

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 730**

51 Int. Cl.:

A61K 31/33	(2006.01)	A61K 35/12	(2015.01)
A61K 31/555	(2006.01)	C12N 5/0789	(2010.01)
A61K 38/19	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
A61K 31/496	(2006.01)		
A61K 31/55	(2006.01)		
A61K 31/551	(2006.01)		
A61K 31/395	(2006.01)		
A61K 31/4427	(2006.01)		
A61K 35/28	(2015.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2002 E 10184509 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2371361**

54 Título: **Métodos de movilización de células progenitoras/madre**

30 Prioridad:

31.07.2001 US 309196 P
20.05.2002 US 382155 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

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:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 742 730 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 de movilización de células progenitoras/madre

5 **Campo técnico**

La invención está en el campo de la terapéutica y la química medicinal. Más particularmente, la invención se refiere a métodos de movilización de células progenitoras/madre en sujetos administrando ciertas poliaminas.

10 **Técnica anterior**

Los glóbulos sanguíneos desempeñan una parte crucial parte en el mantenimiento de la salud y la viabilidad de los animales, que incluyen los seres humanos. Los glóbulos blancos incluyen neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y basófilos/mastocitos, además de los linfocitos B y T del sistema inmunitario. Los glóbulos blancos son continuamente sustituidos por el sistema hematopoyético, por la acción de los factores estimulantes de colonias (CSF) y diversas citocinas en las células madre y células progenitoras en los tejidos hematopoyéticos. Se han clonado y secuenciado las secuencias de nucleótidos que codifican varios de estos factores de crecimiento. Quizás el más ampliamente conocido de estos es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que ha sido autorizado para su uso en contrarrestar los efectos negativos de la quimioterapia estimulando la producción de glóbulos blancos y células progenitoras (movilización de células madre de sangre periférica). Una discusión de los efectos hematopoyéticos de este factor se puede encontrar, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.582.823, incorporada en el presente documento como referencia.

Se ha informado que varios otros factores aumentan los glóbulos blancos y las células progenitoras en tanto sujetos humanos como animales. Estos agentes incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), PIXY-321 (proteína de fusión GM-CSF/IL-3), proteína inflamatoria de macrófagos, factor de células madre, trombopoyetina y oncogén relacionado con el crecimiento, como agentes individuales o en combinación (Dale, D., et al., *Am. J. of Hematol.* (1998) 57:7-15; Rosenfeld, C., et al., *Bone Marrow Transplantation* (1997) 17:179-183; Pruijt, J., et al. *Cur. Op. in Hematol.* (1999) 6:152-158; Broxmeyer, H., et al., *Exp. Hematol.* (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., *Ann. Intern. Med.* (1997) 126:673-81; King, A., et al., *Blood* (2001) 97:1534-1542; Glaspy, J., et al. *Blood* (1997) 90:2939-2951).

Aunque los factores de crecimiento endógenos son farmacológicamente eficaces, las desventajas bien conocidas de emplear proteínas y péptidos como productos farmacéuticos sirve de base a la necesidad de añadir al repertorio de dichos factores de crecimiento agentes que sean moléculas pequeñas. En otro aspecto, dichas moléculas pequeñas son ventajosas con respecto a las proteínas y péptidos donde se desea la producción en grandes cantidades.

Se han descrito varios agentes antivirales de poliamina cíclica en una serie de patentes y solicitudes de EE.UU. durante los últimos años. Estas patentes son las patentes de EE.UU. N° 5.021.409; 6.001.826; 5.583.131; 5.698.546; y 5.817.807. Véanse también las publicaciones PCT WO 00/02870 basada en una solicitud presentada el 8 de julio de 1998 y WO 01/44229 basada en una solicitud presentada el 17 de diciembre de 1999, que describen compuestos adicionales. Estas publicaciones describen las características estructurales de los agentes antivirales de poliamina cíclica.

También se han descrito las características estructurales de varios agentes antivirales de amina no cíclica en una serie de solicitudes de EE.UU., ahora publicadas como publicaciones PCT. Estas publicaciones son el documento de patente WO 00/56729, basado en una solicitud presentada el 24 de marzo de 2000; el documento de patente WO 02/22600, basado en solicitudes presentadas el 15 y 20 de septiembre de 2000; el documento de patente WO 02/22599, basado en solicitudes presentadas el 15 y 22 de septiembre de 2000, así como el documento de patente WO 02/34745 publicado el 2 de mayo de 2002.

Además, se describen métodos mejorados de preparación de algunos de los compuestos de poliamina cíclica en las patentes de EE.UU. N° 5.612.478; 5.756.728; 5.801.281; y 5.606.053 y la publicación de patente PCT WO 02/26721, basada en una solicitud presentada el 29 de septiembre de 2000.

Los presentes inventores han encontrado previamente, y han desvelado en la publicación de patente PCT WO 02/58653, basada en una solicitud presentada el 1 de febrero de 2000, que algunos de los agentes antivirales de poliamina descritos en las publicaciones anteriormente mencionadas tienen el efecto de aumentar el número de leucocitos. Ahora se ha encontrado que los agentes antivirales de poliamina descritos en las publicaciones anteriormente mencionadas también tienen el efecto de aumentar las células progenitoras y/o células madre.

El desarrollo y la maduración de glóbulos sanguíneos es un proceso complejo. Los glóbulos sanguíneos maduros derivan de células precursoras hematopoyéticas (progenitores) y células madre presentes en tejidos hematopoyéticos específicos que incluyen la médula ósea. Dentro de estos entornos, las células hematopoyéticas

prolifera y se diferencian antes de entrar en la circulación. Parece que el receptor de quimiocina CXCR4 y su ligando natural, el factor 1 de células derivadas del estroma (SDF-1), son importantes en este proceso (para revisiones véase Maekawa, T., et al., *Internal Med.* (2000) 39:90-100; Nagasawa, T., et al., *Int. J. Hematol.* (2000) 72:408-411). Esto se demuestra por informes de que ratones inactivados en CXCR4 o SDF-1 presentan 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 requieren SDF-1 producido por las células del estroma 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 tanto células CD34+ (Aiuti, A., et al., *J. Exp. Med.* (1997) 185:111-120; Viardot, A., et al., *Ann. Hematol.* (1998) 77:194-197) como células progenitoras/madre (Jo, D-Y., et al., *J. Clin. Invest.* (2000) 105:101-111). SDF-1 también es un quimioatrayente importante, que señala mediante el receptor CXCR4, para varias otras células progenitoras y glóbulos sanguíneos maduros más comprometidos que incluyen linfocitos T y monocitos (Bleul, C., et al., *J. Exp. Med.* (1996) 184:1101-1109), pro- y pre-linfocitos 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 células que llevan receptores CXCR4 si estas células son células madre (es decir, células que son CD34+) y/o células progenitoras (que dan como resultado la formación de tipos especificados de colonias en respuesta a estímulos particulares; que pueden ser CD34⁺ o CD34⁻) o células que son algo más diferenciadas.

Recientemente, se ha centrado una considerable atención en el número de células CD34+ movilizadas en la mezcla de células progenitoras de sangre periférica usada para el trasplante de células madre autólogas. Se cree que la población de CD34+ es el componente principalmente responsable del tiempo de recuperación mejorado después de la quimioterapia y las células más probablemente responsables del 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 que se re-injertan células CD34+ 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 mostró que las células madre hematopoyéticas 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, la función del receptor CXCR4 en la gestión del posicionamiento y la diferenciación celular ha asumido una significancia considerable.

La citación de los documentos anteriores no pretende ser una admisión de que cualquiera de lo anterior sea estado de la técnica relevante. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o la representación en cuanto al contenido de estos documentos se basa en la información disponible para los solicitantes y no constituye ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o contenido de estos documentos.

Divulgación de la invención

La presente invención proporciona un compuesto que es 1,1'-[1,4-fenilen-bis-(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclodecano o una sal o complejo metálico farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método que comprende: (a) administrar dicho compuesto a un sujeto, para movilizar células progenitoras y/o madre en dicho sujeto; y (b) recolectar dichas células progenitoras y/o madre. Dicho sujeto, en particular, puede ser un sujeto veterinario o humano. Las células progenitoras y/o madre se pueden usar en trasplante de células.

Los compuestos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros compuestos y composiciones para potenciar la población de células madre y/o células progenitoras en la sangre periférica. También puede resultar una producción potenciada de glóbulos blancos en la médula ósea.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención para su uso en el método expuesto anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un gráfico de obtención de progenitores mieloides en respuesta al tratamiento con 1,1'-[1,4-fenilen-bis(metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclodecano (AMD3100) en combinación con proteína inflamatoria de macrófagos después de la administración de G-CSF.

Los agentes antivirales de poliamina cíclica y amina no cíclica descritos en los documentos anteriormente mencionados inhiben la replicación de VIH mediante la inhibición de CXCR4, el co-receptor requerido para la fusión y entrada de cepas de VIH T-trópicas, y también inhiben la unión y señalización inducida por el ligando natural, la quimiocina SDF-1. Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna, los compuestos de la invención que inhiben la

unión de SDF-1 a CXCR4 llevan a cabo un aumento en las células madre y/o progenitoras en virtud de dicha inhibición. El potenciar las células madre y/o progenitoras en sangre es útil en los tratamientos para aliviar los efectos de protocolos que afectan adversamente la médula ósea, tales como aquellos que dan como resultado leucopenia. Estos son efectos secundarios conocidos de la quimioterapia y la radioterapia. Los compuestos de la invención también potencian el éxito del trasplante de médula ósea, potencian la cicatrización y el tratamiento de quemaduras, y ayudan en la restauración de tejido del órgano dañado. También combaten las infecciones bacterianas que son predominantes en la leucemia. Los compuestos de la invención se usan para movilizar y recolectar células CD34+ mediante aféresis con y sin combinaciones con otros factores de movilización. Las células recolectadas se usan en tratamientos que requieren trasplantes de células madre.

Como se usa en el presente documento, el término "células progenitoras" se refiere a células que, en respuesta a ciertos estímulos, pueden formar células hematopoyéticas o mieloides diferenciadas. La presencia de células progenitoras se puede evaluar por la capacidad de las células en una muestra para formar unidades formadoras de colonias de diversos tipos, que incluyen, por ejemplo, UFC-GM (unidades formadoras de colonias, granulocitos-macrófagos); UFC-GEMM (unidades formadoras de colonias, multipotenciales); UFR-E (unidades formadoras en ramilletes, eritroides); HPP-CFC (células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo); u otros tipos de colonias diferenciadas que se pueden obtener en cultivo usando protocolos conocidos.

Como se usa en el presente documento, las células "madre" son formas de células progenitoras menos diferenciadas. Normalmente, dichas células son frecuentemente positivas para CD34. Sin embargo, algunas células madre no contienen este marcador. Estas células CD34+ se pueden ensayar usando citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) y así se puede evaluar su presencia en una muestra usando esta técnica.

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 que otros tipos de células tales como las células endoteliales y los mastocitos también pueden presentar este marcador, CD34 se considera un índice de la presencia de células madre.

Preferentemente, el compuesto de la invención es 1,1'-[1,4-fenilen-bis-(metilen)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.

Los métodos de síntesis de los compuestos de la invención se exponen en las patentes y solicitudes de EE.UU. desveladas anteriormente en este documento.

Como se proporciona anteriormente, AMD3100 es un antagonista del receptor de quimiocina CXCR4 (Gerlach et al., J. Biol. Chem. (2001) 276:14153-14160). Este compuesto interfiere con la unión de SDF-1 derivada de células del estroma de médula ósea con CXCR4 en células madre que conduce a la liberación de células madre hematopoyéticas de la médula ósea en la circulación (Broxmeyer et al., Blood (2001) 98:811a (Resumen)). En un estudio de fase 1 en la Universidad de Washington, Seattle, una dosis única de 80 µg/kg de AMD-3100 produjo un recuento de WBC de 17.000/µl y un aumento máximo de 6 veces en células progenitoras/madre CD34+ circulantes en el momento de tiempo de 6 horas (Liles et al., Blood 2001 98:737a (Resumen)). En otro estudio reciente, se inyectaron ratones con rhG-CSF y factor de células madre de rata recombinante (rrSCF) para movilizar grandes números de células madre de la médula ósea en la circulación y entonces los presentes inventores indujeron un infarto de miocardio. La combinación de rrSCF y rhG-CSF proporciona un número máximo de células madre circulantes después de 5 inyecciones diarias. 27 días después de la cirugía hubo una mejora del 68 % en la supervivencia en el grupo tratado frente a los controles. En este momento, se sustituyó el tejido muerto con miocardio en regeneración y mejoraron todos los parámetros funcionales probados en comparación con los controles (Orlic et al., PNAS (2001) 98:10344-10349).

Los compuestos de la invención se pueden preparar en forma de profármacos, es decir, formas protegidas que liberan los compuestos de la invención después de la administración al sujeto. Normalmente, los grupos protectores se hidrolizan en líquidos corporales tales como en la circulación sanguínea, liberando así el compuesto activo, o se oxidan o reducen *in vivo* para liberar el compuesto activo. Una discusión de profármacos se encuentra en Smith y Williams, Introduction to the Principles of Drug Design, Smith, H.J.; Wright, 2ª ed., London (1988).

Los compuestos de la invención, como son poliaminas, se pueden administrar preparados en las formas de sus sales de adición de ácido o complejos metálicos de las mismas. Las sales de adición de ácido adecuadas incluyen sales de ácidos inorgánicos que son biocompatibles, que incluyen 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, tal como oxálico, glutárico, adípico y similares. Normalmente, a pH fisiológico, los compuestos de la invención estarán en 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.

Los compuestos de la invención se pueden administrar como principios activos únicos, como mezclas de diversos compuestos de fórmula (1), y/o en mezcla con principios activos adicionales que son terapéuticamente o nutricionalmente útiles, tales como antibióticos, vitaminas, extractos herbales, antiinflamatorios, glucosa,

antipiréticos, analgésicos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), PIXY-321 (proteína de fusión GM-CSF/IL-3), proteína inflamatoria de macrófagos, factor de células madre, trombopoyetina, oncogén relacionado con el crecimiento, o quimioterapia y similares.

5 Los compuestos de la invención se pueden formular para administración a un sujeto animal usando técnicas de formulación comúnmente entendidas bien conocidas en la técnica. Las formulaciones que son adecuadas para modos particulares de administración y para compuestos del tipo representado por los de la fórmula (1) se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición, Mack Publishing Company, Easton, PA.

10 Preferentemente, los compuestos se administran por inyección, lo más preferentemente por inyección intravenosa, pero también por inyección subcutánea o intraperitoneal, y similares. Las vías de administración parenteral adicionales incluyen inyección intramuscular e intrarticular. Para administración intravenosa o parenteral, los compuestos se formulan en forma líquida adecuada con excipientes según sea necesario. Las composiciones pueden contener liposomas u otros vehículos adecuados. Para inyección por vía intravenosa, la solución se hace isotónica usando preparaciones estándar tales como solución de Hank.

15 Además de la inyección, también se pueden usar otras vías de administración. Los compuestos se pueden formular en comprimidos, cápsulas, jarabes, polvos, u otras formas adecuadas para administración por vía oral. Usando excipientes adecuados, estos compuestos también se pueden administrar a través de la mucosa usando supositorios o esprays intranasales. También se puede efectuar administración transdérmica usando penetrantes adecuados y controlando la velocidad de liberación.

20 La formulación y la vía de administración elegida se ajustarán al sujeto individual, la naturaleza de la afección que se va a tratar en el sujeto y, generalmente, el criterio del médico adjunto.

25 Los intervalos de dosificación adecuados para los compuestos de la invención varían según estas consideraciones, pero en general los compuestos se administran en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/kg-5 mg/kg de peso corporal; preferentemente el intervalo es aproximadamente 1 µg/kg-300 µg/kg de peso corporal; más preferentemente aproximadamente 10 µg/kg-100 µg/kg de peso corporal. Para un sujeto humano típico de 70 kg, por lo tanto, el intervalo de dosificación es desde aproximadamente 0,7 µg-350 mg; preferentemente aproximadamente 700 µg-21 mg; lo más preferentemente aproximadamente 700 µg-7 mg. Las dosificaciones pueden ser mayores cuando los compuestos se administran por vía oral o transdérmica en comparación con, por ejemplo, administración i.v.

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

35 Además de la administración directa al sujeto, los compuestos de la invención se pueden usar en protocolos de tratamiento *ex vivo* para preparar cultivos celulares que luego se usan para reponer los glóbulos sanguíneos del sujeto. Se puede realizar tratamiento *ex vivo* en células autólogas recolectadas de la sangre periférica o médula ósea o de aloinjertos de donantes compatibles. La concentración del compuesto de la invención solo o en combinación con otros agentes, tales como proteína inflamatoria de macrófagos, es una cuestión de optimización rutinaria.

40 Los sujetos que responden favorablemente a los compuestos de la invención incluyen sujetos médicos y veterinarios generalmente, que incluyen pacientes humanos. Entre otros sujetos para los que los compuestos de la invención son útiles están los gatos, perros, animales grandes, aves tales como pollos, y similares. En general, es apropiado para la administración de los compuestos de la invención cualquier sujeto que se beneficiaría de una elevación de células progenitoras y/o células madre, o cuyas células progenitoras y/o células madre fueran deseables para el trasplante de células madre.

45 Las afecciones normales que se pueden mejorar o se han beneficiado de otro modo por los compuestos de la invención incluyen trastornos hematopoyéticos, tales como anemia aplásica, leucemias, anemias inducidas por fármacos, y déficits hematopoyéticos de quimioterapia o radioterapia. Los compuestos de la invención también son útiles en potenciar el éxito del trasplante durante y tras los tratamientos inmunosupresores, así como en efectuar cicatrización más eficiente y tratamiento de inflamación bacteriana. Los compuestos de la presente invención son además útiles para tratar sujetos que están inmunodeprimidos o cuyo sistema inmunitario está alteado de otro modo. Las afecciones normales que mejoran o se benefician de otro modo incluyen los sujetos que se infectan con un retrovirus y más específicamente que se infectan con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los compuestos de la invención se pueden así dirigir a un amplio espectro de afecciones para las que sería beneficiosa la elevación de células progenitoras y/o células madre en un sujeto, o donde sería beneficiosa la recolección de células progenitoras y/o células madre para el posterior trasplante de células madre.

50 Los compuestos de la invención también se administran para regenerar miocardio movilizandocélulas madre de la médula ósea.

Habiendo ahora descrito generalmente la invención, lo mismo se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

5 **Ejemplo 1**

Elevación de los niveles de células progenitoras de ratón

10 Se midieron los efectos de la administración subcutánea (s.c.) de 1,1'-[1,4-fenilen-bis(metilen)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciotetradecano (AMD3100) a ratones C3H/H3 J sobre los números de células progenitoras de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), eritroides (UFR-E) y multipotenciales (UFC-GEMM) por ml de sangre. Se estimularon los progenitores para formar colonias *in vitro* con la combinación de 1 U/ml de Epo rhu, 50 ng/ml de SLF rhu, 5 % ^{Vol/Vol} de medio acondicionado con células del bazo de ratón estimuladas con mitógeno de *Phytolacca americana* (PWMSCM) y hemina 0,1 mM. Las placas se puntuaron 7 días después de la incubación.

15 Los efectos dependientes del tiempo sobre el número de progenitores movilizados con AMD3100 son para una única inyección s.c. de 5 mg/kg y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Progenitores absolutos por ml de cultivo en metilcelulosa de sangre		
	UFC-GM	UFR-E	UFC-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

20 Para medir los efectos dependientes de la dosis, se administró AMD3100 a 1, 2,5, 5 y 10 mg/kg por una única inyección s.c. y se midió el número de progenitores por ml de sangre 1 hora después de la administración, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

25 **Tabla 2**

	Número absoluto de progenitores por ml de cultivo en metilcelulosa de sangre		
	UFC-GM	UFR-E	UFC-GEMM
Solución salina	188,1	16	19
AMD3100: 10 mg/kg	825,6	120,5	79,8
AMD3100: 5 mg/kg	608,4	92,8	69,5
AMD3100: 2,5 mg/kg	687,6	98,9	70,6
AMD3100: 1 mg/kg	424	62	27,1
Cambio en veces en comparación con Tiempo 0			
Cultivo en metilcelulosa de progenitoras			
Tiempo	GM	UFR-E	UFC-GEMM
15"	2,73	2,72	3,51
30"	6,23	4,24	4,41
2'	2,86	2,07	1,85

Se logra la movilización máxima de progenitores de ratón 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.

30 **Ejemplo 2**

Movilización de células progenitoras de ratón en combinación con MIP-1α y G-CSF

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

40 Se aleatorizaron grupos de ratones para recibir diluyente de control (solución salina) o G-CSF a una dosis de 2,5 µg por ratón, dos veces al día, durante dos días por 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-1α administrado i.v. a una dosis total de 5 µg, AMD3100 administrado s.c. a una dosis de 5 mg/kg, o una combinación de tanto MIP-1α como AMD3100 a las mismas dosis. Una hora después, se sacrificaron los ratones y se midió el número de células progenitoras por ml de sangre. Estos datos se resumen en la Figura 1.

45 AMD3100 actúa en un modo de aditivo a más que aditivo para la movilización de células progenitoras cuando se usa

en combinación con proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α de ratón (mu), cada uno administrado 11 horas después de la adición de G-CSF rhu o diluyente de control (solución salina) y 1 hora antes de evaluar la sangre.

Ejemplo 3

5

Elevación clínica de los niveles de células progenitoras

10 Se usaron en el estudio cinco voluntarios humanos sanos que tenían números iniciales de leucocitos de 4.500-7.500 células/mm³. Cada paciente se administró con una única inyección subcutánea (s.c.) de 80 μ g/kg de AMD3100 (es decir, 1,1'-[1,4-fenilen-bis(metilen)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano) en 0,9 % de solución salina, de una solución madre de 10 mg/ml de AMD3100 en solución salina, en condiciones estériles. Se obtuvieron muestras de sangre mediante catéter antes de la dosis, y en diversos momentos hasta 24 horas después de la dosificación.

15 Se evaluaron las muestras de sangre para glóbulos blancos totales, células progenitoras CD34 positivas (mediante análisis de FACS) como un porcentaje de glóbulos blancos totales, así como los números absolutos por ml y el estado del ciclo de células progenitoras de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), eritroides (UFR-E) y multipotenciales (UFC-GEMM).

20 Como se muestra en las Tablas 3 y 4, la administración de AMD3100 causó una elevación del número de leucocitos y de células progenitoras CD34 positivas en voluntarios humanos que fue máxima 6 horas después de la administración.

Tabla 3

AMD3100 indujo la movilización de glóbulos blancos en voluntarios individuales (x 10 ³ WBC).									
ID	Filtro	Nivel inicial	TRATAMIENTO						
			30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	9 h	Día 2
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

25

Tabla 4

AMD3100 indujo la movilización de células CD34 positivas, expresado como el porcentaje de WBC totales en voluntarios individuales.						
ID	Nivel inicial	TRATAMIENTO				
		1 h	3 h	6 h	9 h	Día 2
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

También se analizó la sangre para la movilización por AMD3100 de estos progenitores.

30 Se midieron los números absolutos de células nucleadas sin separar y de baja densidad (separadas por Fico-hypaque) por ml de sangre, así como los números absolutos por ml y el estado del ciclo de las células progenitoras de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), eritroides (UFR-E) y multipotenciales (UFC-GEMM) en donantes normales inyectados s.c. con AMD3100. Los parámetros anteriores se evaluaron antes de la inyección y 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la inyección de AMD3100. Todos los resultados de las 5 células progenitoras se basan en la puntuación de 3 placas de cultivo por ensayo por punto.

35

40 Para los números de células progenitoras y el estado del ciclo, los números de UFC-GM, UFR-E y UFC-GEMM en cultivos de metilcelulosa por estimulación de las células con 1 unidad (U)/ml de eritropoyetina recombinante humana (rhu), 100 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) rhu, 100 U/ml de interleucina-3 (IL-3) rhu y 50 ng/ml de factor Steel rhu (SLF = factor de células madre (SCF)). También se evaluaron UFC-GM en cultivos de agar estimulados con 100 U/ml de GM-CSF rhu y 50 ng/ml de SLF rhu. Para ambos tipos de ensayos, las colonias se puntuaron después de 14 días de incubación en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y tensión de O₂ (5 %) reducida. Se midió el estado del ciclo celular de progenitores usando una técnica de destrucción con timidina tritiada de alta actividad como se describe previamente (Broxmeyer, H. E., et al., Exp. Hematol. (1989) 17:455-459).

45

Los resultados se dan primero como la media del cambio en veces en números absolutos de células nucleadas y

ES 2 742 730 T3

progenitores 1, 3, 6, 9 y 24 horas en comparación con los recuentos de preinyección (=Tiempo (T) 0) para los cinco donantes, como se observa en las Tablas 5-7.

En las tablas a continuación

5

DE - Desviación estándar

EE - Error estándar

SP-NS - sangre periférica-no separada

SP-BD - sangre periférica-baja densidad (separada con Ficoll)

10

P - Significancia usando una prueba de la t bilateral

Tabla 5

	Cambio en veces en comparación con TIEMPO = 0 (Promedio de 5 donantes)									
	CELULARIDAD NUCLEADA									
	SP-NS					SP-BD				
	MEDIA	DE	EE	% de CAMBIO	P	MEDIA	DE	EE	% de CAMBIO	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	0,69	0,31	209,4 %	0,000	3,64	1,18	0,53	264,3 %	0,001
T=24	1,07	0,65	0,29	7,0 %	0,553	1,05	1,19	0,53	4,6 %	0,815

Tabla 6
CULTIVO EN METILCELULOSA

	UFC-GM				UFR-E				UFC-GEMM						
	MEDIA	DE	EE	% de CAMBIO	P	MEDIA	DE	EE	% de CAMBIO	P	MEDIA	DE	EE	% de CAMBIO	P
T=0	1,00	0,00	0,00	0,0 %	0,000	1,00	0,00	0,00	0,0 %	0,000	1,00	0,00	0,00	0,0 %	0,000
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	4,33	0,44	0,20	332,5 %	0,000
T=6	21,71	5,78	2,58	2070,6 %	0,000	6,01	1,25	0,56	500,5 %	0,006	10,07	0,59	0,27	907,2 %	0,002
T=9	10,47	5,09	2,28	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	1,56	3,01	1,34	55,5 %	0,005	1,26	1,02	0,45	26,3 %	0,194	1,53	3,04	1,36	53,2 %	0,199

ES 2 742 730 T3

Tabla 7

	CULTIVO EN AGAR UFC-GM				
	MEDIA	DE	EE	% de CAMBIO	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 se muestran entonces como un cambio en veces desde niveles de T=0 para cada donante individual, como se muestra en las Tablas 8-10.

5

Tabla 8

	CAMBIO EN VECES EN COMPARACIÓN CON TIEMPO=0 de cada paciente individual (P)									
	CELULARIDAD NUCLEADA									
	SP-NS					SP-BD				
	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	1,38	1,38	1,36	1,76	2,07	1,99	1,48	1,66	2,10
T=3	3,55	2,74	2,02	2,46	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	2,27	2,78	5,30
T=9	3,27	3,30	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

	PROGENITORES CULTIVO EN METILCELULOSA														
	UFC-GM					UFR-E					UFC-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	1,43	2,13	2,07	2,26	2,22	1,96	3,07
T=3	7,12	17,02	15,07	20,72	8,43	5,13	1,98	2,61	2,60	3,75	4,25	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	2,82	0,69	0,98	2,25

10

Tabla 10

	CULTIVO EN AGAR UFC-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

Se muestran en las Tablas 11 y 12 los números reales de células nucleadas y células progenitoras por ml de sangre y el estado del ciclo (= % de progenitores en la fase de síntesis (S) de ADN del ciclo celular) de progenitores para cada uno de los cinco donantes (Nº P1, P2, P3, P4 y P5).

15

Tabla 11

	UFC-GM		UFR-E P1		UFC-GEMM		UFC-GM		UFR-E P2		UFC-GEMM	
	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores
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 %

ES 2 742 730 T3

	UFC-GM			UFR-E P3			UFC-GEMM			UFC-GM			UFR-E P4			UFC-GEMM		
	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de
T=0	281	0 %		351	0 %		140	0 %		138	0 %		480	0 %		101	0 %	
T=1	1040	0 %		808	0 %		312	0 %		947	0 %		672	0 %		199	0 %	
T=3	4233	1 %		915	0 %		610	0 %		2857	5 %		1195	9 %		519	0 %	
T=6	5895	0 %		1593	0 %		916	0 %		3936	0 %		1533	0 %		920	8 %	
T=9	2647	0 %		1302	0 %		347	0 %		1942	0 %		1348	0 %		457	0 %	
T=24	402	0 %		402	0 %		97	0 %		208	5 %		362	3 %		99	0 %	

	UFC-GM			UFR-E P5			UFC-GEMM		
	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	del de
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 %	

Tabla 12

	Cultivo de AGAR UFC-GM P1		Cultivo de AGAR UFC-GM P2		Cultivo de AGAR UFC-GM P3		Cultivo de AGAR UFC-GM P4		Cultivo de AGAR UFC-GM P5	
	Nº de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº de progenitores por M L	Estado del ciclo de progenitores	Nº de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores	Nº absoluto de progenitores por ml	Estado del ciclo de progenitores
T=0	233	6 %	100	0 %	140	0 %	124	0 %	104	0 %
T=1	710	0 %	376	0 %	234	0 %	336	0 %	298	3 %
T=3	2070	0 %	953	1 %	1049	0 %	1299	0 %	664	0 %
T=6	4142	0 %	2409	3 %	1072	3 %	1623	0 %	2153	1 %
T=9			1032	0 %	1085	0 %	1268	0 %	1326	0 %
T=24			371	0 %	159	0 %	162	0 %	229	0 %

Los resultados para los cinco donantes fueron muy coherentes con los aumentos de veces máximos en los niveles de células progenitoras circulantes observados 6 horas después de la inyección de AMD3100 en los sujetos donantes humanos. Los progenitores estuvieron en un estado lento o no de ciclo antes de y 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la inyección de AMD3100.

5

Ejemplo 4

Células madre de médula ósea movilizadas para reparación miocárdica

10 Se anestesian ratas adultas y se realiza una toracotomía. Se liga la rama descendente de la arteria coronaria izquierda y no se perfunde. En el plazo de 4 a 6 horas después de la ligadura, se inyectan los animales con dilución límite de AMD-3100 o AMD-3100 más rhG-CSF. Las ratas de control no se tratan con los reactivos. Los animales se monitorizan a intervalos de una semana por ecocardiografía e IRM. El experimento se termina 2, 6 a 12 semanas después de la cirugía. El día del sacrificio, se analizan las funciones hemodinámicas para la tensión telediastólica del

15 ventrículo izquierdo, tensión desarrollada por el ventrículo izquierdo y la tasa de aumento y disminución de la tensión del ventrículo izquierdo. Entonces se detiene el corazón en la diástole y se perfunde por la aorta abdominal para lavar la sangre residual de la red vascular del miocardio. Esto va seguido por perfusión del corazón con 10 % de formalina. Se hacen varios cortes a través del corazón fijado y estos se incorporan en parafina y secciones. Se tiñen las secciones y se analizan por microscopía óptica para determinar el tamaño del infarto en los animales tratados y

20 de control. Se tiñen secciones de tejido de corazones tomadas 2 semanas después de la cirugía con anticuerpos específicos para proteínas inmaduras, que desarrollan miocitos y vasos sanguíneos, y se analizan por microscopía confocal. El análisis inmunohistoquímico implica la identificación de factores de transcripción y marcadores superficiales expresados en fases tempranas del desarrollo de miocitos. Los resultados de este experimento mostrarán que cuando el reactivo AMD-3100 se administra en el plazo de horas después de la inducción de

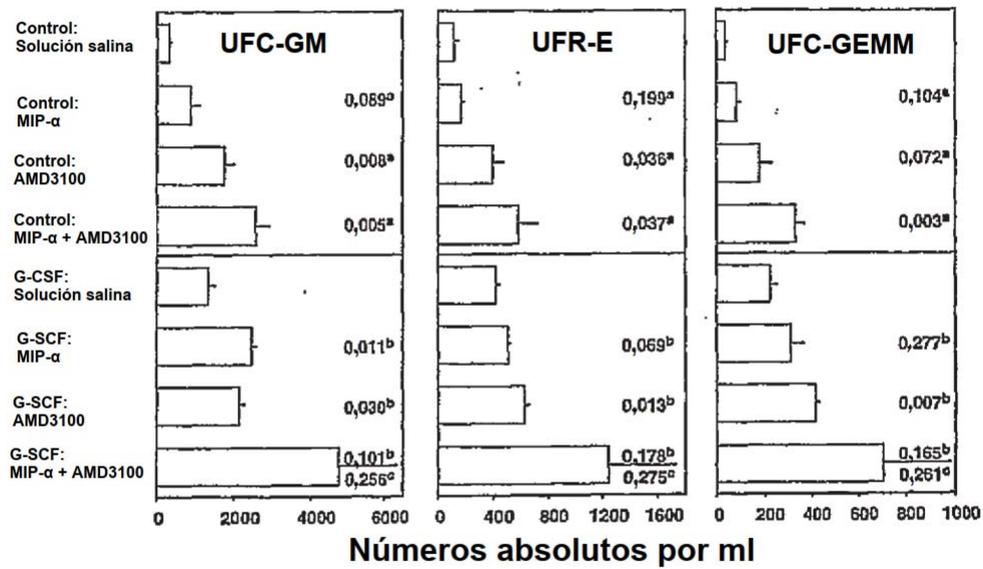
25 isquemia cardíaca, junto con o sin rhG-CSF, este reactivo moviliza rápidamente las células madre de la médula ósea, y dará como resultado un bloqueo para la remodelación cardíaca y la formación de cicatrices y conducirá a la regeneración del miocardio muerto.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que es 1,1'-[1,4-fenilen-bis-(metilen)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano o una sal o complejo metálico farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método que comprende:
- (a) administrar dicho compuesto a un sujeto, para movilizar células progenitoras y/o madre en dicho sujeto; y
(b) recolectar dichas células progenitoras y/o madre.
- 10 2. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, que es para su uso en movilizar y recolectar células CD34+ mediante aféresis.
3. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde las células recolectadas son adecuadas para su uso en trasplante de células.
- 15 4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde las células recolectadas son adecuadas para su uso en trasplante de células madre autólogas.
5. Un compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el sujeto es un donante sano de células madre.
- 20 6. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde las células recolectadas son adecuadas para tratar un déficit hematopoyético de quimioterapia o radioterapia.
7. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es 1,1'-[1,4-fenilen-bis-(metilen)]-bis-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano.
- 25 8. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en la administración a dicho sujeto por inyección.
- 30 9. Un compuesto para su uso según la reivindicación 8, para su uso en la administración a dicho sujeto por inyección intravenosa.
10. Un compuesto para su uso según la reivindicación 8, para su uso en administración a dicho sujeto por inyección subcutánea.
- 35 11. Un compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en combinación con otro compuesto.
- 40 12. Un compuesto para su uso según la reivindicación 7, en donde dicho método comprende administrar G-CSF a dicho sujeto.

Figura 1

**Progenitores mieloides
(significancia)**



a = Valor de p comparado con Control/solución salina
 b = Valor de p comparado con G-CSF/solución salina
 c = Valor de p comparado con Control/MIP-1α+AMD3100