coordinación de platino, antracenedionas, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina y topoisomerasas, como se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.162.417. Los ejemplos de tales agentes antineoplásicos o quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitarse a ellos, clorambucilo (Leukeran®, GlaxoWellcome), ciclofosfamida (Cytosan®, Mead Johnson), mecloretamina (Mustargen®, Merck), melfalan (Akeran®, GlaxoWellcome), busulfan (Myleran®, GlaxoWellcome), metotrexato (varios), citarabina (varios), fluorouracilo (5-fluorouracilo) (varios, incluyendo Aduvex®, Pharmacia Upjohn), cladribina (2-clorodesoxiadenosina, Leustain®, OrthoBiotech), fludarabina (Fludara®, Berlex) hidroxiaurea (Hydrea®, Bristol-Myers Squibb), asparaginasa (Elspar®, Berlex), mitoxantrona (Novantrone®, Immunex) y procarbazona (Matulane®, Roche). En un aspecto, la terapia inmunodepresora puede ser un agente inmunodepresor que no se usa generalmente como un agente antineoplásico o quimioterapéutico. Tales agentes inmunodepresores pueden ser alefacept (Amevive®, Biogen), azatioprina (Inuran®, GlaxoWellcome), basiliximab (Simulect®, Novartis), ciclosporina (Sandimmune® y Neoral®, Sandoz) daclizumab (Zenapax®, Roche), glatiramer (Copaxone®, TEVA), muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®, Ortho Biotech), micofenolato (CellCept®, Roche), tacrolimus (Prograf®, Fujisawa) y sirolimus (Rapamune®, Wyeth Labs). El agente inmunodepresor o quimioterapéutico apropiado puede ser seleccionado por un experto en la técnica basándose en las condiciones individuales por ejemplo, condiciones médicas comórbidas, salud general del paciente y la edad.

40 Los otros agentes activos, al menos uno, a usar con un G-CSF, incluyen un agente antiinflamatorio. El agente antiinflamatorio puede ser uno que reduzca las poblaciones de leucocitos. Se pueden usar también otros agentes antiinflamatorios. Por ejemplo, se pueden usar la vitamina D3 (1,25-dihidroxicolecalciferol) y sus análogos.

Los otros agentes activos, al menos uno, a usar con un G-CSF, son aquellos normalmente usados para tratar el aborto espontáneo o interrupción del embarazo recurrente, la preeclampsia, el fracaso de la implantación o el parto prematuro, tal como Ig intravenosa (IVIG) y heparina.

45 Se describen aquí métodos para administrar composiciones de G-CSF útiles para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación o para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro. En las composiciones administradas, el G-CSF se puede formular de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica para formular y administrar cantidades eficaces de G-CSF. Las formulaciones preferidas incluyen formulaciones comercialmente disponibles.

50 El filgrastim o G-CSF está disponible como una composición farmacéutica con conservantes que contiene 300 mcg/ml. La composición se puede administrar subcutáneamente sin mezcla adicional. Las preparaciones intravenosas requieren dilución con un diluyente apropiado, tal como dextrosa al 5 %, diluida hasta una concentración final de filgrastim de 5 a 15 mcg/ml. La solución salina no se recomienda como diluyente debido a la precipitación del producto. Se recomienda la mezcla con albúmina para prevenir la adsorción en materiales plásticos durante la preparación y perfusión. La concentración final de albúmina humana debería ser 2 mg/ml. Se recomienda altamente que el filgrastim sea refrigerado de 2° a 8 °C.

55 La composición farmacéutica actualmente disponible contiene una pequeña cantidad de acetato, Tween 80 y sodio. Estos excipientes se utilizan para alcanzar y mantener las características que son fisiológicamente aceptables para el cuerpo y farmacéuticamente prácticas y logradas. Tales características incluyen, tonicidad, osmoticidad,

osmolalidad, osmolaridad, viscosidad y estabilidad. Las composiciones farmacéuticas acuosas de G-CSF con aumento de semi vida han sido descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.919.757.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender el G-CSF en forma de sal. Por ejemplo, puesto que las proteínas pueden comprender cadenas laterales con terminales ácidos y/o básicos, las proteínas se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas en la forma de ácidos o bases libres, o en la forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir, ácidos adecuados que son capaces de formar sales con las proteínas de la presente invención incluyendo, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares; y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido cinámico, ácido antranílico, ácido cítrico, ácido naftalenosulfónico, ácido sulfanílico y similares. Las bases adecuadas capaces de formar sales con las proteínas indicadas pueden incluir, por ejemplo, bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y similares; y bases orgánicas tales como mono-, di- y tri-alquil aminas (por ejemplo, trietil amina, diisopropil amina, metil amina, dimetil amina y similares) y opcionalmente etanolaminas sustituidas (por ejemplo, etanolamina, dietanolamina y similares).

10 Aunque el G-CSF comercialmente disponible se administra normalmente subcutáneamente o intravenosamente, se puede usar cualquier método de administración que proporcione una cantidad terapéuticamente eficaz de G-CSF en los métodos de la invención. En un aspecto, el G-CSF puede estar en una variedad de formas adecuadas para cualquier vía de administración, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las vías parenteral, entérica, tópica o por inhalación.

15 La administración parenteral se refiere a cualquier vía de administración que no sea a través del canal alimentario, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la administración inyectable, esto es, intravenosa, intramuscular y similares como se describe más adelante. La administración entérica se refiere a cualquier vía de administración que sea oral, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, comprimidos, cápsulas, soluciones orales, suspensiones, pulverizaciones y similares, como se describe más adelante. Para los fines de esta invención, la administración entérica se refiere también a las vías de administración rectal y vaginal. La administración tópica se refiere a cualquier vía de administración a través de la piel, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, cremas, pomadas, geles y parches transdérmicos, como se describe más adelante (véase también, *Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Gennaro et al., eds., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania, 1990)*).

20 Las composiciones farmacéuticas parenterales de la presente invención se pueden administrar por inyección, por ejemplo, en una vena (intravenosamente), en una arteria (intraarterialmente), en un músculo (intramuscularmente) o bajo la piel (intradérmica o subcutánea) o en una composición depot.

25 Las composiciones farmacéuticas inyectables pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones estériles del G-CSF en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones pueden comprender también agentes o excipientes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria, en ampollas o en envases multidosis, y pueden comprender conservantes añadidos. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen tampones tales como citrato, acetato, fosfato, tris(hidroximetil)amino-metano o THAM (trometamina).

30 Las composiciones farmacéuticas depot o de liberación sostenida se pueden usar en los métodos de la invención. Por ejemplo, se puede conseguir la liberación continua de G-CSF por la conjugación del G-CSF con un polímero soluble en agua como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.320.840.

35 Las composiciones inyectables pueden ser composiciones farmacéuticamente apropiadas para cualquier vía de administración inyectable, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las vías intravenosa, intraarterial, intracoronaria, pericárdica, perivascular, intramuscular, subdérmica, subcutánea e intraarticular.

40 Alternativamente, la composición farmacéutica inyectable se puede presentar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, incluyendo pero sin limitarse a ellos, agua estéril libre de pirógenos, tampón, solución de dextrosa, etc., antes del uso. A este fin, el G-CSF se puede liofilizar cuando sea apropiado. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias y ser reconstituidas antes de usar *in vivo*.

45 Para liberación prolongada, la composición farmacéutica se puede presentar como una preparación depot, para administración por implantación; por ejemplo, subcutánea, intradérmica, o inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, la composición farmacéutica se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados como una emulsión en un aceite aceptable, o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles; como una forma de sal moderadamente soluble del G-CSF, o un derivado, mimético o variante del mismo. El GCSF puede estar presente en una matriz o dispositivo inerte para implantación para alcanzar la liberación prolongada.

50 Alternativamente, se pueden usar sistemas de liberación transdérmica fabricados como un disco o parche adhesivo que libera lentamente el ingrediente activo para absorción percutánea. A este fin, puede haber potenciadores de la permeación para facilitar la penetración del G-CSF. Se puede alcanzar un beneficio particular mediante la incorporación del G-CSF a un parche transdérmico.

Para la administración oral, las formulaciones farmacéuticas pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa); agentes de carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica (véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> edition (Gennaro *et al.*, eds.) Mack Printing Company, Pennsylvania, 1990).

Las composiciones farmacéuticas líquidas para administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones farmacéuticas líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo o ácido sórbico).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden preparar adecuadamente para proporcionar la liberación controlada del G-CSF.

Las composiciones farmacéuticas entéricas pueden ser adecuadas para administración bucal, por ejemplo, en la forma de comprimidos, pastillas o comprimidos para chupar. Para las vías de administración rectal y vaginal, el G-CSF se puede preparar como soluciones (por ejemplo para enemas de retención) supositorios o pomadas. Las composiciones farmacéuticas entéricas pueden ser adecuadas para mezclar con mezclas de alimentos, tales como, para mezcla con las mezclas de nutrición parenteral total (TPN) o para administración mediante una sonda de alimentación (véase, Dudrick *et al.*, 1998, Surg. Technol. Int. VII:174-184; Mohandas *et al.*, 2003, Natl. Med. J. India 16(1):29-33.; Bueno *et al.*, 2003, Gastrointest. Endosc. 57(4):536-40; Shike *et al.*, 1996, Gastrointest. Endosc. 44(5):536-40).

Para administración por inhalación, el G-CSF se puede administrar convenientemente en la forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o de un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar por medio de una válvula para liberar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular comprendiendo una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las composiciones farmacéuticas para inhalación pueden ser, por ejemplo, las descritas en las patentes de Estados Unidos números 5.,284.656 y 6.565.841.

Las composiciones se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede comprender una o más formas farmacéuticas unitarias que comprenden el G-CSF. El envase puede comprender por ejemplo una hoja metálica o de plástico, tal como un envase blister. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para un único uso, de una vez o pueden contener excipientes antimicrobianos, que hacen la composición adecuada para uso múltiple, uso extendido con mayor estabilidad, por ejemplo, un frasco multi-uso. En otra realización, la composición farmacéutica de interés puede estar en dosis unitarias o paquetes de uso unitario. Como es conocido en la técnica, una dosis unitaria se destina para un único uso. La forma de dosis unitaria puede estar en un vial, que puede contener una solución o una forma desecada para reconstitución, una jeringa precargada, un parche transdérmico y similares.

Como es conocido por los expertos en la técnica, un paquete de uso unitario es un tamaño conveniente de prescripción, una unidad lista para el paciente etiquetada para distribución por los profesionales sanitarios. El paquete contiene tanto ingrediente activo como sea necesario para un régimen de tratamiento típico.

La composición farmacéutica puede estar etiquetada y tener instrucciones que la acompañan para identificar la composición contenida allí y otra información útil para los profesionales sanitarios y los usuarios finales. La información puede incluir instrucciones para uso, dosis, intervalo de dosis, duración, indicación, efectos secundarios y otras contraindicaciones, advertencias, precauciones, recomendaciones de conservación y similares.

Se han descrito diferentes realizaciones de las composiciones farmacéuticas. Se pretende que las descripciones y ejemplos sean ilustrativos de la invención y no limitantes. De hecho, debe quedar claro para los expertos en la técnica que se pueden hacer modificaciones a las composiciones farmacéuticas en las diferentes realizaciones descritas de la invención, sin separarse del espíritu de la invención.

Se describen aquí métodos de administración de composiciones de G-CSF útiles para prevenir el aborto espontáneo, el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida o para tratar o prevenir la preeclampsia.

Las composiciones de GCSF y G-CSF se pueden administrar por cualquier vía o según cualquier programa que proporcione una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de G-CSF.

5 En un aspecto el G-CSF o composiciones de G-CSF se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo subcutáneamente o intravenosamente. La administración parenteral puede ser en un bolo único o como una perfusión continua. En un aspecto la administración parenteral puede ser una única perfusión intravenosa dada durante 15-30 minutos. En otro aspecto, la administración parenteral puede ser una perfusión continua de G-CSF diluido en dextrosa al 5 %.

10 Los métodos proporcionan la administración de GCSF durante un tiempo terapéuticamente o profilácticamente eficaz. El G-CSF se puede administrar antes del inicio u observación del trastorno o síntomas que acompañan al trastorno. El G-CSF se puede administrar durante el trastorno o durante el período de tiempo en que se observan los síntomas que acompañan el trastorno. El G-CSF se puede administrar durante un tiempo después de que el trastorno se haya resuelto. Por ejemplo, el G-CSF se puede administrar aproximadamente un día, aproximadamente dos días, aproximadamente tres días, aproximadamente cuatro días, aproximadamente una semana, aproximadamente dos semanas y hasta aproximadamente ocho semanas, después de la resolución de la preeclampsia, de los signos de parto prematuro, de la amenaza de aborto o después de la confirmación del embarazo durante la reproducción asistida.

15 Se describen aquí kits para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida. Los kits comprenden una o más dosis eficaces de G-CSF junto con una etiqueta o etiquetado con instrucciones sobre el uso del G-CSF para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida según los métodos de la invención. Los kits pueden comprender componentes útiles para realizar los métodos tales como dispositivos para liberar el G-CSF. El kit puede comprender componentes útiles para la eliminación segura de los dispositivos para liberar el G-CSF, por ejemplo, un recipiente para objetos punzantes para las jeringas usadas.

20 Se describen aquí kits para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida administrando células madre CD34+ de sangre periférica movilizadas. Estos kits comprenden una o más dosis eficaces de G-CSF junto con una etiqueta o etiquetado con instrucciones sobre el uso del G-CSF para movilizar las células madre CD34+ de sangre periférica según los métodos de la invención. Los kits pueden comprender también una etiqueta o etiquetado con instrucciones para recoger y/o conservar las células madre de la sangre periférica. En ciertas realizaciones, los kits comprenden un agente inmunodepresor mieloablativo descrito anteriormente. Estos kits pueden comprender también componentes útiles para realizar los métodos tales como dispositivos para liberar el G-CSF y componentes para la eliminación segura de estos dispositivos. Los kits pueden comprender también dispositivos para recoger las células madre sanguíneas y dispositivos y una formulación para conservar las células madre sanguíneas.

25 Se describen aquí kits para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida administrando a una paciente células madre de sangre periférica movilizadas por G-CSF. Los kits comprenden un dispositivo para administrar células madre de sangre periférica junto con instrucciones para administrar las células madre de sangre periférica movilizadas por G-CSF a una paciente para prevenir el aborto espontáneo o el fracaso de la implantación durante la reproducción asistida. Se describen aquí kits que comprenden los componentes de los kits para movilizar las células madre CD34+ de sangre periférica y los componentes para administrar las células madre de sangre periférica movilizadas por G-CSF a una paciente.

30 Se describen aquí kits para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro. Los kits comprenden una o más dosis eficaces de G-CSF junto con una etiqueta o etiquetado con instrucciones sobre el uso del G-CSF para tratar o prevenir la preeclampsia o el parto prematuro según los métodos de la invención. Los kits pueden comprender componentes útiles para realizar los métodos tales como dispositivos para liberar el G-CSF y los componentes para una eliminación segura de estos dispositivos.

35 Se describen aquí kits para tratar o prevenir el parto prematuro. Los kits comprenden una o más dosis eficaces de GCSF junto con una etiqueta o etiquetado con instrucciones sobre el uso del GCSF para tratar o prevenir el parto prematuro según los métodos de la invención. Los kits pueden comprender componentes útiles para realizar los métodos tales como dispositivos para liberar el GCSF y los componentes para una eliminación segura de estos dispositivos.

40 La invención será aclarada ahora en los siguientes ejemplos no limitantes.

**Ejemplo 1: El G-CSF previene los efectos embriotóxicos de las células procedentes de mujeres con aborto espontáneo recurrente *in vitro***

45 El G-CSF es eficaz para prevenir la muerte de embriones de ratón en un ensayo clínico para aborto espontáneo *in vitro*. Los bioensayos en ratón han sido ampliamente usados para detectar los efectos embriotóxicos de sueros de pacientes que tienen dificultad reproductiva. (Véase, Cameo, *et al.*, 1999, Human Reprod. 14(4):959-63, Oksenberg and Brautbar 1986, Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 11(4):118-24, Roussev *et al.*, 1995, Am. Reprod. Immunol. 33(2):171-175 y Thomason *et al.*, 1995, Am. J. Reprod. Immunol. 34 (6):338-41).

En el ensayo clínico *in vitro*, se aíslan los leucocitos mononucleares de mujeres que sufren aborto espontáneo recurrente. Se cultivan los leucocitos, y se separa el medio de cultivo de los leucocitos. Este medio de cultivo se pone entonces en contacto con embriones murinos. Los factores tóxicos del medio de cultivo típicamente matan a los embriones murinos en este ensayo.

- 5 Se incuban los leucocitos mononucleares con G-CSF antes de la separación del medio de cultivo. Se separa entonces el medio de cultivo de los leucocitos y se pone en contacto con los embriones murinos. La supervivencia de los embriones murinos indica la reducción de los factores embriotóxicos en el medio de cultivo y con ello la eficacia de la administración de GCSF para la prevención del aborto espontáneo en este modelo *in vitro*.

**Ejemplo 2: El G-CSF previene el aborto espontáneo en un modelo de ratón *in vivo***

- 10 El G-CSF inhibe eficazmente el aborto espontáneo en un modelo bien conocido *in vivo*.

La pareja murina de apareamiento CBA x DBA/2 (véase por ejemplo, Yabuki *et al.*, 2003, Exp. Anim. 52(2)159-63) tiene una tasa de abortos espontáneos de aproximadamente el 40 %. En este ejemplo, los ratones hembras CBA se tratan según los métodos de la invención. Se tratan con G-CSF antes del apareamiento, al tiempo del apareamiento e inmediatamente después del apareamiento. Una reducción de la tasa de abortos espontáneos en los ratones tratados con G-CSF con respecto a los ratones control indica que el G-CSF previene eficazmente el aborto espontáneo en este modelo *in vivo*.

- 15

**Ejemplo 3: El G-CSF previene el aborto habitual *in vivo***

Se incluyeron en el estudio treinta y una mujeres con abortos habituales, con más de tres abortos (Scarpellini & Sbracia, 2004, Am. J Repro. Imm. 51(6) 433-4). Los estudios citogenéticos, histerosalpingografía, ultrasonidos, biopsia endometrial, ensayos con hormonas (estradiol, progesterona, prolactina, hormonas tiroideas etc.) desarrollo de diabetes y ensayos de autoanticuerpos (ACA, AND, AMA, SMA y anti-lupus Ab) fueron poco interesantes. Todas las mujeres habían fracasado con un tratamiento previo con Igs, o corticosteroides y aspirina en el primer embarazo. Se eligieron aleatoriamente dieciséis mujeres y se trataron con filgrastim a 100 mg/día SC, que había empezado el sexto día después de la ovulación y continuó hasta el día 35 después de la ovulación. La otras 15 mujeres recibieron un placebo y progesterona.

- 20
- 25

En el grupo que recibió filgrastim, 14 de 16 quedaron embarazadas y mantuvieron el embarazo durante el período de registro. El cariotipo de los fetos era normal. En el grupo control, solamente ocurrieron cuatro embarazos, los niveles de hCG aparecidos en las mujeres tratadas estaban aumentados en un tercio frente a los niveles observados en las mujeres control.

- 30 Aunque la invención anterior ha sido descrita en algún detalle por medio de ilustración y ejemplos con fines de aclarar su comprensión, será muy claro para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones a la misma que se separan del alcance de la invención descrita en esta memoria.

**REIVINDICACIONES**

1. Factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF) para uso en la reducción del riesgo de aborto espontáneo en un sujeto femenino, donde dicha paciente se encuentra en las 20 primeras semanas de embarazo y donde se administran a dicha paciente 1 a 100 mcg (microgramos)/kg de G-CSF.
- 5 2. G-CSF para uso según la reivindicación 1, donde dicho G-CSF se formula para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, entérica, oral, vaginal o de liberación prolongada.
3. G-CSF para uso según la reivindicación 2, donde el G-CSF se formula para administración subcutánea.
4. G-CSF para uso según la reivindicación 2, donde dicha formulación de liberación prolongada comprende una matriz o dispositivo inerte que contiene el G-CSF formulado con materiales poliméricos o hidrófobos, un G-CSF conjugado con un polímero soluble en agua, o un disco o parche adhesivo capaz de liberar lentamente el G-CSF para una absorción percutánea o intradérmica
- 10 5. G-CSF para uso según la reivindicación 1, donde el G-CSF se administra durante un día, dos días, tres días, cuatro días o cinco días.
6. G-CSF para uso según la reivindicación 5, donde el G-CSF se administra durante cinco días consecutivos durante el primero o segundo trimestre de embarazo.
- 15 7. G-CSF para uso según la reivindicación 1, donde el G-CSF se administra durante una, dos, tres, o cuatro semanas.
8. G-CSF para uso según la reivindicación 7, donde el G-CSF se administra durante cuatro semanas.
9. G-CSF para uso según la reivindicación 1, donde el G-CSF se administra diariamente.
- 20 10. G-CSF para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha paciente ha tenido previamente uno o dos abortos espontáneos.
11. G-CSF para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha paciente ha tenido previamente más de dos abortos espontáneos.
- 25 12. G-CSF para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha paciente está en el primer trimestre de embarazo.
13. G-CSF para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha paciente está en el primero o segundo mes de embarazo.
14. G-CSF para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el aborto espontáneo es interrupción del embarazo, amenaza de aborto, aborto espontáneo inevitable, aborto espontáneo incompleto, o aborto espontáneo habitual o recurrente.
- 30 15. Un kit para uso en la reducción del riesgo de aborto espontáneo en una mujer, donde el kit comprende G-CSF y una etiqueta o etiquetado con instrucciones para administrar 1 a 100 mcg (microgramos)/kg de G-CSF a una mujer en las primeras 20 semanas de embarazo.
16. El kit para uso según la reivindicación 15, donde el G-CSF se formula para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, entérica, oral, vaginal o de liberación prolongada.
- 35 17. Un kit para uso según la reivindicación 16, que comprende dicha formulación de liberación prolongada como una matriz o dispositivo inerte que contiene el G-CSF formulado con materiales poliméricos o materiales hidrófobos, un G-CSF conjugado con un polímero soluble en agua, o un disco o parche adhesivo capaz de liberar lentamente el G-CSF para una absorción percutánea o intradérmica.
- 40 18. Un kit para uso según la reivindicación 15, donde el kit comprende una etiqueta o etiquetado con instrucciones para la administración de G-CSF durante una, dos, tres, o cuatro semanas.
19. Un kit para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el aborto espontáneo es interrupción del embarazo, amenaza de aborto, aborto espontáneo inevitable, aborto espontáneo incompleto, o aborto espontáneo habitual o recurrente.

45