

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 475**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2003 E 10184898 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2319528**

54 Título: **Métodos para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas y plaquetas**

30 Prioridad:

18.09.2002 US 411700 P
18.09.2002 US 411779 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2020

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 08560, US

72 Inventor/es:

KAUSHANSKY, KENNETH y
MACDONALD, BRIAN R.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 781 475 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas y plaquetas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes N° 60/411.779 y 60/411.700 presentadas el 18 de Septiembre del 2002.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La trombopoyetina (TPO), clonada inicialmente como un regulador principal de la producción de plaquetas, juega un papel fundamental en la biología de las células madre hematopoyéticas (HSC). Kaushansky y otros, Nature, 369:568-571 (1994). Virtualmente todas las HSC primitivas que muestran actividad de repoblación expresan c-Mpl, el receptor de TPO. Solar y otros, Blood, 92:4-10 (1998). La TPO sola o en combinación con otras citoquinas de actuación temprana, como el factor de células madre (SCF), interleucina 3 (IL-3), o el ligando Flt-3 mejoran la proliferación de las HSC primitivas in vitro. Ku y otros, Blood, 87:4544-4551 (1996); Sitnicka y otros, Blood, 87:4998-5005 (1996). Los estudios in vivo han confirmado estas conclusiones. Kimura y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95:1195-1200 (1998). La importancia de TPO en las auto renovación y expansión de las células madre también fue respaldada por la observación clínica que las mutaciones del gen c-Mpl causaron en la trombocitopenia amegacariocítica congénita, una enfermedad en la que todos los linajes hematopoyéticos fallan durante la infancia. Ballmaier y otros, Blood, 97:139-146 (2001). Se ha descubierto que la expansión de las HSCs en la médula ósea adulta es de 10 a 20 veces menos robusta en tpo-/- ratones después del trasplante de médula ósea. La TPO añadida de forma exógena rescató este defecto. Fox y otros, J. Clin. Invest., 110:389-394 (2002). Estos informes indican que la TPO es un contribuidor no redundante principal a la auto renovación y expansión de las HSCs. De Serres et al., Stem Cells, 17(6):316-326 divulga el mimético de TPO PEGilado GW395058 y sus efectos en ratas y monos.

25 El trasplante de células madres autólogo (ASCT) es cada vez más ampliamente usado como un medio de reconstituir la médula ósea después de la administración de altas dosis de quimioterapia potencialmente curativa, mieloablativa. La base para esta técnica es movilizar HSCs desde la médula ósea a la sangre periférica (usando quimioterapia de cebado G-CSF +/-) de la que son recolectadas por aféresis. Estas células madre, que forman una minoría de la población recolectada, son entonces capaces de reconstituir la médula ósea cuando son reinfundidas después de terapia mieloablativa. Las células madre obtenidas de sangre periférica en esta técnica parecen ser similares a las células de sangre del cordón y superiores a las células de médula ósea en su capacidad para regenerar médula ósea después de terapia mieloablativa con tiempo para injerto de neutrófilos y plaquetas de menos de 10 días. Los tipos de tumor más comunes en los que se usa la ASCT son mieloma, linfoma (tanto Enfermedad de Hodgkins como Linfoma no de Hodgkins) y Leucemia Mieloide Aguda. La quimioterapia de dosis alta con la ASCT puede ser utilizada cada vez más como terapia de primera línea, particularmente en el mieloma, pero también se usa como terapia de rescate después del fallo de la quimioterapia de primera línea. Dichos sujetos a menudo han sido pretatados fuertemente y por lo tanto tienen la médula ósea con potencial hematopoyético dañado.

30 Después de la re-infusión de estas células recolectadas en el sujeto, hay un periodo de tiempo durante el cual el sujeto, por ejemplo, un paciente humano, está en riesgo de infección (neutrófilos bajos) y sangrado (plaquetas bajas). Este periodo de tiempo varía dependiendo del número de células madre re-infundidas, que a su vez depende de la capacidad de estimular la expansión de las células madre de la médula ósea. Además, algunos sujetos también desarrollan fallo de la médula ósea después de un periodo inicial de injerto.

35 El trasplante de células madre también es usa en un ajuste alogénico cuando las células madre de la sangre periférica se movilizan y recolectan de donantes compatibles con la HLA. Tales trasplantes alogénicos son empleados menos frecuentemente que el ASCT debido a la incidencia del injerto frente a la enfermedad del huésped pero pueden ser usados cuando no es posible obtener suficientes células madre del paciente. Sin embargo el uso de células madre alogénicas para obtener injerto parcial en ausencia de mieloablación completa (el 'mini trasplante') puede también ofrecer algún beneficio terapéutico debido al efecto injerto frente a tumor. Otro uso posible, actualmente en un número extremadamente de pacientes es en el campo de la terapia génica donde las células de médula ósea alogénicas normales o células autólogas transducidas con una copia normal de un gen defectuoso pueden ser curativas para alguna enfermedad heredada causada por defectos de genes individuales. Los trasplantes alogénicos están también bajo investigación como una opción terapéutica para las enfermedades autoinmunes.

40 A pesar de la utilidad potencial y simplicidad del ASCT, hay limitaciones significativas a su uso generalizado más allá del periodo esperado de pancitopenia, para el cual se requiere apoyo del sujeto intensivo para permitir a las células re-infundidas el reanudar niveles de hematopoyesis suficientes para mantener los recuentos de sangre periférica. Una proporción significativa (hasta el 40%) de los sujetos trasplantados requieren transfusiones de plaquetas prolongadas después del trasplante (fallo primario del injerto). Un grupo más pequeño (5-10% en autólogo y >20% con trasplante alogénico) desarrollan trombocitopenia a pesar del injerto inicial, algunas veces requiriendo

transfusiones prolongadas. El fallo del injerto o el injerto retardado está asociado con mortalidad aumentada, costes de salud aumentados y calidad de vida del sujeto disminuida.

5 Existe por lo tanto una necesidad de aumentar la producción de HSC en dichos sujetos. Los estudios han demostrado que la administración de TPO a pacientes resulta en la movilización de las células progenitoras de la sangre periférica. Un estudio demostró la movilización de las células formadoras de colonias de linajes múltiples y células CD34+ en la sangre periférica después de la administración de múltiples dosis de TPO en combinación con G-CSF. Otro estudio identificó un aumento de 6 veces en las células CD34+ circulantes 3-7 días después de la administración de una única dosis de TPO en pacientes con cáncer con hematopoyesis por lo demás normal. En este estudio, una subfracción enriquecida con células madre (CD34+Thy+Lin-) fue aumentada casi 9 veces y la subfracción megacariocítica (CD34+CD41+CD14-) fue aumentada casi 15 veces. Este estudio sugiere que la TPO es capaz de movilizar tanto la auto-renovación de HSC como las células hijas comprometidas de la médula ósea. Aunque la disponibilidad de TPO recombinante (rh TPO) se ha mostrado prometedora para aumentar la producción de HSC, existe una necesidad de una mejora en la terapia de TPO por medio del modo de la administración del fármaco.

20 Existe por lo tanto una necesidad para compuestos miméticos moleculares pequeños de TPO que mantengan sustancialmente la actividad agonista completa de TPO, mientras que al mismo tiempo permitan varios modos de administración.

También existe una necesidad de compuestos miméticos moleculares pequeños de TPO que tengan inmunogenicidad reducida en relación a uno o más de rh TPO y rhIL-11 así como un perfil farmacocinético mejorado en relación a uno o más de rh TPO y rhIL-11.

25 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

En un aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un compuesto mimético de TPO como se define en la presente para su uso en un método para aumentar la producción de HSC en un sujeto que comprende un paso de administrar la composición farmacéutica al sujeto. En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un compuesto mimético de TPO como se define en la presente para su uso en un método de (i) proporcionar células madre hematopoyéticas a un sujeto; (ii) reducir un tiempo de injerto después de la reinfusión de células madre en un sujeto; (iii) reducir la incidencia de injerto primario retrasado; (iv) reducir la incidencia de fallo secundario en la producción de plaquetas; o (v) reducir el tiempo de injerto de plaquetas y/o neutrófilos después de la reinfusión de células madre en un sujeto, en donde el método comprende los pasos de: administrar la composición farmacéutica a un sujeto; potenciar la expansión de una población de células madre dentro de la médula ósea y/o movilizar células madre en circulación periférica; recoger una o más de las células madre de la médula ósea o las células madre en la circulación periférica; y trasplantar las células madre recogidas en el sujeto. El compuesto mimético de TPO se administra al sujeto en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable. El compuesto mimético de TPO puede emplearse solo o puede combinarse con uno o más compuestos miméticos de TPO adicionales y/u otros agentes que pueden mejorar la movilización de células madre de la médula ósea, incluyendo, por ejemplo, G-CSF, SCF, IL-3 y/o Flt-3.

45 La presente invención está dirigida a una composición farmacéutica mimética de TPO que comprende una cantidad eficaz del compuesto mimético de TPO para su uso como se define en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. Una cantidad eficaz de un compuesto mimético de TPO está presente cuando, tras la administración, el compuesto mimético de TPO mejora la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea de un sujeto y/o moviliza las células madre hacia la circulación periférica de un sujeto.

50 La composición de la invención también puede usarse en un método para proporcionar HSC a un sujeto. El método puede incluir los pasos de administrar la composición farmacéutica al sujeto para mejorar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea y/o movilizar las células madre en la circulación periférica. A continuación, el método puede incluir recoger una o más células madre del sujeto o de la médula ósea o de la circulación periférica y luego trasplantar la una o más células madre recogidas al sujeto.

55 La composición de la invención también puede usarse en un método para proporcionar HSC de un sujeto donante a un sujeto receptor.

60 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Fig. 1 es un listado de compuestos, que pueden ser adecuados para su uso en el método de la presente invención.

65 La Fig. 2 es un esquema que representa la regulación de la producción de plaquetas y HSC de acuerdo con el método de la presente invención.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un compuesto mimético de TPO como se define en la presente para su uso en un método para aumentar la producción de HSC como se define en la presente, que comprende administrar a un sujeto la composición farmacéutica como se define en la presente. La Fig. 1 divulga compuestos y formas PEGiladas de los compuestos expuestos en la Fig. 1. La metodología que puede emplearse para la PEGilación de los compuestos expuestos en la Fig. 1 se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.451.

En una realización, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un compuesto mimético de TPO como se define en la presente para su uso en un método para aumentar la producción de HSC administrando a un sujeto un péptido TPO, como se describe en la solicitud de Estados Unidos N° de serie 60/498.740 (presentada el 28 de agosto de 2003) (expediente del apoderado N° 038073-5005 PR), presentada el 28 de agosto de 2003. La presente divulgación proporciona un péptido de TPO que es un compuesto que tiene (1) un peso molecular de menos de alrededor de 5000 daltons, y (2) una afinidad de enlace con el receptor de TPO como se expresa por un IC₅₀ de no más de alrededor de 100 µM, en donde desde cero a todos los ligamientos - C(O)NH de los péptidos han sido reemplazados por un ligamiento seleccionados del grupo consistente de ligamiento - CH₂OC(O)NR; un ligamiento de fosfonato; un ligamiento - CH₂S(O)₂NR; un ligamiento CH₂NR; un ligamiento C(O)NR⁶; y un ligamiento -NHC(O)NH donde R es hidrógeno o alquilo inferior y R⁶ es alquilo inferior, además en donde el término N de dicho compuesto es seleccionado del grupo consistente de un grupo -NRR¹; un grupo -NRC(O)OR; un grupo -NRS(O)₂R; un grupo -NHC(O)NHR; un grupo succinimida; un grupo benciloxilcarbonilo-NH; y un grupo benciloxicarbonilo-NH que tienen de 1 a 3 sustituyentes en el anillo de fenilo seleccionados del grupo consistente en alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro y bromo, donde R y R¹ son independientemente seleccionados del grupo consistente de hidrógeno y alquilo inferior, y aún más cuando el término C del compuesto tiene la fórmula - C(O)R² donde R² es seleccionado del grupo consistente de hidroxilo, alcoxi inferior, y -NR³R⁴ donde R³ y R⁴ son seleccionados independientemente del grupo consistente de hidrógeno y alquilo inferior y donde el átomo de nitrógeno del grupo -NR³R⁴ puede ser opcionalmente el grupo amino del término N del péptido para formar un péptido cíclico, y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

En una realización de la divulgación, el péptido mimético de TPO comprende una secuencia de aminoácidos X₉X₈GX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇, donde X₉ es A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T o V; y X₈ es A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T o V; y X₆ es un residuo de β-(2-naftil)alanina (referida en la presente como "2-Nal"). Más preferiblemente, X₉ es A o I, y X₈ es D, E o K, Además, X₁ es C, L, M, P, Q o V; X₂ es F, K, L, N, Q, R, S, T o V; X₃ es C, F, I, L, M, R, S, V o W; X₄ es cualquiera de los 20 L-aminoácidos genéticamente codificados; X₅ es A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V o Y; y X₇ es C, G, I, K, L, M, N, R o V.

Un péptido mimético de TPO particularmente preferido es I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R A.

El péptido mimético de TPO de la presente invención es dimerizado u oligomerizado para aumentar la afinidad y/o actividad del compuesto. Un ejemplo de dicho compuesto incluye:

I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R A – X₁₀

K(NH₂)

I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R A – X₁₀

donde X₁₀ es una sarcosina o residuo de β-alanina o una forma pegilada de este compuesto. La forma pegilada puede incluir un residuo de MPEG de 20k ligado covalentemente a cada isoleucina N-terminal.

Uno o más péptidos miméticos de TPO, y en particular péptidos miméticos de TPO PEGilados (referidos colectivamente en la presente como "compuestos miméticos de TPO" o "compuestos miméticos de TPO de la invención"), pueden ser usados para aumentar el número de células madre en la médula espinal. Datos importantes que respaldan el uso de un compuesto mimético de TPO en ASCT se proporcionan por un estudio realizado por Somlo y otros, Blood, 93(9):2798-2806 (1999), en el que la trombopoyetina humana recombinante (rh TPO) fue capaz de mejorar los rendimientos de movilización y aféresis de las células madre CD34+ en respuesta a G-CSF con reducción consecuente en el número de aféresis. Posteriormente el injerto de células reinfundidas se mejoró también en términos de tiempo reducido a ANC > 0,5 x 10⁹/L e independencia de la trasfusión de plaquetas, aunque este efecto no alcanzó significancia estadística en el pequeño tamaño de muestra usado en este estudio piloto. Aumentando el número de células madre, la recolección total de células madre del sujeto se puede mejorar

significativamente. Además, aumentando el número de células madre recolectadas del sujeto, el número de células madre disponibles para el trasplante de vuelta al sujeto puede ser también mejorado significativamente, reduciendo potencialmente de esta manera el tiempo para el injerto (el tiempo durante el cual el sujeto tiene neutrófilos y plaquetas insuficientes), previniendo de este modo complicaciones.

Además, la presente invención puede también reducir la proporción de sujetos que son incapaces de recolectar suficientes células para proceder con el tratamiento para su enfermedad primaria, por ejemplo, quimioterapia y otros tratamientos ablativos de la médula ósea. Además, la proporción del número de sujetos con injerto primario retardado puede ser también reducido.

Los compuestos miméticos de TPO como los de la Figura 1 y divulgados en la presente pueden ser usados para aumentar la producción de HSC. Esto se consigue administrando uno o más de los compuestos al sujeto. Los compuestos enumerados en la Figura 1 y divulgados en la presente, así como las formas PEGiladas de los compuestos, enumerados en la Figura 1 pueden tener inmunogenicidad reducida en relación a uno o más de rhTPO y rhIL-11 y pueden tener también un perfil farmacocinético mejorada en relación a uno o más de rhTPO y rhIL-11.

Los compuestos miméticos de TPO pueden también ser usados para proporcionar HSCs autólogos a un sujeto. Típicamente, esto implica los pasos de administrar un compuesto mimético a un sujeto con necesidad del mismo para mejorar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea y/o movilizar las células madre en la circulación periférica; recolectar una o más de las células madre de la médula ósea o una o más de las células madre en la circulación periférica; y trasplantar la una o más células madre recolectadas de vuelta al sujeto.

Además, las células madre obtenidas de la recolección de acuerdo con el método de la presente invención descrito anteriormente pueden ser criopreservadas usando técnicas conocidas en la técnica para la criopreservación de células madre. Por lo tanto, usando la criopreservación, las células madre pueden ser mantenidas de tal forma que una vez que se determina que un sujeto tiene necesidad de trasplante de células madre, las células madre pueden ser descongeladas y trasplantadas de vuelta al sujeto.

Los compuestos miméticos de TPO, incluyendo los compuestos enumerados en la Figura 1 y divulgados en la presente así como las formas PEGiladas de los compuestos enumerados en la Figura 1, pueden ser usados por lo tanto, entre otros, para: reducir el tiempo de injerto después de la reinfusión de las células madre en un sujeto; reducir la incidencia del injerto primario retardado; reducir la incidencia del fallo secundario de la producción de plaquetas; y reducir el tiempo del injerto de plaquetas y/o neutrófilos después de la reinfusión de las células madre en un sujeto. Estos métodos incluyen típicamente los pasos de administrar un compuesto mimético de TPO a un sujeto con necesidad del mismo para mejorar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea y/o movilizar las células madre en la circulación periférica y después recolectar una o más de las células madre de la médula ósea o las células madre en la circulación periférica y después trasplantar las células madre recolectadas de vuelta en el sujeto en el momento apropiado, como se determine por las necesidades particulares del sujeto.

Los compuestos miméticos de TPO de la presente invención también son para su uso en métodos para aumentar el número de células madre de un sujeto donante cuyas células se usan luego para rescatar a un sujeto recipiente que ha recibido quimioterapia ablativa de la médula ósea.

A. Formas de Dosificación y Vías de Administración

Los compuestos miméticos de TPO útiles para la presente invención pueden ser administrados como composiciones farmacéuticas que comprenden, como un ingrediente activo, al menos uno de los péptidos o miméticos de péptidos enumerados en la Figura 1 y/o divulgados en la presente y/o descritos en la Patente U.S. N° 5.869.451, el contenido completo de la cual es incorporado en la presente para referencia, en asociación con un portador o diluyente farmacéutico. Los compuestos pueden ser administrados por vías de administración oral, pulmonar, parental (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (a través de una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal, o sublingual y pueden ser formuladas en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. Ver, por ejemplo, Bernstein, y otros, Publicación de Patente PCT N° WO 93/25221.; Pitt, y otros, Publicación de Patente PCT N° WO 94/17784.; y Pitt, y otros, Solicitud de Patente Europea 613.683, cada una de las cuales está incorporada en la presente por referencia.

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede estar mezclado con al menos un portador farmacéuticamente aceptable inerte como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación pueden también comprender, como es la práctica normal, sustancias adicionales además de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación pueden también comprender agentes de tamponamiento. Los comprimidos y píldoras pueden ser preparados adicionalmente con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes farmacéuticamente aceptables, con los elixires conteniendo diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, como el agua. Además dichos diluyentes, composiciones inertes pueden también incluir adyuvantes, como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensores, y agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas estériles. Ejemplos de solventes o vehículos no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y el aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Dichas formas de dosificación pueden también contener adyuvantes como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Pueden ser esterilizados por, por ejemplo, filtrado a través de un filtro retenedor de bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. Pueden también ser fabricados usando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso.

Las composiciones para la administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes como manteca de cacao o una cera de supositorio. Las composiciones para la administración nasal o sublingual son también preparadas con excipientes estándar bien conocidos en la técnica.

Las composiciones de la invención pueden ser también microencapsuladas por, por ejemplo, el método de Tice y Bibi (en *Treatise on Controlled Drug Delivery*, ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, New York (1992), pp. 315-339).

La composición puede ser también combinada con, entre otros, G-CSF, SCF, IL-3 o Flt-3 y/o otros agentes que pueden mejorar la movilización de células madre de la médula ósea (incluyendo quimioterapia de cebado y antagonistas de la integrina).

B. Cantidad de Dosificación

Las cantidades de un compuesto mimético de TPO necesarias para la presente invención dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo medio de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del sujeto, y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, las dosificaciones de tratamiento deben ser valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Típicamente, las dosificaciones usadas in vitro pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración in situ de estos reactivos. Las pruebas en animales de dosis efectivas para el tratamiento de trastornos particulares proporcionarán una indicación predictiva adicional de la dosificación en humanos. Se describen varias consideraciones, por ejemplo, en Gilman, y otros. (eds), *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8^a, Pergamon Press (1990); y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 7^a Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1985).

Los compuestos miméticos de TPO son útiles para la presente invención cuando se administran en un intervalo de dosificación de desde alrededor de 0,001 mg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal por día. Alternativamente, en algunas circunstancias también se puede administrar de 0,0001 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. La dosis específica empleada es regulada por la condición particular a ser tratada, la vía de administración así como el juicio del médico encargado dependiendo de factores como la severidad de la condición, la edad y condición general del sujeto, y similares.

C. Sujetos e Indicaciones

Como se usa en la presente, el sujeto incluye cualquiera que es un candidato para el trasplante de médula ósea o células madre autólogas durante el curso de tratamiento de una enfermedad maligna o como un componente de terapia génica. Otros posibles candidatos son sujetos que donan células madre o médula ósea a sujetos para trasplantes alogénicos para enfermedades malignas o terapia génica.

Para proporcionar una probabilidad aceptable de injerto, se deben recolectar un número mínimo de células madre. Aunque no está definido con precisión, es generalmente aceptado que se deben recolectar 2-3 x 10⁶ células CD34⁺ por kg para proporcionar una posibilidad razonable de injerto. La reinfusión de 5 x 10⁶/kg células parece producir los resultados óptimos en términos de tiempo de injerto. Este gran número de células es requerido porque el número real del subconjunto específico de células CD34⁺ que son capaces de reconstitución a largo plazo de la médula ósea es muy pequeño. Tanto como el 20% de los pacientes trasplantados son considerados como movilizados pobres, requiriendo múltiples aféresis para generar células suficientes. Aunque uno de los vaticinadores de la pobre movilización de las células madre es la edad del paciente el pretratamiento fuerte con quimioterapia es también un factor significativo. Hay probablemente un gran número de pacientes, particularmente pacientes ancianos con mieloma o NHL, que nos son considerados para la ASCT por la poca probabilidad de injerto con éxito.

Consecuentemente el compuesto mimético de TPO de la invención proporciona una solución a la necesidad insatisfecha en la ASCT, es decir, la necesidad de mejorar la proporción de pacientes que tiene injerto exitoso y rápido. Esto se consigue principalmente debido a la mejora en la movilización de las células madre, ya sea aumentando el número de células movilizadas o aumentando la proporción de HSCs en la población de CD34+ movilizadas. El método de la invención por lo tanto proporciona los siguientes beneficios:

1. Permite el trasplante para proceder en pacientes que no podrían de otra manera ser considerados candidatos por el riesgo inaceptablemente alto o fallo del injerto;
2. reduce el número de aféresis requeridas para generar una recolección mínima aceptable;
3. reduce la incidencia de fallo primario y secundario del injerto aumentando el número de HSCs disponibles para el trasplante; y
4. Reduce el tiempo requerido para el injerto primario aumentando el número de precursores comprometidos de los linajes hematopoyéticos importantes.

De acuerdo con el efecto establecido de la TPO en las HSCs, los compuestos miméticos de TPO de la invención pueden tener los siguientes beneficios clínicos en el trasplante de células madre:

- Mejora en los rendimientos de aféresis: Numerosos estudios han sugerido que el número de células madre CD34+ reinfundidas es un factor importante para determinar el tiempo para el injerto. Como se ha demostrado con TPO, la adición de un compuesto mimético de TPO puede aumentar la movilización de las células CD34+ como un adjunto a los regímenes de movilización convencionales de G-CSF y quimioterapia. El beneficio principal será mejorar la posibilidad para el rápido y posterior injerto a largo plazo. Reducir el número de aféresis requeridas para generar un número aceptable de células reducirá el coste y las molestias del paciente. La mejora en los rendimientos de aféresis será de beneficio particular en pacientes con factores de riesgo para movilización baja (edad y pretratamiento fuerte). Tales pacientes pueden de otra manera no ser candidatos para la ASCT.
- Mejora en el potencial de injerto de las células aferisadas: El injerto a largo plazo después de la terapia mieloablativa se produce por una pequeña fracción de la población de células CD34+ (más probablemente dentro de la población de CD34+CD38-Lin⁻). Debido a que son tan raras, se requiere gran número de células CD34+ para proporcionar injerto efectivo ($2-5 \times 10^6/\text{kg}$). La G-CSF no afecta a las proporciones de diferentes subtipos de células CD34+ y es simplemente usado como un agente que puede aumentar el número de estas células en la sangre periférica antes de la recolección. La quimioterapia de cebado puede ser realmente tóxica para dichas células. Sin embargo la TPO es cada vez más ampliamente reconocida como un agente que puede aumentar la auto-renovación de las células madre más primitivas, y por lo tanto capaz de reconstitución hematopoyética a largo plazo. Un efecto similar de un compuesto mimético de TPO puede por lo tanto aumentar la proporción de la población de células CD34+ que pueden contribuir al injerto a largo plazo y por lo tanto reducir el riesgo de fallo del injerto. La TPO puede también aumentar el número de células madre comprometidas en el linaje megacariocítica produciendo así independencia más temprana de la transfusión de plaquetas, es decir, tiempo reducido de injerto.

Los dos efectos beneficiosos descritos anteriormente pueden ser aditivos o sinérgicos, llevando a una reducción mayor en el tiempo del injerto que puede ser visto con agentes que sólo aumentan la movilización de las células madre.

El uso de un compuesto mimético de TPO de la invención requerirá sólo un pequeño número de dosis dadas, por ejemplo, de forma intravenosa o subcutánea, antes de la aféresis. Dicho régimen de dosificación minimizará el riesgo de antigenicidad significativa, que ya se prevé que sea baja debido al uso de un producto pegilado.

El compuesto mimético de TPO de la invención se administra primero a voluntarios normales:

1. Establecer el efecto del compuesto mimético de TPO en poblaciones de células CD34+ de sangre periférica, recuentos de plaqueta y otros parámetros hematológicos;
2. Establecer el perfil de seguridad preliminar del compuesto mimético de TPO en términos de toxicidad limitante de la dosis y efectos adversos de alta frecuencia;
3. Determinar la dosis más apropiada, régimen de dosis y calendario de la dosis de la dosificación pre-aféresis con el compuesto mimético de TPO; y
4. Determinar el perfil farmacocinético del compuesto mimético de TPO en humanos.

5. Generar información comparativa preliminar en los efectos del compuesto mimético de TPO de la invención y la G-CSF en el potencial multilineaje de las células madre de la sangre periférica.

5 Los voluntarios humanos normales, que son la población más apropiada para la evaluación de las farmacocinéticas y el perfil de seguridad inicial, proporcionan la comprensión más clara de los efectos del compuesto mimético de TPO en HSCs debido a la ausencia de efectos de fondo de la quimioterapia y la enfermedad.

10 El estudio será un estudio de dosis creciente, ciego simple en el que los voluntarios humanos normales reciben una única dosis intravenosa del compuesto mimético de TPO de la invención, dado como una infusión de una hora. La dosis inicial será 15 ug/kg. Los grupos de dosis sucesivas recibirán 25, 50, 100 y 200 ug/kg. Cuatro sujetos se inscriben en cada grupo, tres de los cuales recibirán terapia activa y uno de los cuales recibirá placebo. Cada sujeto será observado a intervalos regulares (15 minutos) durante la infusión y permanecerá como paciente interno durante 24 horas para la monitorización de seguridad cercana y muestreo farmacocinético. Seguirá además paciente ambulatorio por seguridad, la evaluación farmacocinética y farmacodinámica tendrá lugar en los días 2, 4, 7, 14, 21 y 28. Cada grupo de dosis sucesivo será tratado dos semanas después del grupo anterior.

20 Cuando se alcanza una dosis a la que se observa evidencia de efecto farmacodinámico (definido como un aumento del 50% en el recuento de plaquetas en relación al valor pretratamiento) en 2/3 de los sujetos activamente tratados la dosificación en ese nivel se extenderá para incluir cuatro sujetos adicionales (3/1 activos/placebo). Si se confirma la eficacia, un grupo de dosis adicional de seis sujetos (4/2 activos/placebo) se inscribirá para proporcionar confirmación adicional del efecto farmacodinámico. Si el efecto farmacodinámico sólo se observa en la dosis planeada más alta, se considerará un aumento de dosis adicional, asumiendo que no se ha observado evidencia de toxicidad.

25 Si un suceso de seguridad/tolerabilidad que está relacionado posible o probablemente con la medicación del estudio tiene lugar en un único sujeto activamente tratado a cualquier dosis se inscribirán cuatro sujetos adicionales (3/1 activos/placebo) a esa dosis para determinar si se ha identificado una toxicidad limitante de la dosis.

30 Se tomarán muestras sanguíneas para la medición de los niveles de fármaco 30 minutos después del comienzo de la infusión, al final de la infusión y en los momentos siguientes después del final de la infusión: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 horas y 7 y 14, 21 y 28 días. Los niveles de compuesto se medirán usando o un bioensayo basado en células o por ELISA.

35 Para comparación, se administrará una única dosis de G-CSF a tres sujetos para medir los efectos en las células CD34+.

40 El efecto del compuesto mimético de TPO en los recuentos de CD34+ de sangre periférica, si hay alguno será retrasado por varios días (3-7 si el efecto es similar a la trombopoyetina). Además debido al impacto desconocido de las farmacocinéticas del compuesto mimético de TPO en el perfil PD no es seguro cuando se verá el efecto máximo de una dosis individual. Es el momento del efecto máximo el que determinará el intervalo entre la dosificación del compuesto mimético de TPO y la recolección de las células CD34+ en posteriores estudios de pacientes. Se ha demostrado una buena correlación entre los recuentos de CD34+ de sangre periférica y el rendimiento en recolecciones posteriores sugiriendo que este enfoque es razonable. Puede ser apropiado asegurar que el compuesto mimético de TPO de la invención se da antes de la G-CSF para permitir una expansión de la población de HSC dentro de la médula ósea seguido por la movilización de la población expandida. La mayoría de los estudios que usan G-CSF para estimular la movilización dan el fármaco durante cinco días con recolección establecida hacia el final del periodo de dosificación. Es posible que el perfil farmacodinámico del compuesto mimético de TPO requiera ser dosificado algunos días antes de la G-CSF.

50 El impacto del compuesto mimético de TPO en el número de HSCs auto-renovables en la población movilizada podría proporcionar un aumento en la capacidad auto-renovadora que podría llevar a un injerto exitoso con menores números de células movilizadas, mayor facilidad de realizar trasplantes en tándem y la posibilidad que el compuesto mimético de TPO podría eventualmente reemplazar al G-CSF como el agente movilizador estándar.

55 Este aspecto de la farmacología clínica del compuesto mimético de TPO puede ser abordado midiendo la capacidad auto renovadora de las poblaciones de CD34+ del estudio de voluntarios normales, tanto en estudios *in vitro* de la capacidad de mantener formación de colonias a largo plazo (el cultivo LTC-IC) como realizando ensayos de repoblación en ratones SCID/NOD en los que las células movilizadas son infundidas en ratones SCID/NOD irradiados letalmente. Los cálculos preliminares indican que realizar dichos estudios debería ser factible con las células CD34+ que están contenidas en 30-50 mls de sangre, siempre que el recuento de CD34+ se haya elevado a aproximadamente a $15 \times 10^3/\text{ml}$.

60 Los supuestos subyacentes de esta afirmación se detallan a continuación:

65

- 5 1. Los PBMCs de sujetos normales se obtendrán por separación de Ficoll/Hypaque y después las células Lin+ serán eliminadas por selección negativa. Las subfracciones de CD34+ CD38- de esta población enriquecida serán entonces aisladas por FACS y administradas a ratones SCID/NOD. Los ratones también recibirán células accesorias y factores de crecimiento para permitir el uso de números más bajos de células CD34+CD38-Lin- por ratón (Bonnet y otros, Bone, Marrow Transplantation, 23:203-209 (1999)). Alternativamente, la población original de PBMC se usará sin purificación adicional para proporcionar tanto células de repoblación como accesorias.
- 10 2. El término principal para este ensayo será la supervivencia de los ratones recipientes. Sin embargo los análisis Southern Blot serán también realizados para detectar ADN humano en los ratones recipientes. Si es posible, la detección de células progenitoras humanas será determinada por cultivos óseos a largo plazo selectivos humanos y/o citometría de flujo con MAbs específicos humanos.
- 15 3. Cada sujeto proporcionará sangre suficiente para probar cuatro dosis de células CD34+CD38--Lin- (250, 500, 1000 y 2000 células/ratón). Cada dosis de células se dará a 5 ratones. Con estos supuestos de diseño se necesitarán aproximadamente $1,9 \times 10^4$ células CD34+-CD38-Lin- de cada sujeto. Si se realizan estudios de formación de colonias in vitro adicionales se necesitarán más células.
- 20 4. Cada sujeto normal proporcionará esta muestra de sangre sólo una vez y sólo cuando el recuento de células CD34+ en la sangre periférica haya llegado a 14×10^3 /ml. La población de CD34+CD38-Lin- representa el 5-8% de la población de CD34+ (Gallacher y otros, Blood, 95:2813-2820 (2000)). Los estudios con TPO en voluntarios normales indicaron que se vieron 16×10^3 células CD34+/ml en la sangre periférica.
- 25 5. Se requerirán 30 mls de sangre de cada sujeto para producir $2,25-3,6 \times 10^4$ células.
- 30 6. No será posible realizar estos estudios en sujetos tratados con placebo debido a los bajos niveles de células CD34+ ($<3 \times 10^3$ /ml). Para la comparación, se tomarán cantidades similares de sujetos tratados con G-CSF. Se infundirán números iguales de células en los ratones.
- 35 7. La validez de estos supuestos se prueba con datos independientes. Aproximadamente 1 en 6×10^6 PBMCs es capaz de repoblar un ratón SCID/NOD (Wang y otros, Blood, 89:3919-3924 (1997)). De esta población, la población de CD34+ es 0,13-0,39% y un 5-8% de este subconjunto es CD34+CD38-Lin- (Tichelli y otros, Br. J. Hematol., 106:152-158 (1999)). Esto representa 390-1872 células de los 6×10^6 PBMCs originales. En un estudio separado la incidencia de las células repobladoras SCID/NOD en la población de CD34+CD38-Lin- se ha demostrado que es de 1 en 617 (Bhatia y otros, PNAS, 94:5320-5325 (1997)). Este número es consistente con la extrapolación a la incidencia de las células no seleccionadas.
- 40 8. Si el número de células se vuelve limitativo, el grupo de dosis de células más alta de ratones se descartará.
- Las células CD34+ tomadas de voluntarios a los que se les ha dado G-CSF serán usadas como un control para estos estudios.
- 45 El estudio de voluntarios normales propuesto proporcionará la base de datos requerida para determinar el diseño de los estudios de pacientes en términos de dosis, régimen de dosis y calendario de dosis así como evidencia farmacodinámica fuerte que predice la eficacia clínica. La siguiente fase del programa de farmacología clínica buscará reproducir los efectos observados en pacientes programados para trasplante de células madre así como proporcionar datos traslacionales que demostrarán un enlace entre los términos farmacodinámicos descritos anteriormente y los términos clínicos requeridos para aprobación regulatoria. El compuesto mimético de la presente invención es entonces administrado a pacientes con necesidad:
- 50 1. Para explorar el riesgo del perfil de beneficio del compuesto mimético de TPO en diferentes poblaciones de pacientes que son candidatos para trasplante de células madre autólogo; y
- 55 2. Para obtener evidencia preliminar del efecto probable del compuesto mimético de TPO en producción de aféresis de células madre CD34+ de sangre periférica y resultados post-injerto.
- 60 El primer estudio de pacientes será de nuevo un diseño de dosis creciente, de única dosis (asumiendo que no hay razón para dar la dosis del compuesto mimético de TPO como una dosis dividida. La dosificación del compuesto mimético de TPO será introducida en un régimen de movilización estándar, con el intervalo de dosis entre dosificación y recolección previsto del estudio de voluntarios. Se evaluarán los mismos términos farmacodinámicos en este estudio como en el estudio anterior, pero también se obtendrán datos de los rendimientos de aféresis, número de aféresis y tasas y tiempos posteriores de injerto. La dosificación se dará por un frasco de 10-20 mg de un único uso que contiene polvo liofilizado como una dosis individual por administración de bolo intravenoso antes de la aféresis y después de la reinfusión de células recolectadas. Se puede administrar un bioequivalente de dosificación subcutánea con dosificación intravenosa. Se espera que la dosis sea de entre
- 65 alrededor de 10-300 µg/kg.

Un aspecto clave de este estudio será explorar el riesgo al beneficio del compuesto mimético de TPO en diferentes poblaciones de pacientes. Un número creciente de pacientes están recibiendo terapia mieloablativa, de alta dosis con ASCT relativamente pronto en el transcurso de su enfermedad. Dichos pacientes a menudo tienen médula ósea relativamente normal y, particularmente si son jóvenes, es probable que movilicen números aceptables de células CD34+ con la consecuente alta probabilidad de injerto rápido. En esta población, el impacto potencial de un agente adicional para mejorar la movilización puede ser limitado pero podría ser manifiesto como un injerto incluso más rápido con reserva de células recolectadas para trasplante en tándem. Sin embargo, esta población, que se asemeja más estrechamente a la población normal al menos en términos de capacidad de respuesta de la médula ósea, es un importante grupo traslacional para el desarrollo del compuesto mimético de TPO.

Los pacientes que son candidatos para el ASCT después de múltiples ciclos de terapia a menudo tienen mayor dificultad para generar suficientes células CD34+ para una recolección adecuada. Consecuentemente, muchos de estos pacientes requieren programas de aféresis prolongados y una incidencia mayor del injerto retardado o fallido. Una proporción de estos pacientes no son capaces de someterse a trasplante autólogo y deben recurrir en cambio a trasplante alogénico con riesgo aumentado de complicaciones post trasplante. Es esta población en la que un agente de movilización adicional puede ser de gran beneficio.

Consecuentemente, el primer estudio de pacientes inscribirá a pacientes de ambas categorías. Los datos de los "movilizadores buenos" se usarán como un punto de referencia para determinar el impacto del compuesto mimético de TPO en los "movilizadores pobres". Se incluirá un grupo no tratado, que recibe sólo tratamiento estándar.

Los términos farmacodinámicos indicados anteriormente proporcionarán un sustituto robusto del probable beneficio clínico del compuesto mimético de TPO en el ASCT.

Los estudios definitivos se realizarán como estudios controlados por placebo, doble ciego, grupo paralelo. Una vez que haya tenido lugar la aleatorización se tomarán las decisiones clínicas sobre el trasplante de acuerdo con las reglas predefinidas y la práctica clínica aceptada.

El término principal para los estudios será el tiempo medio de injerto después de la re-infusión de las células recolectadas. El tiempo de injerto se describirá como el número de días hasta que el recuento de plaquetas se mantenga por encima de $20 \times 10^9/L$ sin apoyo de transfusión durante un periodo de 7 días.

Los términos secundarios incluirán:

1. Tiempo para el injerto de neutrófilos (definido como recuento de neutrófilos mantenido por encima de $0.5 \times 10^9/L$);
2. Tiempo para el recuento de plaquetas $>50 \times 10^9/L$ (mantenido durante 7 días sin apoyo de transfusión);
3. Proporción de pacientes con injerto de plaquetas retardado;
4. Proporción de pacientes con fallo secundario del injerto de plaquetas;
5. Proporción de pacientes que no generan la recolección mínima necesaria para el trasplante;
6. recolección de CD34+ (células CD34+/kg);
7. Número de aféresis requeridas para la recolección; y
8. Número de trasfusiones de plaquetas.

Un factor clave en el diseño del estudio será la selección de la población objetivo. Los datos publicados indican que el número de células CD34+ recolectadas es un determinante principal de las cinéticas de injerto posteriores e impactarán por lo tanto directamente en el término principal de los estudios. Las características demográficas clave que influirán en la capacidad de movilizar células CD34+ son la cantidad de pretratamiento y edad del paciente. Se deben considerar un número de cuestiones:

1. Si se selecciona una población de movilización pobre será la oportunidad más grande de detectar una mejora en las tasas de injerto pero la capacidad de la médula ósea para responder al compuesto mimético de TPO puede verse tan comprometida que no sea posible una respuesta;
2. Si se selecciona una población con alta movilización la capacidad de detectar una respuesta sobre una terapia de base puede ser limitada debido al hecho de que los números óptimos de HSCS auto renovables serán reinfundidos independientemente del compuesto mimético de TPO;

3. El efecto intrínseco del compuesto mimético de TPO de la invención para aumentar la movilización puede evitar la definición precisa de movilizadores buenos o pobres;

5 4. La capacidad de detectar el efecto en el injerto de un aumento en HSCs auto renovables puede verse sólo en pacientes en los que el números de estas células es un factor limitante en las cinéticas de injerto.

10 En base a estas cuestiones es importante que la población del estudio para estos estudios esté limitada en el número de pacientes en los extremos del intervalo de movilización. En cada extremo puede ser difícil demostrar la eficacia del compuesto. Esto se puede conseguir excluyendo algunos grupos de pacientes que tienen alta probabilidad de contribuir a los valores extremos de movilización (por ejemplo pacientes que reciben terapia de primera línea, pacientes con mielodisplasia y/o reserva baja de médula) y también asegurando que el tamaño de la muestra sea determinado por pacientes que alcancen un intervalo predefinido de tamaño de recolección de CD34+ (es decir, se reemplazará a los pacientes aleatorizados que no cumplieron estos criterios).

15 Si se sigue un diseño de este tipo, la mayoría de los pacientes que contribuirían al término principal en el grupo placebo tendrían un rendimiento de CD34+ que caería en las siguientes categorías en la proporción de 2:3:1 respectivamente:

20 **<2,0x10⁶/kg (tiempo medio para el injerto = 17 días)**

25 **2-5x10⁶/kg (tiempo medio para el injerto = 12 días)**

30 **>5x10⁶/kg (tiempo medio para el injerto = 10 días)**

35 En una población de este tipo, el tiempo medio esperado para el injerto será de 13-14 días. Si el efecto del compuesto mimético de TPO en la producción de células CD34+ fuese para alterar las proporciones de las diferentes categorías de recolección de 2:3:1 a 1:2:3, este cambio sólo resultaría en una reducción en el tiempo medio para el injerto de 1,66 días. Si un tiempo mejorado para el injerto, dentro de cada categoría causado por números aumentados de HSCs auto-renovables, se sobrepone en este de tal manera que el tiempo medio de injerto mejora por 5 días en el grupo de rendimiento más bajo (es decir, se comportan como el grupo de rendimiento medio) y 2 días en el grupo medio (es decir, se comportan como el grupo de rendimiento alto), la reducción adicional en el tiempo medio para el injerto será de 1,66 días. No se asume efecto en el tiempo para el injerto para el grupo de rendimiento alto. Colectivamente, el impacto del tratamiento con compuesto mimético de TPO en el tiempo medio para el injerto de plaquetas, para el propósito de calcular un tamaño de muestra, será de 3 días. Para permitir la oportunidad máxima para definir el beneficio clínico del compuesto mimético de TPO se debería establecer un umbral relativamente bajo para la recolección mínima requerida para permitir que la mieloablación proceda.

50 La capacidad para demostrar la eficacia del compuesto mimético de TPO en el ASCT es relativamente sencilla debido a que la observación de números aumentados de células madre CD34+ en la sangre periférica de voluntarios normales tratados con dosis individuales será suficiente. El primer estudio humano demostrará por lo tanto un efecto biológicamente relevante. Varios estudios han identificado el nivel de células CD34+ en la sangre periférica como un vaticinador importante de producción de aféresis posterior. Sin embargo el efecto de la movilización de células madre en combinación con G-CSF no será establecido hasta que se complete el primer estudio de pacientes. Será más difícil establecer que las células CD34+ movilizadas contienen números aumentados de células madre, en parte debido a que es difícil medir los niveles bajos de HSCs en pacientes sin estimular. Sin embargo como se ha informado que la G-CSF no afecta a la proporción de HSCs en la población de CD34+, puede ser posible inferir algún efecto del compuesto mimético de TPO en el número de HSCs auto renovables dentro de la población de células movilizadas por comparación con las células movilizadas con G-CSF.

60 El vaticinador más importante del éxito será la producción de aféresis. El número de células reinfundidas es un vaticinador importante del tiempo posterior al injerto. Consecuentemente la proporción de pacientes con producciones clínicamente aceptables o altas será un determinante principal de la posibilidad de impacto en el tiempo para el injerto y la proporción de pacientes con injerto retardado o fallido.

65

Se espera que el compuesto mimético de TPO sea tan bueno o superior a la G-CSF en movilizar células madre y que el compuesto mimético de TPO proporcione calidad mejorada de la población de células madre movilizadas.

5 Un estudio de ciego simple para evaluar el efecto del compuesto mimético de TPO en la movilización de células madre CD34+ de sangre periférica cuando se añadió a los regímenes de movilización estándar en pacientes programados para quimioterapia mieloablativa con trasplante de células madre autólogo.

10 Para determinar el efecto del compuesto mimético de TPO en la movilización de células madre antes de la aféresis, se realizó un estudio de dosis creciente, única dosis usando dosis que se ha probado que movilizan células CD34+ en voluntarios normales. Cada grupo de dosis contendrá seis pacientes que reciben medicación activa y dos que reciben sólo terapia de base G-CSF. Cada grupo se dividirá en dos grupos de 3 pacientes activos y 1 de placebo. Un grupo será de pacientes que reciben SCT autólogo como terapia de primera línea mientras que el otro serán pacientes pretratados fuertemente recibiendo SCT autólogo como terapia de rescate. Cuando se alcanza una
15 dosis que produce un rendimiento aumentado de células CD34+ en relación al paciente placebo (magnitud del efecto a ser definida) y a controles históricos para el efecto de la G-CSF en la movilización de células madre, se reclutarán ocho pacientes adicionales (por subgrupo) a esa dosis para solidificar la evidencia de la eficacia y para explorar términos pre y post trasplante adicionales (para incluir el número de aféresis requerido para producir 3×10^6 células/kg, la proporción de pacientes que alcanzan una recolección adecuada y el tiempo para la recuperación de neutrófilos post trasplante y la independencia de la trasfusión de plaquetas). Continuarán aumentos de dosis
20 adicionales según el programa de aleatorización original. Si un sub-grupo alcanza un mantenimiento de la eficacia o toxicidad limitativa de la dosis, el sub-grupo restante continuará en la escalada de la dosis. En el momento de la aféresis, se tomará una muestra de las células con aféresis para el estudio de la capacidad multipotencial de las células recolectadas (asumiendo que el tamaño de la recolección no sea limitativo). Después de cumplir los criterios de cribado y la recopilación de las muestras de sangre de la línea de base, el paciente recibirá una única dosis de
25 medicación de estudio dada por infusión intravenosa durante un periodo de 60 minutos. Las visitas de seguimiento tendrán lugar cada 48 horas hasta que la recolección de las células madre esté completada. La recolección de células madre se considerará fallida si 10 aféresis han fallado en producir suficientes células para el injerto exitoso (mínimo 2×10^6 /kg). El paciente continuará entonces con la quimioterapia mieloablativa, la reinfusión de células madre y continuará con los cuidados de apoyo de acuerdo con el protocolo definido para el tumor del paciente. Los
30 datos del injerto serán extraídos de los documentos fuente de acuerdo con especificaciones predefinidas.

35 Las muestras se tomarán por muestreo farmacocinético en cada visita del estudio. Los niveles del compuesto se medirán usando un ELISA.

Se cree que la administración del compuesto mimético de TPO de acuerdo con el método de la invención proporcionará un número de ventajas incluyendo, entre otras:

- 40 • Reducción en el tiempo medio de injerto de las plaquetas (definido como recuento de plaquetas $>20 \times 10^9/L$) de 3 días cuando se añaden a terapia estándar. La reducción es 1 día cuando se usan en lugar de terapia estándar.
- Reducción en la proporción de pacientes con tiempo retardado para el injerto de plaquetas del 40% al 10%.
- Aumento en la proporción de pacientes que alcanzan recuperación de plaquetas primaria (definida como pacientes que mantienen un recuento de plaquetas >50.000 durante 7 días del 60% al 85%.
- 45 • Reducción en el número de transfusiones de plaquetas requeridas (de una mediana de 5 a una mediana de 3).
- Reducción en el tiempo medio para $ANC > 0,5 \times 10^9/L$, de 1 día.
- Reducción en la proporción de pacientes que no cumplen las recolecciones de células madres mínimas ($3 \times 10^6/kg$) para el trasplante (del 35% al 5%) cuando se usa en combinación con G-CSF.
- 50 • Aumento en la producción de células CD34+ cuando se usa en combinación con G-CSF ($4 \times 10^6/kg$ frente a $1 \times 10^6/kg$).
- Reducción en el número de recolecciones requeridas para producir suficientes células para soportar el trasplante cuando se usa en combinación con G-CSF (de una mediana de 3 a una mediana de 1).

55 Terapia de dosis individual conveniente para mejorar la eficiencia del trasplante de células madre, para permitir el tratamiento más agresivo de tumores sólidos, mieloma y linfoma y para aumentar el número de candidatos para el trasplante de células madre.

60

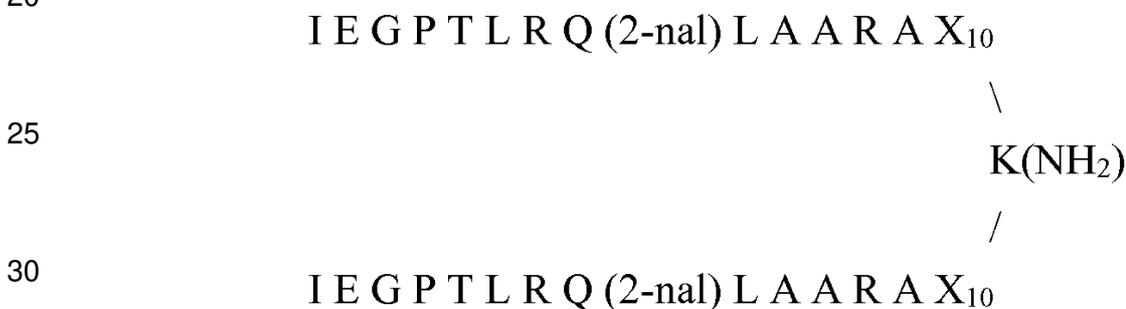
65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de

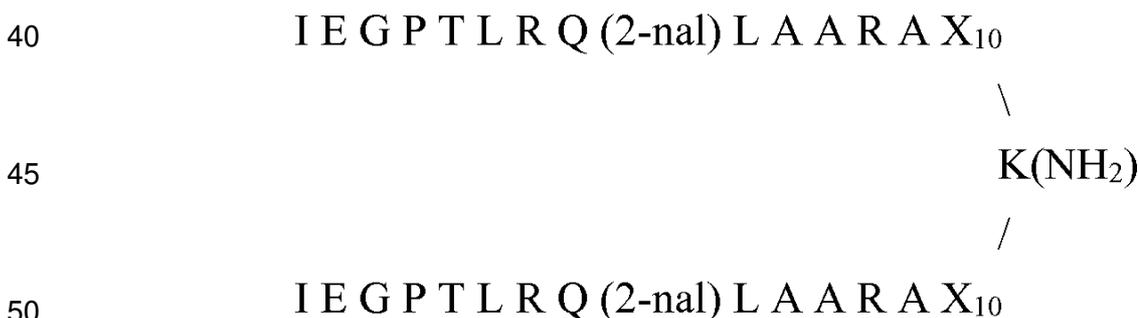
- 5 (i) proporcionar células madre hematopoyéticas a un sujeto;
 (ii) reducir el tiempo de injerto después de la reinfusión de células madre en un sujeto;
 (iii) reducir la incidencia de injerto primario retrasado;
 (iv) reducir la incidencia de fallo secundario en la producción de plaquetas; o
 10 (v) reducir el tiempo de injerto de plaquetas y/o neutrófilos después de la reinfusión de células madre en un sujeto,
 en donde el método comprende los pasos de:

- 15 administrar la composición farmacéutica a un sujeto;
 mejorar la expansión de una población de células madre dentro de la médula ósea y/o movilizar células madre en circulación periférica;
 recoger una o más de las células madre de la médula ósea o las células madre en la circulación periférica; y
 20 trasplantar las células madre recogidas en el sujeto, en donde la composición farmacéutica comprende un compuesto mimético de trombopoyetina (TPO) de estructura:



en donde X₁₀ es un residuo de sarcosina o alanina; y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 2. Una composición farmacéutica para su uso en un método para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas en un sujeto que comprende un paso de administrar la composición farmacéutica a dicho sujeto, en donde la composición farmacéutica comprende un compuesto mimético de trombopoyetina (TPO) de estructura:



en donde X₁₀ es un residuo de sarcosina o alanina; y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el compuesto mimético de TPO está pegilado.

60 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el sujeto es un humano.

5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la una o más células madre se criopreservan después de la recogida.

65 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la una o más células madre criopreservadas se descongelan y se determina que son viables antes de trasplantar las células madre al

sujeto.

5 **7.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la una o más células madre se trasplantan al sujeto cuando el sujeto necesita dicho trasplante.

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto mimético de TPO tiene inmunogenicidad reducida con respecto a uno o más de TPO recombinante humano (rhTPO) e IL-11 recombinante humano (rhIL-11).

10 **9.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto mimético de TPO tiene un perfil farmacocinético mejorado con respecto a uno o más de rhTPO y rhIL-11.

15

20

25

30

35

40

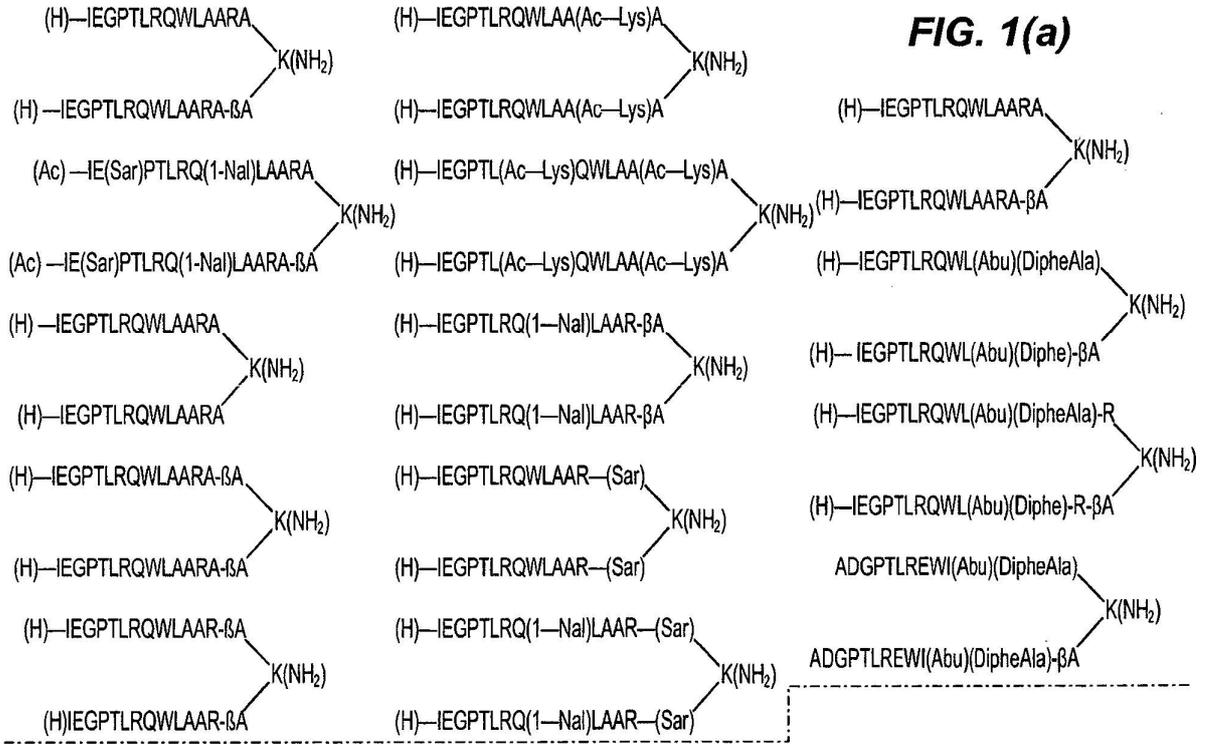
45

50

55

60

65



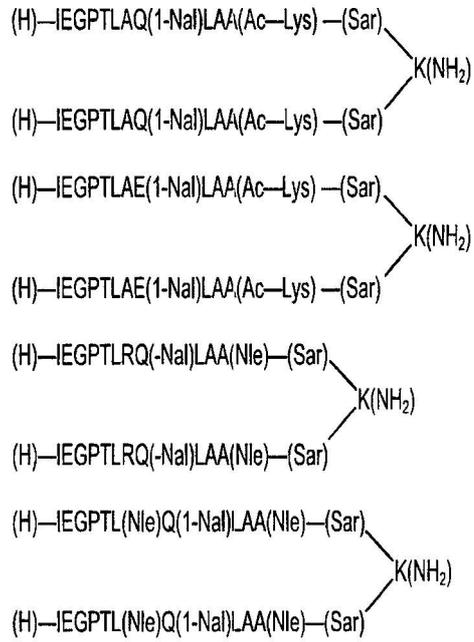


FIG. 1(c)

