



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

NOV
27

PATENTE DE INVENCION

05-34500

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

METODOS PARA AUMENTAR LA PRODUCCION DE CELULAS DE MADRE HEMATOPOYETICAS
Y PLAQUETAS.

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A 61K 38/18

71. SOLICITANTE

Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.

DOMICILIO

RARITAN, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTA, D.C.,

Abril 13-2005

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**

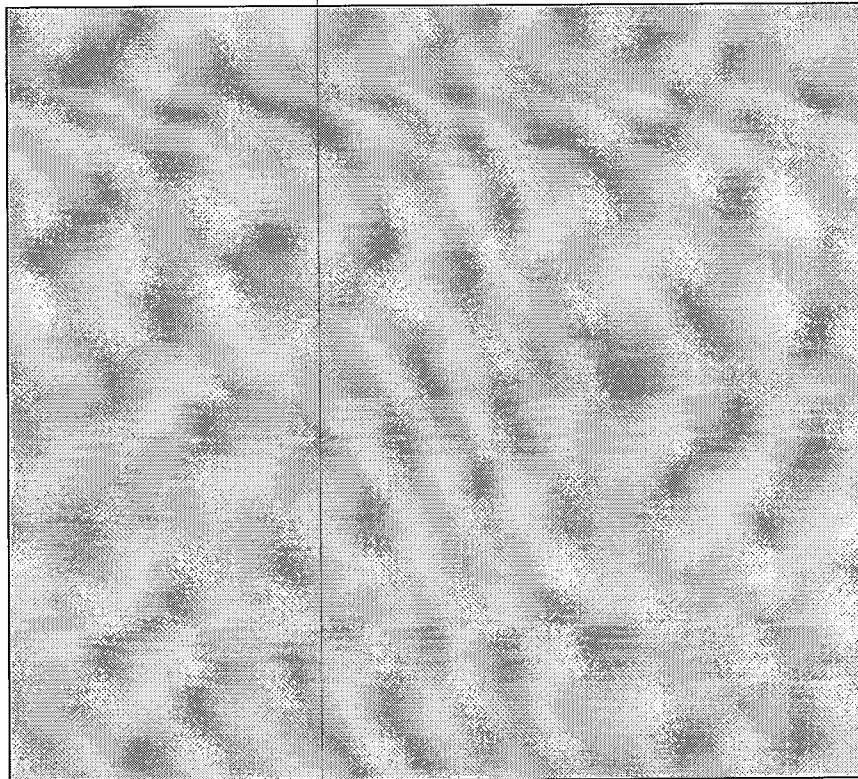
ENTRADA EN FASE NACIONAL

18-04-2005

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc. Dirección: U.S. Route 202, P.O. Box 300, Raritan, New Jersey 08869-0602, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: Raritan, New Jersey, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número	
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305) Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889 E-mail: tm-patent@escobaruribe.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 39.779.452 T.P.68.228	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: VER ANEXOS Dirección: Nacionalidad o domicilio:		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No <u>PCT/US2003/029701</u> Fecha <u>18 de septiembre de 2003</u> Publicación Internacional No <u>WO 2004/026332 A1</u> Fecha <u>1 de abril de 2004</u>			
6 TÍTULO (54) <u>MÉTODOS PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS Y PLAQUETAS.</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 38/18</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>Estados Unidos de América</u> <u>Estados Unidos de América</u>	(32) Fecha <u>18 de septiembre de 2002</u> <u>18 de septiembre de 2002</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/411,779</u> <u>60/411,700</u>
9 Comprobante de pago No. <u>05 - 21,344</u> Fecha <u>23 de marzo de 2005</u>			

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros " Inscripción de la notificación de un cambio "

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA:

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.228

2814/PCT

2814

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 21,344
FECHA : MARZO 23 DE 2005

Superintendencia de Industria y Comercio
Radicacion : 05034500 00000000
Fecha (AMD): 2005-04-13 14:15:00
Folios: 66
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

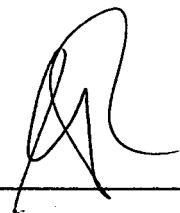
***** CONSIGNACION *****

EPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37996365	23/03/2005	6,081,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

10 EAST 46TH STREET, NUEVA YORK, N.Y. 10017
TEL. (212) 370-0004 FAX (212) 972-1725

EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA

VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS POR LOS INTERESADOS

CERTIFICA

Que el Señor (a), **ELAINE M. FLYNN**, County Clerk del Condado de Middlesex, Estado de New Jersey, certificó que **CHRISTINA A. CLICKREN**, Notario(a) Público(a) del Estado de New Jersey, Estados Unidos de América y que ejercía las funciones antes expresadas, y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos, son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

Que la notario(a) antes citada notarizó la firma de **RALPH R. PALO**, quien actúa en calidad de Secretario asistente de **ORTHO-McNEIL PHARMACEUTICAL, INC**, otorgó poder especial, amplio y suficiente a **JIMENA ESCOBER-URIBE** y/o **IGNACIO ESCOBER-URIBE**, para que lo represente en todos los actos a que haya lugar;

Que ha tenido a la vista los documentos probatorios de los hechos citados y constatados por el Notario Público y el Clerk del Estado de New Jersey, los cuales forman parte integral del presente documento.

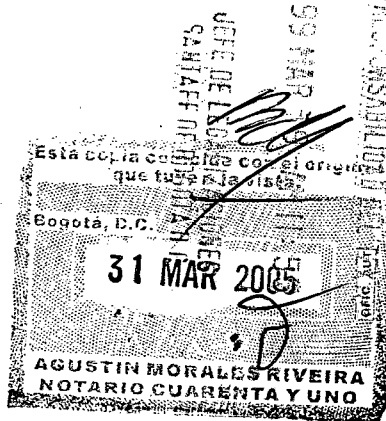
Se expide la presente certificación en cumplimiento de los artículos 259 del Código de Procedimiento Civil y 480 del Código de Comercio y a solicitud del interesado a los 19 días de Febrero de 1999.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO ADJUNTO.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES

VALOR CINCUENTA Y SIETE DOLARES US\$57.00 RECIBO No. 194622

MARTHA LYA CORDOBA R.
Cónsul



POWER OF ATTORNEY

The undersigned

acting on behalf of and representing
ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.

domiciled in

Raritan, New Jersey, United States of America

hereby appoint

JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO ESCOBAR-URIBE and/or JULIANA ESCOBAR-URIBE

domiciled in Bogota, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial ensigns and names, trademarks, copyrights and neighbouring rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3. to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial ensigns and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtentor of plant varieties rights.

To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the abovementioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal faculties, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Christina A. Clickner
CHRISTINA A. CLICKNER
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
COMMISSION EXPIRES MAR. 2, 2000

Signed at **NEW BRUNSWICK**
FEBRUARY 10, 1999

on **RALPH R. PALO, ASSISTANT SECRETARY**

DOCUMENTO DE PODER

El suscrito

obrando en nombre y representación de
ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.

con domicilio en

Raritan, Nueva Jersey, Estados Unidos de América

nombra a

JIMENA ESCOBAR-URIBE y/o IGNACIO ESCOBAR-URIBE y/o JULIANA ESCOBAR-URIBE

domiciliados en Bogotá, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y enseñanzas, registros sanitarios, así como sus trasposos, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o enseña comerciales; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas y recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtentor de variedades vegetales.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio. Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en

el

Agustín Morales Riveira
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

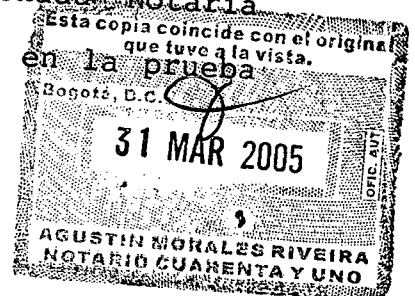
2571
6

TRADUCCION OFICIAL DEL INGLES del sello y de la autentiación de la firma de la Notaria que aparecen al pie de página del poder que la compañía ORTHO-MACNEIL PHARMACEUTICAL, INC. domiciliada en Raritan, New Jersey, Estados Unidos de América, otorga a Jimena Escobar-Uribe y/o Ignacio Escobar-Uribe y/o Juliana Escobar-Uribe.

[Sello:] CHRISTINA CLICKNER
NOTARIA PUBLICA DE NEW JERSEY
MI COMISION EXPIRA MARZO 2/2000

ESTADO DE NEW JERSEY, Condado de Middlesex

Yo, Elaine M. Flynn, Secretaria del Condado de Middlesex, certifico mediante este documento que dicha Corte es una Corte de Registro que por ley tiene sello; que Christina A. Clickner, cuyo nombre aparece suscrito al certificado o prueba de reconocimiento anexo al instrumento adjunto, era en el momento de recibir el mismo Notaria Pública actuando en y para dicho Condado y se encontraba debidamente comisionado, juramentada y calificada para actuar como tal; que dicha Notaria Pública del Estado de New Jersey estaba debidamente autorizada para tomar y certificar testimonios; para tomar juramentos y afirmaciones; para recibir declaraciones juramentadas y certificar el reconocimiento y la prueba de escrituras y otros instrumentos escritos referentes a tierras, tenencias y herencias, los cuales han de ser leídos como evidencia o registrados en este Estado; y certifico además que conozco bien la letra manuscrita de la mencionada Notaria Pública y he verificado que la firma que aparece en la prueba o reconocimiento adjunto es genuina.



En testimonio de lo cual he colocado aquí abajo mi firma y el sello oficial de la mencionada Corte, en la ciudad de New Brunswick, en el Condado de Middlesex, el día de hoy 11 de Febrero de 1999.

Elaine M. Flynn, Secretaria

(Firma y Sello Oficial)

MCN 60/COL

El documento traducido del inglés fue legalizado bajo el sello No. 223016 el día 9 de Marzo de 1999 en la Oficina de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
99 MAR 12 AM 11:32
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.

M. Méndez S.
JOSE MIGUEL MENDEZ

Traductor Oficial

Res. 911 de Mayo 1988 MINJUSTICIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
22 MAR 1999
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista.
Bogotá, D.C.
31 MAR 2005
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

ANEXOS

INVENTORES

1.)

KAUSHANSKY, Kenneth

(336 Pine Needles Drive, Del Mar, California 92014, Estados Unidos de América);

2.)

MACDONALD, Brian, R.

(280 South Roberts Road, Bryn Mawr, Pennsylvania 19010, Estados Unidos de América).

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC,
sociedad constituida de conformidad con las leyes del
estado de Delaware, Estados Unidos de América,
domiciliada en U.S. Route 202, P.O.Box 300, Raritan,
New Jersey 08869-0602, Estados Unidos de América,
el otorgamiento de Patente para la invención titulada
**"METODOS PARA AUMENTAR LA
PRODUCCION DE CELULAS MADRE
HEMATOPOYETICAS Y PLAQUETAS ”.**

Clase: A61K 38/18


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 38/18	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
Estadinsense	60/411,779	18/09/02	US
Estadinsense	60/411,700	18/09/02	US
		(72) Inventor(es) KAUSHANSKY, Kenneth // MACDONALD, Brian, R.	
		(74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE	
(85) Fecha inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: Fecha (dd/mm/aa)	
Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 18/09/03		N° publicación: WO 2004/026332 A1 de 01/04/04	
No. de solicitud PCT/US2003/029701			
(54) METODOS PARA AUMENTAR LA PRODUCCION DE CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS Y PLAQUETAS.			
Titulo:			

Reivindicación(es):

1.- Un método para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas en un sujeto, que comprende un paso de administrar un compuesto mimético de TPO a dicho sujeto.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe un método para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas; el método incluye administrar un compuesto
5 mimético de TPO a un sujeto; se describen también composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto mimético de TPO y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

15

20

MG

P05/403F

METODOS PARA AUMENTAR LA PRODUCCION DE CELULAS MADRE
HEMATOPOYETICAS Y PLAQUETAS

Esta solicitud reclama prioridad a las solicitudes Nos. 60/411,779
5 y 60/411,700, presentadas en septiembre 18 de 2002.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La trombopoyetina (TPO), clonada inicialmente como un
10 regulador importante de la producción de plaquetas, desempeña una función
primordial en la biología de células madre hematopoyéticas (HSCs). Véase
Kaushansky et al., Nature, 369: 568-571 (1994). Virtualmente, todas las HSCs
primitivas que exhiben actividad de repoblación, expresan a c-Mpl, el receptor
de TPO. Véase Solar et al., Blood, 92: 4-10 (1998). La TPO sola o en
15 combinación con otras citocinas de acción temprana, tales como factor de
células madre (SCF), interleucina 3 (IL-3) o ligando de Flt-3, intensifican la
proliferación de HSCs primitivas *in vitro*. Véase Ku et al., Blood, 87: 4544-4551
(1996); Sitnicka et al., Blood 87: 4998-5005 (1996). Estudios *in vivo* han
confirmado estas conclusiones. Véase Kimura et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
20 U.S.A., 95: 1195-1200 (1998). La importancia de la TPO en la autorrenovación
y expansión de células madre, fue apoyada también por la observación clínica
de que mutaciones del gen de c-Mpl, causaban trombocitopenia
amegacariocítica congénita, una enfermedad en la cual todos los linajes

hematopoyéticos fallan durante la niñez. Véase Ballmaier et al., Blood, 97: 139-146 (2001). Se ha encontrado que la expansión de HSCs en médula ósea de adulto, es 10 a 20 veces menos vigorosa en ratones tpo-/- después del trasplante de médula ósea. La TPO añadida exógenamente rescató este defecto. Véase Fox et al., J. Clin. Invest., 110: 389-394 (2002). Estos reportes indican que la TPO es un colaborador no redundante importante de la autorrenovación y expansión de HSCs.

El trasplante autólogo de células madre (ASCT) se usa cada vez más ampliamente como un medio para reconstituir la médula ósea después de la administración de quimioterapia a altas dosis mieloablativa potencialmente curativa. La base de esta técnica, es movilizar HSCs de la médula ósea a la sangre periférica (usando quimioterapia con cebadura de G-CSF +/-), a partir de la cual se cosechan mediante aféresis. Estas células madre, las cuales forman una minoría de la población cosechada, son entonces capaces de reconstituir la médula ósea cuando son reinfundidas después de la terapia mieloablativa. Las células madre obtenidas de sangre periférica en esta técnica parecen ser similares a las células sanguíneas del cordón umbilical, y superiores a las células de la médula ósea en su capacidad para regenerar médula ósea después de la terapia mieloablativa, con tiempo para el injerto de neutrófilos y plaquetas en menos de 10 días. Los tipos de tumores más comunes en los cuales se usa ASCT, son mieloma, linfoma (linfoma de enfermedad de Hodgkin y no de Hodgkin) y leucemia mieloide aguda. La quimioterapia con ASCT a altas dosis puede usarse cada

vez más como terapia de primera línea, en particular en mieloma, pero se usa también como terapia de salvataje después de la falla de la quimioterapia de primera línea. Dichos sujetos con frecuencia se han pretratado intensamente, y de esta manera tienen médula ósea con potencial hematopoyético
5 deteriorado.

Después de la reinfusión de estas células cosechadas en el sujeto, existe un período durante el cual el sujeto, por ejemplo, un paciente humano, está en riesgo de infección (bajo contenido de neutrófilos) y hemorragia (bajo contenido de plaquetas). Este período varía, dependiendo
10 del número de células madre reinfundidas, que a su vez depende de la capacidad para estimular la expansión de células madre de la médula ósea. Además, algunos sujetos desarrollan también falla de médula ósea después de un período de injerto inicial.

El trasplante de células madre se usa también en un ambiente
15 alogénico cuando se movilizan y cosechan células madre de sangre periférica de donadores comparados en HLA. Dichos trasplantes alogénicos se usan con menos frecuencia que el ASCT debido a la incidencia de enfermedad de injerto contra hospedero, pero pueden usarse cuando no sea posible obtener células madre suficientes del paciente. Sin embargo, el uso de células madre
20 alogénicas para obtener injerto parcial en ausencia de mieloablación completa (el "minitrasplante"), puede ofrecer también cierto beneficio terapéutico debido a un efecto de injerto contra tumor. Otro uso posible, actualmente en un número extremadamente pequeño de pacientes, es en el campo de la terapia

génica, en donde células de médula ósea alogénicas normales o células autólogas transducidas con una copia normal de un gen defectuoso, pueden curar alguna enfermedad heredada causada por defectos de un solo gen. Los trasplantes alogénicos están también bajo investigación como una opción
5 terapéutica para enfermedad autoinmunes.

A pesar de la utilidad potencial y simplicidad del ASCT, existen limitaciones significativas para su uso generalizado más allá del período esperado de pancitopenia, para el cual se requiere soporte intensivo del sujeto para permitir que las células reinfundidas vuelvan a asumir niveles de
10 hematopoyesis suficiente para mantener los conteos de sangre periférica. Una proporción significativa (hasta 40%) de los sujetos trasplantados requiere transfusiones prolongadas de plaquetas después del trasplante (falla primaria del injerto). Un grupo más pequeño (5-10% en trasplante autólogo, pero mayor de 20% con trasplante alogénico), desarrolla trombocitopenia
15 secundaria a pesar del injerto inicial, requiriendo a veces transfusiones prolongadas. La falla del injerto o el injerto retardado se asocia con mortalidad incrementada, costos incrementados de cuidado a la salud, y calidad de vida disminuida del sujeto.

De esta manera, existe la necesidad de aumentar la producción
20 de HSCs en dichos sujetos. Los estudios han demostrado que la administración de TPO a pacientes, da como resultado la movilización de células progenitoras de sangre periférica. Un estudio demostró la movilización de células formadoras de colonias a partir de linajes múltiples y células CD34+

en la sangre periférica, después de la administración de dosis múltiples de TPO en combinación con G-CSF. Otro estudio identificó un incremento 6 veces mayor en células CD34+ circulantes 3 a 7 días después de la administración de una sola dosis de TPO en pacientes cancerosos con hematopoyesis de otra manera normal. En este estudio, una subfracción enriquecida en células madre (CD34+Thy+Lin-) fue incrementada casi 9 veces más, y la subfracción megacariocítica comprometida (CD34+CD41+CD14-) fue incrementada casi 15 veces más. Este estudio sugiere que la TPO es capaz de movilizar HSCs autorrenovables y células hijas comprometidas de la médula ósea. Aunque se ha mostrado que la disponibilidad de TPO recombinante (rhTPO) promete aumentar la producción de HSCs, existe la necesidad de una mejora en la terapia con TPO mediante el modo de suministro de fármacos.

De esta manera, existe la necesidad de compuestos miméticos de molécula pequeña de TPO que retengan sustancialmente la actividad agonista completa de la TPO, mientras al mismo tiempo permitan varios modos de administración.

Existe también la necesidad de compuestos miméticos de molécula pequeña de TPO que tengan inmunogenicidad reducida respecto a una o más de rhTPO y rhIL-11, así como un perfil farmacocinético mejorado respecto a una o más de rhTPO y rhIL-11.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a un método para aumentar la producción de HSCs en un sujeto, el cual comprende un paso de
5 administrar un compuesto mimético de TPO al sujeto. El compuesto mimético de TPO puede administrarse al sujeto solo o en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto mimético de TPO puede usarse solo, o puede combinarse con uno o más compuestos miméticos de TPO adicionales y/u otros agentes que puedan intensificar la movilización de
10 células madre de la médula ósea incluyendo, por ejemplo, G-CSF, SCF, IL-3 y/o Flt-3.

La presente invención está dirigida también de esta manera a una composición farmacéutica mimética de TPO que comprenda una cantidad efectiva de un compuesto mimético de TPO y un vehículo farmacéuticamente
15 aceptable. Una cantidad efectiva de un compuesto mimético de TPO está presente cuando tras la administración, el compuesto mimético de TPO intensifica la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea de un sujeto, y/o moviliza las células madre en la circulación periférica de un sujeto.

20 La presente invención está dirigida también a un método para proveer HSCs a un sujeto. El método puede incluir los pasos de administrar un compuesto mimético de TPO al sujeto para intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea, y/o para movilizar las

células madre en la circulación periférica. Después, el método puede incluir cosechar una o más células madre de la médula ósea o de la circulación periférica del sujeto, y trasplantar entonces las una o más células madre cosechadas en el sujeto.

- 5 La presente invención está dirigida también a un método para proveer HSCs de un sujeto donador a un sujeto receptor.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

- 10 La figura 1 es un esquema que representa la regulación de la producción de plaquetas y HSCs de conformidad con el método de la presente invención.

La figura 2 es un listado de compuestos que pueden ser adecuados para su uso en el método de la presente invención.

15

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Las porciones relevantes de la literatura y las publicaciones de patente citadas en la presente, se incorporan en la presente como referencia.

- 20 En una modalidad, la presente invención está dirigida a aumentar la producción de HSCs administrando a un sujeto un péptido de TPO, un compuesto mimético de TPO incluyendo, pero no limitado a, los compuestos expuestos en la figura 2, y formas PEGiladas de los compuestos

expuestos en la figura 2. La metodología que puede usarse para la PEGilación de los compuestos expuestos en la figura 2, se describe en la patente de E.U.A. No. 5,869,451.

En una modalidad, la presente invención está dirigida a

5 aumentar la producción de HSCs, administrando a un sujeto un péptido de TPO, como se describe en la solicitud de E.U.A. correspondiente número de serie ? (caso de apoderado No. 038073-5005 PR), presentada en agosto 28 de 2003, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia. De conformidad con esta modalidad, el péptido de TPO es un

10 compuesto que tiene (1) un peso molecular menor de aproximadamente 5000 daltons, y (2) una afinidad de unión al receptor de TPO expresada por una IC_{50} no mayor de aproximadamente 100 μM , en donde de cero a todos los enlaces de $-C(O)NH-$ de los péptidos han sido reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste del enlace de $-CH_2OC(O)NR-$; un enlace

15 de fosfonato; un enlace de $-CH_2S(O)_2NR-$; un enlace de CH_2NR- ; un enlace de $C(O)NR^6$; y un enlace de $-NHC(O)NH-$, en donde R es hidrógeno o alquilo inferior, y R^6 es alquilo inferior, en donde además el N-terminal de dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de un grupo $-NRR^1$; un grupo $-NRC(O)OR$; un grupo $-NRS(O)_2R$; un grupo $-NHC(O)NHR$; un grupo

20 succinimida; un grupo benciloxycarbonil-NH y un grupo benciloxycarbonil-NH que tiene de 1 a 3 sustituyentes en el anillo de fenilo seleccionados del grupo que consiste de alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro y bromo, en donde R y R^1 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y

alquilo inferior, y más aún cuando el C-terminal del compuesto tiene la fórmula $-C(O)R^2$, en donde R^2 se selecciona del grupo que consiste de hidroxilo, alcoxi inferior y $-NR^3R^4$, en donde R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo inferior, y en donde el átomo de

5 nitrógeno del grupo $-NR^3R^4$ puede ser opcionalmente el grupo amina del N-terminal del péptido para formar un péptido cíclico, y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

En una modalidad relacionada, el péptido mimético de TPO comprende una secuencia de aminoácidos $X_9X_8GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, en donde

10 X_9 es A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T o V; y X_8 es A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T ^{X_8, X_9 cualquier aa.} o V; y X_6 es un residuo de β -(2-naftil)alanina (referido en la presente como "2-Nal"). Más preferiblemente, X_9 es A o I, y X_8 es D, E o K. Además, X_1 es C, L, ^{X_1 aa neutros.} M, P, Q o V; X_2 es F, K, L, N, Q, R, S, T o V; X_3 es C, F, I, L, M, R, S, V o W; ^{X_3 neutros.} X_4 es cualquiera de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente; X_5 es A, ^{X_5 cualquiera.} X_4 cualquiera. ^{X_7 ~ básicos.} D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V o Y; y X_7 es C, G, I, K, L, M, N, R o V.

15

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

En otra modalidad, el péptido mimético de TPO es dimerizado u oligomerizado para aumentar la afinidad y/o actividad del compuesto. Un

20 ejemplo de dicho compuesto incluye:

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

\

K(NH₂)

/

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

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

Uno o más péptidos miméticos de TPO, y en particular péptidos
10 miméticos de TPO PEGilados (referidos en conjunto en la presente como “compuestos miméticos de TPO” o “compuestos miméticos de TPO de la invención”), pueden usarse para aumentar el número de células madre en la médula ósea. Datos importantes que apoyan el uso de un compuesto mimético de TPO en ASCT, son provistos por un estudio realizado por Somlo
15 et al., Blood, 93(9): 2798-2806 (1999), en el cual trombopoyetina humana recombinante (rhTPO) fue capaz de intensificar la movilización y el rendimiento de aféresis de células madre CD34+ en respuesta a G-CSF con reducción consecuente en el número de aféresis. Después, el injerto de células reinfundidas mejoró también en términos de tiempo reducido para
20 ANC>0.5 x 10⁹/L e independencia de la transfusión de plaquetas, aunque este efecto no alcanzó significancia estadística en el tamaño de muestra pequeño usado en este estudio piloto. Mediante el aumento del número de células madre, la cosecha total de células madre del sujeto puede mejorar

significativamente. Además, mediante el aumento del número de células madre cosechadas del sujeto, el número de células madre disponible para trasplante de nuevo en el sujeto puede mejorarse también en forma significativa, reduciendo potencialmente de esta manera el tiempo al injerto (el tiempo durante el cual el sujeto tiene neutrófilos y plaquetas insuficientes), previniendo de esta manera complicaciones.

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

Compuestos miméticos de TPO tales como los de la figura 2 y descritos en la presente, pueden usarse para aumentar la producción de HSCs. Esto se logra administrando uno o más de los compuestos a un sujeto. Los compuestos expuestos en la figura 2 y descritos en la presente, así como las formas PEGiladas de los compuestos expuestos en la figura 2, pueden tener inmunogenicidad reducida respecto a una o más de rhTPO y rhIL-11, y pueden tener también un perfil farmacocinético mejorado respecto a una o más de rhTPO y rhIL-11.

Pueden usarse también compuestos miméticos de TPO para proveer HSCs autólogas a un sujeto. Típicamente, esto incluye los pasos de administrar un compuesto mimético de TPO a un sujeto que necesita del

mismo para intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea, y/o para movilizar las células madre en la circulación periférica; cosechar una o más de las células madre de médula ósea o una o más de las células madre en la circulación periférica; y trasplantar las una o
5 más células madre cosechadas de nuevo en el sujeto.

Además, las células madre obtenidas de la cosecha de conformidad con el método de la presente invención descrito anteriormente, pueden criopreservarse usando técnicas conocidas en la materia para criopreservación de células madre. Por consiguiente, mediante el uso de
10 criopreservación, las células madre pueden mantenerse de modo que una vez que se determina que un sujeto necesita trasplante de células madre, las células madre pueden descongelarse y trasplantarse de nuevo en el sujeto.

Los compuestos miméticos de TPO, incluyendo los compuestos expuestos en la figura 2 y descritos en la presente, así como las formas
15 PEGiladas de los compuestos expuestos en la figura 2, pueden usarse de esta manera para, entre otras cosas, reducir el tiempo al injerto después de la reinfusión de células madre en un sujeto; reducir la incidencia de injerto primario retardado; reducir la incidencia de falla secundaria de la producción de plaquetas; y reducir el tiempo de injerto de plaquetas y/o neutrófilos
20 después de la reinfusión de células madre en un sujeto. Estos métodos incluyen típicamente los pasos de administrar un compuesto mimético de TPO a un sujeto que necesita del mismo, para intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea y/o para movilizar las

células madre en la circulación periférica, y entonces cosechar una o más de las células madre de médula ósea o las células madre en la circulación periférica, y trasplantar entonces las células madre cosechadas de nuevo en el sujeto en el momento adecuado, según se determina por las necesidades
5 particulares del sujeto.

El método de la invención puede usarse también para aumentar el número de células madre de un sujeto donador cuyas células se usan entonces para el rescate de un sujeto receptor que ha recibido quimioterapia de ablación de médula ósea.

10

A. Formas de dosificación y vías de administración

Los compuestos miméticos de TPO útiles para la presente invención pueden administrarse como composiciones farmacéuticas que comprenden, como un ingrediente activo, por lo menos uno de los péptidos o
15 péptidos miméticos expuestos en la figura 2 y/o descritos en la presente, y/o descritos en la patente de E.U.A. No. 5,869,451, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia, en asociación con un vehículo o diluyente farmacéutico. Los compuestos pueden administrarse mediante
inyección oral, pulmonar o parenteral (intramuscular, intraperitoneal,
20 intravenosa (IV) o subcutánea), por inhalación (mediante una formulación de polvo fino), o mediante vías de administración transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual, y pueden formularse en formas de dosificación adecuadas para cada vía de administración. Véase, por ejemplo, Bernstein et al.,

publicación de patente del PCT No. WO 93/25221; Pitt, et al., publicación de patente del PCT No. WO 94/17784; y Pitt, et al., solicitud de patente europea 613,683, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral

5 incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con por lo menos un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable, tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación pueden comprender también, como es

la práctica normal, otras sustancias diferentes de diluyentes inertes, por

10 ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes reguladores de pH. Las tabletas y píldoras pueden prepararse además con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral

15 incluyen jarabes, suspensiones, soluciones y emulsiones farmacéuticamente aceptables, y los elixires contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua. Además de dichos diluyentes inertes, las composiciones pueden incluir también adyuvantes, tales como agentes mojantes, agentes emulsificantes y de suspensión, y agentes edulcorantes,

20 saborizantes y de perfume.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones o soluciones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de solventes o vehículos no acuosos son propilenglicol,

polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Dichas formas de dosificación pueden contener también adyuvantes tales como agentes conservadores, mojantes, emulsificantes y de dispersión. Pueden
5 esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, incorporando agentes de esterilización en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. Pueden fabricarse también usando agua estéril o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso.

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

15 Las composiciones de la invención pueden microencapsularse también mediante, 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).

20 La composición puede combinarse también con, entre otros, G-CSF, SCF, IL-3 o Flt-3 y/u otros agentes que puedan intensificar la movilización de células madre de la médula ósea (incluyendo quimioterapia con cebadura y antagonistas de integrina).

B. Cantidad de dosificación

Las cantidades de un compuesto mimético de TPO necesarias para la presente invención dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del sujeto y otros medicamentos administrados. De esta manera, las dosificaciones de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. Típicamente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proveer una guía útil en las cantidades usadas para la administración *in situ* de estos reactivos. La realización de pruebas de dosis efectivas en animales para el tratamiento de trastornos particulares, proveerá más indicación predictiva de la dosificación en humanos. Varias consideraciones se describen, por ejemplo, en Gilman, et al. (eds), Goodman y Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8a. ed., Pergamon Press (1990); y Remington's Pharmaceutical Sciences, 7a. ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1985); cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia.

Los compuestos miméticos de TPO son útiles para la presente invención cuando se administran a una escala de dosificación de alrededor de 0.001 mg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día. En forma alternativa, en algunos casos pueden administrarse también de 0.0001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. La dosis específica usada es regulada por la condición particular que se esté tratando, la vía de administración, así como por el juicio del médico clínico tratante, dependiendo de factores tales 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, un sujeto incluye cualquiera que sea un candidato para trasplante autólogo de células madre o médula ósea durante el curso de tratamiento para enfermedad maligna, o como un
5 componente de terapia génica. Otros candidatos posibles son sujetos que donen células madre o médula ósea a sujetos para trasplante alogénico para enfermedad maligna o terapia génica.

Para proveer una probabilidad de injerto aceptable, debe cosecharse un número mínimo de células madre. Aunque no definido con
10 precisión, se acepta en general que deben cosecharse $2-3 \times 10^6$ células CD34+ por kg para proveer una oportunidad de injerto razonable. La reinfusión de 5×10^6 células/kg parece producir resultados óptimos en términos de tiempo al injerto. Este gran número de células se requiere debido a que el número real del subconjunto específico de células CD34+ que son
15 capaces de reconstitución de médula ósea a largo plazo, es muy pequeño. Se considera que tanto como 20% de los pacientes trasplantados son malos movilizadores, requiriendo aféresis múltiples para generar células suficientes. Aunque uno de los predictores más importantes de mala movilización de células madre es la edad del paciente, el tratamiento intensivo con
20 quimioterapia es también un factor significativo. Existe probablemente un gran número de pacientes, en particular pacientes de edad avanzada con mieloma con NHL, quienes no son considerados para ASCT, debido a la baja probabilidad de injerto exitoso.

Por consiguiente, el método de la invención provee una solución a la necesidad no cubierta en ASCT, es decir, la necesidad de mejorar la proporción de pacientes que tienen injerto exitoso y rápido. Esto se logra principalmente debido a la mejora en la movilización de células madre, ya sea
5 aumentando los números de células movilizadas, o aumentando la proporción de HSCs en la población de células CD34+ movilizadas. El método de la invención provee de esta manera los siguientes beneficios:

1. Permite que proceda el trasplante en pacientes quienes de otra manera no serían considerados como candidatos debido al riesgo
10 inaceptablemente alto de injerto fallido;

2. Reduce el número de aféresis requeridas para generar una cosecha mínima aceptable;

3. Reduce la incidencia de falla de injerto primaria y secundaria, aumentando el número de HSCs disponibles para trasplante; y

15 4. Reduce el tiempo requerido para el injerto primario, aumentando el número de precursores comprometidos de los linajes hematopoyéticos importantes.

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

- Mejora de los rendimientos de aféresis: numerosos estudios han sugerido que el número de células madre CD34+ reinfundidas, es un factor importante para determinar el tiempo al injerto. Como se demostró con

la TPO, la adición de un compuesto mimético de TPO puede aumentar la movilización de células CD34+ como un adyuvante a los regímenes de movilización convencionales de G-CSF y quimioterapia. El beneficio principal sería mejorar la perspectiva para el injerto a largo plazo rápido y subsecuente.

- 5 La reducción del número de aféresis requeridas para generar un número aceptable de células, reduciría el costo y la inconveniencia para el paciente. La mejora en los rendimientos de aféresis sería de beneficio particular en pacientes con factores de riesgo para baja movilización (edad y pretratamiento intenso). Dichos pacientes no pueden ser de otra manera candidatos para
- 10 ASCT.

- Mejora del potencial de injerto de células infundidas por aféresis: el injerto a largo plazo después de la terapia mieloablativa, es producido por una pequeña fracción de la población de células CD34+ (más probablemente dentro de la población de células CD34+CD38-Lin-). Debido a
- 15 que son muy raras, se requieren grandes números de células CD34+ para proveer un injerto efectivo ($2-5 \times 10^6/\text{kg}$). El G-CSF no afecta las proporciones de los subtipos diferentes de células CD34+, y se usa simplemente como un agente que puede aumentar el número de estas células en sangre periférica antes de la cosecha. La quimioterapia con cebadura puede ser realmente
- 20 tóxica para dichas células. Sin embargo, la TPO se reconoce cada vez más ampliamente como un agente que puede aumentar la autorrenovación de la mayoría de las células madre, y de esta manera capaz de reconstitución hematopoyética a largo plazo. Un efecto similar de un compuesto mimético de

TPO puede aumentar por lo tanto la proporción de la población de células CD34+ que pueden favorecer el injerto a largo plazo, y reducir de esta manera el riesgo de falla del injerto. La TPO puede aumentar también los números de células madre comprometidas al linaje megacariocítico, produciendo de esta
5 manera independencia más temprana de la transfusión de plaquetas, es decir, tiempo reducido al injerto.

Los dos efectos benéficos descritos anteriormente pueden ser aditivos o sinérgicos, llevando a mayor reducción en el tiempo al injerto del que podría verse con agentes que sólo aumentan la movilización de las
10 células madre.

El uso de un compuesto mimético de TPO de la invención probablemente sólo requeriría un pequeño número de dosis administradas, por ejemplo, intravenosamente o subcutáneamente, antes de la aféresis. Dicho régimen de dosificación reduciría al mínimo el riesgo de antigenicidad
15 significativa, la cual se predice ya es baja debido al uso de un producto PEGilado.

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

1. Para establecer el efecto del compuesto mimético de TPO
20 sobre poblaciones de células CD34+ de sangre periférica, conteo de plaquetas y otros parámetros hematológicos;

2. Para establecer el perfil de seguridad preliminar del compuesto mimético de TPO en términos de toxicidad limitativa de la dosis y

eventos adversos de alta frecuencia;

3. Para determinar la dosis, el régimen de dosis y la regulación de la dosis de la dosificación de preaféresis más adecuados con el compuesto mimético de TPO; y

5 4. Para determinar el perfil farmacocinético del compuesto mimético de TPO en humanos.

5. Para generar información comparativa preliminar sobre los efectos de un compuesto mimético de TPO de la invención y el G-CSF sobre el potencial de linajes múltiples de las células madre de sangre periférica.

10 Voluntarios humanos normales, que son la población más adecuada para la evaluación de la farmacocinética y el perfil de seguridad inicial, proveen el entendimiento más claro de los efectos del compuesto mimético de TPO sobre las HSCs, debido a la ausencia de los efectos de fondo de la quimioterapia y la enfermedad.

15 El estudio sería un estudio de un solo ciego de aumento de la dosis, en el cual voluntarios humanos normales reciben una sola dosis intravenosa del compuesto mimético de TPO de la invención, dado como una infusión horaria. La dosis de partida será de 15 ug/kg. Los grupos de dosis sucesivas recibirán 25, 50, 100 y 200 ug/kg. Cuatro sujetos serán enrolados
20 en cada grupo, tres de los cuales recibirán terapia activa, y uno que recibirá placebo. Cada sujeto será observado a intervalos regulares (15 minutos) durante la infusión, y continuará siendo un paciente interno por 24 horas para monitoreo de seguridad y muestreo farmacocinético estrechos. Más

tratamiento complementario de los pacientes externos para evaluación de seguridad, farmacocinética y farmacodinámica, ocurrirá en los días 2, 4, 7, 14, 21 y 28. Cada grupo de dosis sucesivas será tratado dos semanas después del grupo previo.

5 Cuando se alcanza una dosis a la cual se observa evidencia de efecto farmacodinámico (definido como un incremento de 50% en el conteo de plaquetas respecto al valor de pretratamiento) en 2/3 de los sujetos tratados activamente, la dosificación a ese nivel se extenderá para incluir otros cuatro sujetos (3/1 terapia activa/placebo). Si se confirma la eficacia, un grupo de
10 dosis adicional de seis sujetos (4/2 terapia activa/placebo) será enrolado para proveer más confirmación del efecto farmacodinámico. Si el efecto farmacodinámico se observa sólo a la dosis planeada más alta, se considerará un incremento de dosis adicional, suponiendo que no se ha observado evidencia de toxicidad.

15 Si un evento de seguridad/tolerabilidad que se relaciona posiblemente o probablemente con la medicación de estudio ocurre en un solo sujeto tratado activamente a cualquier dosis, otros cuatro sujetos (3/1 terapia activa/placebo) serán enrolados a esa dosis para determinar si se ha identificado una toxicidad limitativa de la dosis.

20 Se tomarán muestras de sangre para la medición de los niveles de fármaco 30 minutos después de haber iniciado la infusión, al final de la infusión y en las siguientes ocasiones 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. Se medirán los niveles de compuesto usando un bioensayo basado en células o mediante ELISA.

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

5 El efecto del compuesto mimético de TPO sobre el conteo de células CD34+ de sangre periférica, si es que existe alguno, será retardado por varios días (3 a 7 si el efecto es similar a la trombopoyetina). Además, debido al impacto desconocido de la farmacocinética del compuesto mimético de TPO sobre el perfil de PD, no se sabe cuándo se verá el efecto máximo de
10 una sola dosis. Es la regulación del efecto máximo, lo que determinará el intervalo entre la dosificación del compuesto mimético de TPO y la cosecha de células CD34+ en estudios subsecuentes en pacientes. Se ha demostrado una buena correlación entre el conteo de células CD34+ de sangre periférica y el rendimiento en la cosecha subsecuente, sugiriendo que este procedimiento
15 es razonable. Puede ser adecuado asegurar que el compuesto mimético de TPO de la invención se administre antes del G-CSF para permitir una expansión de la población de HSCs dentro de la médula ósea, seguida de movilización de la población expandida. La mayoría de los estudios que usan G-CSF para estimular la movilización, le dan al fármaco cinco días con la
20 cosecha iniciada hacia el final del período de dosificación. Es posible que el perfil farmacodinámico del compuesto mimético de TPO requiera que sea dosificado algunos días antes del G-CSF.

El impacto del compuesto mimético de TPO sobre el número de

HSCs autorrenovables en la población movilizada, podría proveer un incremento en la capacidad de autorrenovación que llevaría a un injerto exitoso con menores números de células movilizadas, mayor facilidad para llevar a cabo trasplantes en tándem, y la posibilidad de que el compuesto
5 mimético de TPO pudiera reemplazar finalmente al G-CSF como el agente de movilización estándar.

Este aspecto de la farmacología clínica del compuesto mimético de TPO puede destacarse midiendo la capacidad de autorrenovación de las poblaciones de células CD34+ a partir del estudio en voluntarios normales,
10 tanto en estudios *in vitro* de la capacidad para sustentar la formación de colonias a largo plazo (el cultivo de LTC-IC), como llevando a cabo pruebas de repoblación en ratones SCID/NOD en las cuales las células movilizadas son infundidas en ratones SCID/NOD irradiados letalmente. Los cálculos preliminares indican que la realización de dichos estudios debe ser factible
15 con las células CD34+ que están contenidas en 30 a 50 ml de sangre, siempre que el conteo de células CD34+ se haya elevado hasta aproximadamente $15 \times 10^3/\text{ml}$.

Se esbozan a continuación las hipótesis que sustentan esta afirmación:

20 1. Se obtendrán PBMCs de sujetos normales mediante separación con Ficoll/Hypaque, y entonces se removerán células Lin+ mediante selección negativa. Subfracciones de células CD34+CD38- de esta población enriquecida se aislarán entonces mediante FACS, y se

administrarán a ratones SCID/NOD. Los ratones recibirán también células accesorias y factores de crecimiento que permitan el uso de menores números de células CD34+CD38-Lin- por ratón (Bonnet et al., Bone, Marrow Trasplantation, 23: 203-209 (1999)). En forma alternativa, la población de
5 PBMCs original se usará sin más purificación para proveer células accesorias y útiles para repoblación.

2. El punto final primario de esta prueba, será la supervivencia de los ratones receptores. Sin embargo, se llevarán a cabo también análisis Southern Blot para detectar ADN humano en los ratones receptores. Si es
10 posible, se determinará la detección de células progenitoras humanas mediante cultivos de médula a largo plazo selectivos de humano y/o citometría de flujo con MAbs específicos de humano.

3. Cada sujeto proveerá suficiente sangre para poner a prueba cuatro dosis de células CD34+CD38-Lin- (250, 500, 1000 y 2000
15 células/ratón). Cada dosis de células se dará a cinco ratones. Con estas hipótesis de diseño, se necesitarán aproximadamente 1.9×10^4 células CD34+CD38-Lin- de cada sujeto. Si se llevan a cabo otros estudios de formación de colonias *in vitro*, se necesitarán más células.

4. Cada sujeto normal proveerá esta muestra de sangre sólo una
20 vez, y sólo cuando el conteo de células CD34+ en sangre periférica haya alcanzado $15 \times 10^3/\text{ml}$. La población de células CD34+CD38-Lin- representa 5 a 8% de la población de células CD34+ (Gallacher et al., Blood, 95: 2813-2820 (2000)). Los estudios con TPO en voluntarios normales, indicaron que se

observaron 16×10^3 células CD34+/ml en la sangre periférica.

5. Se requerirán 30 ml de sangre de cada sujeto para dar $2.25 - 3.6 \times 10^4$ células.

6. No será posible llevar a cabo estos estudios en sujetos
5 tratados con placebo, debido a bajos niveles de células CD34+ ($< 3 \times 10^3$ /ml). Para comparación, se tomarán cantidades similares de células de sujetos tratados con G-CSF. Se infundirán números iguales de células en los ratones.

7. La validez de estas hipótesis se pone a prueba con datos
independientes. Aproximadamente 1 en 6×10^6 PBMCs es capaz de repoblar
10 un ratón SCID/NOD (Wang et al., Blood, 89: 3919-3924 (1997)). De esta población, la población de células CD34+ es 0.13-0.39%, y 5-8% de este subgrupo son células CD34+CD38-Lin- (Tichelli et al., Br. J. Hematol., 106: 152-158 (1999)). Esto representa 390-1872 células de los 6×10^6 PBMCs originales. En un estudio separado, se ha demostrado que la incidencia de
15 células que vuelven a poblar ratones SCID/NOD en la población de células CD34+CD38-Lin-, es de 1 en 617 (Bhatia et al., PNAS, 94: 5320-5325 (1997)). Esta cifra es consistente con la extrapolación a la incidencia en células no seleccionadas.

8. Si el número de células llega a ser limitativo, se excluirá el
20 grupo de ratones con dosis de células más alta.

Las células CD34+ tomadas de voluntarios a quienes se les da G-CSF, se usarán como un control para estos estudios.

El estudio propuesto con voluntarios normales proveerá la base

de datos requerida para determinar el diseño de estudios en pacientes en términos de dosis, régimen de la dosis y regulación de la 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 proveer datos de traducción que demuestren un vínculo entre los puntos finales farmacodinámicos descritos anteriormente y los puntos finales clínicos requeridos para la aprobación regulatoria. El compuesto mimético de la presente invención se administra entonces a pacientes que necesitan:

1. Explorar el riesgo para el perfil de beneficio que tiene el compuesto mimético de TPO en diferentes poblaciones de pacientes que son candidatos para trasplante autólogo de células madre; y
2. Obtener evidencia preliminar del efecto probable del compuesto mimético de TPO sobre los rendimientos de aféresis de células madre CD34+ de sangre periférica y los resultados del post-injerto.

El primer estudio en pacientes será de nuevo un diseño de una sola dosis con aumento de la dosis (asumiendo que no exista razón para dar la dosis del compuesto mimético de TPO como una dosis dividida). La dosificación del compuesto mimético de TPO se introducirá en un régimen de movilización estándar, con el intervalo de dosis entre la dosificación y la cosecha predicho a partir del estudio en voluntarios. Los mismos puntos finales farmacodinámicos se evaluarán en este estudio como en el estudio previo, pero se obtendrán también datos sobre el rendimiento de aféresis,

número de aféresis e índices y tiempos subsecuentes de injerto. La dosificación se administrará mediante un frasco de 10 a 20 mg de un solo uso conteniendo polvo liofilizado como una sola dosis, mediante administración de bolo intravenoso antes de la aféresis y después de la reinfusión de las células cosechadas. Puede administrarse un bioequivalente de la dosificación subcutánea con dosificación intravenosa. Se espera que la dosis esté entre aproximadamente 10-300 $\mu\text{g/kg}$.

Un aspecto clave de este estudio, será explorar la relación de riesgo a beneficio del compuesto mimético de TPO en diferentes poblaciones de pacientes. Un número creciente de pacientes está recibiendo terapia mieloablativa a altas dosis con ASCT relativamente temprano en el curso de su enfermedad. Dichos pacientes tienen con frecuencia médula ósea relativamente normal y, en particular si son jóvenes, es probable que movilicen números aceptables de células CD34+ con alta probabilidad consecuente de injerto rápido. En esta población, el impacto potencial de un agente adicional que intensifique la movilización puede ser limitado, pero podría manifestarse como injerto incluso más rápido, con reservación de células cosechadas para trasplante en tándem. Sin embargo, esta población, que se asemeja más estrechamente a la población normal por lo menos en términos de sensibilidad a la médula ósea, es un grupo de traducción importante para el desarrollo del compuesto mimético de TPO.

Los pacientes que llegan a ser candidatos para ASCT después de sesiones previas múltiples de terapia, tienen con frecuencia mayor

dificultad para generar suficientes células CD34+ para una cosecha adecuada. Por consiguiente, muchos de estos pacientes requieren programas de aféresis prolongados y una mayor incidencia de injerto retardado o fallido. Una proporción de estos pacientes no es capaz de sufrir trasplante autólogo, y
5 debe recurrir más bien al trasplante alogénico con riesgo incrementado de complicaciones post-trasplante. Es esta población en la cual un agente de movilización adicional puede ser de gran beneficio.

Por consiguiente, el primer estudio en pacientes enrolará pacientes de ambas categorías. Los datos de los "buenos movilizadores" se
10 usarán como una marca fija para determinar el impacto del compuesto mimético de TPO sobre los "malos movilizadores". Se incluirá un grupo no tratado que reciba sólo estándar de cuidado.

Los puntos finales farmacodinámicos esbozados anteriormente proveerán un sustituto vigoroso del beneficio probablemente clínico del
15 compuesto mimético de TPO en ASCT.

Se llevarán a cabo estudios definitivos como estudios controlados con placebo, de doble ciego y de grupo paralelo. Una vez que la aleatorización haya ocurrido, se tomarán decisiones clínicas acerca del trasplante de acuerdo a reglas predefinidas y la práctica clínica aceptada.

20 El punto final primario para los estudios será el tiempo medio al injerto después de la reinfusión de las células cosechadas. El tiempo al injerto se definirá como el número de días hasta que el conteo de plaquetas se mantenga arriba de $20 \times 10^9/L$ sin soporte de transfusión durante un período de

7 días.

Los puntos finales secundarios incluirán:

1. Tiempo al injerto de neutrófilos (definido como conteo de neutrófilos mantenido arriba de $0.5 \times 10^9/L$);
- 5 2. Tiempo al conteo de plaquetas $>50 \times 10^9/L$ (mantenido por 7 días sin soporte de transfusión);
3. Proporción de pacientes con injerto de plaquetas retardado;
4. Proporción de pacientes con falla secundaria de injerto de plaquetas;
- 10 5. Proporción de pacientes que fallan para generar la cosecha mínima necesaria para el trasplante;
6. Cosecha de células CD34+ (células CD34+/kg);
7. Número de aféresis requeridas para la cosecha; y
8. Número de transfusiones de plaquetas.
- 15 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+ cosechadas es un determinante importante de la cinética de injerto subsecuente, y fijará firmemente por lo tanto directamente el punto final primario de los estudios. Las características demográficas clave que influirán
- 20 sobre la capacidad para movilizar células CD34+, es la cantidad de pretratamiento y la edad del paciente. Deben considerarse los siguientes aspectos:

1. Si se selecciona una población de mala movilización, habrá una mayor oportunidad de detectar una mejora en los índices de injerto, pero la capacidad de la médula ósea para responder al compuesto mimético de TPO puede comprometerse de esta manera, que no es posible una respuesta.

5 2. Si se selecciona una población de alta movilización, la capacidad para detectar una respuesta sobre la terapia de fondo puede ser limitada debido al hecho de que los números óptimos de HSCs autorrenovables serán reinfundidos, a pesar de la adición del compuesto mimético de TPO;

10 3. El efecto intrínseco del compuesto mimético de TPO de la invención para aumentar la movilización, puede prevenir la definición precisa de buenos o malos movilizadores;

 4. La capacidad para detectar el efecto, sobre el injerto, de un aumento en la autorrenovación de las HSCs, puede observarse sólo en
15 pacientes en quienes el número de estas células es un factor limitativo en la cinética de injerto.

 Con base en estos aspectos, es importante que la población de estudio para estos estudios se limite al número de pacientes en los extremos de la escala de movilización. En cualquier extremo, puede ser difícil demostrar
20 la eficacia del compuesto. Esto puede lograrse excluyendo algunos grupos de pacientes que es altamente probable que favorezcan valores de movilización extremos (por ejemplo, pacientes que reciben terapia de primera línea, pacientes con mielodisplasia y/o baja reserva de médula), y también

asegurando que el tamaño de muestra sea determinado por pacientes que alcanzan una escala predefinida de tamaño de la cosecha de células CD34+ (es decir, se reemplazaría a los pacientes aleatorizados que fallan en cumplir estos criterios).

- 5 Si se sigue un diseño de este tipo, la mayoría de los pacientes que favorecerían el punto final primario en el grupo con placebo tendrían un rendimiento de células CD34+ que está en las siguientes categorías a una relación de 2:3:1, respectivamente:

- 10 $<2.0 \times 10^6/\text{kg}$ (tiempo medio al injerto = 17 días)
 $2-5 \times 10^6/\text{kg}$ (tiempo medio al injerto = 12 días)
 $>5 \times 10^6/\text{kg}$ (tiempo medio al injerto = 10 días).

- En una población de este tipo, el tiempo medio esperado al injerto sería de 13 a 14 días. Si el efecto del compuesto mimético de TPO sobre el rendimiento de células CD34+ fue alterar las proporciones de las
15 diferentes categorías de cosecha de 2:3:1 a 1:2:3, este cambio resultaría sólo en una reducción en el tiempo medio al injerto de 1.66 días. Si un tiempo mejorado al injerto dentro de cada categoría causado por números incrementados de autorrenovación de HSCs se superpone sobre esto, de modo que el tiempo medio al injerto mejore en 5 días en el grupo de
20 rendimiento más bajo (es decir, se comportan como el grupo de rendimiento medio) y dos días en el grupo intermedio (es decir, se comportan como el grupo de alto rendimiento), la reducción adicional en el tiempo medio al injerto sería de 1.66 días. Ningún efecto sobre el tiempo al injerto se asume para el

grupo de alto rendimiento. En conjunto, el impacto del tratamiento con el compuesto mimético de TPO sobre el tiempo medio al injerto de plaquetas, con el propósito de calcular un tamaño de muestra, sería de 3 días. Para permitir la oportunidad máxima de definir el beneficio clínico del compuesto mimético de TPO, debe establecerse un umbral relativamente bajo para la cosecha mínima requerida para permitir que proceda la mieloablación.

La capacidad para demostrar la eficacia del compuesto mimético de TPO en ASCT es relativamente directa, debido a que basta la observación de números incrementados de células madre CD34+ en la sangre periférica de voluntarios normales tratados con dosis individuales. El primer estudio en humanos demostrará por lo tanto un efecto biológicamente relevante. Varios estudios han identificado el nivel de células CD34+ en sangre periférica como un predictor importante del rendimiento de aféresis subsecuente. Sin embargo, el efecto sobre la movilización de células madre en combinación con el G-CSF no se establecerá hasta que haya concluido el primer estudio en pacientes. Será más difícil establecer que las células CD34+ movilizadas contienen números incrementados de células madre, debido en parte a que es difícil medir los bajos niveles de HSCs en pacientes no estimulados. Sin embargo, puesto que se reporta que el G-CSF no afecta la proporción de HSCs en la población de células CD34+, puede ser posible inferir cierto efecto del compuesto mimético de TPO sobre el número de HSCs autorrenovables dentro de la población de células movilizadas en comparación con células movilizadas con el G-CSF.

El predictor de éxito más importante, será el rendimiento de aféresis. El número de células reinfundidas es un predictor importante del tiempo subsecuente al injerto. Por consiguiente, la proporción de pacientes con rendimientos clínicamente aceptables o altos será un determinante importante del impacto probable sobre el tiempo al injerto, y la proporción de
5 pacientes con injerto retardado o fallido.

Se espera que el compuesto mimético de TPO sea tan bueno como el G-CSF o superior al mismo para movilizar células madre, y que el compuesto mimético de TPO provea calidad mejorada de la población de
10 células madre movilizadas.

Un estudio de un solo ciego evalúa el efecto del compuesto mimético de TPO sobre la movilización de células madre CD34+ de sangre periférica cuando se añade a regímenes de movilización estándar en pacientes programados para quimioterapia mieloablativa con trasplante autólogo de
15 células madre.

Para determinar el efecto del compuesto mimético de TPO sobre la movilización de células madre antes de la aféresis, se llevará a cabo un estudio de aumento de la dosis, con una sola dosis, usando dosis que se ha demostrado movilizan células CD34+ en voluntarios normales. Cada grupo de
20 dosis contendrá seis pacientes que reciben medicaciones activas, y dos que reciben sólo terapia de fondo con G-CSF. Cada grupo será dividido en dos grupos de tres pacientes con terapia activa y un paciente con placebo. Un grupo, serán pacientes que reciben SCT autólogas como terapia de primera

línea, mientras que el otro serán pacientes pretratados intensamente que reciben SCT autólogas como terapia de salvataje. Cuando se alcanza una dosis que produce un rendimiento incrementado de células CD34+ respecto al paciente con placebo (efecto del tamaño por ser definido) y para controles

5 históricos para el efecto del G-CSF sobre la movilización de células madre, se reclutará a otros ocho pacientes (por subgrupo) a esa dosis para solidificar la evidencia de eficacia, y para explorar otros puntos finales de pre- y post-trasplante (para incluir el número de aféresis que se requiere para dar 3×10^6 células/kg, la proporción de pacientes que logran una cosecha adecuada, y el

10 tiempo para la recuperación de neutrófilos post-trasplante e independencia de la transfusión de plaquetas). Más incrementos de dosis continuarán como para el programa de aleatorización original. Si un subgrupo alcanza una meseta de eficacia o toxicidad limitativa de la dosis, el subgrupo restante continuará en la escala de dosis. Al momento de la aféresis, se obtendrá una

15 muestra de células infundidas por aféresis para estudiar la capacidad multipotencial de las células cosechadas (asumiendo que el tamaño de la cosecha no es limitativo). Después de cumplir los criterios de selección y la colecta de muestras de sangre de línea de referencia, el paciente recibirá una sola dosis de la medicación de estudio administrada mediante infusión

20 intravenosa durante un período de 60 minutos. Ocurrirán visitas consecutivas cada 48 horas, hasta que la cosecha de células madre concluya. Se considerará que la cosecha de células madre ha fallado, si 10 aféresis han fallado para dar células suficientes para injerto exitoso (2×10^6 /kg como

mínimo). El paciente continuará entonces con quimioterapia mieloablativa, reinfusión de células madre y tratamiento complementario con cuidado de soporte adecuado de acuerdo al protocolo definido para el tumor del paciente. Los datos sobre el injerto se resumirán de los documentos de origen de
5 acuerdo a especificaciones predefinidas.

Se tomarán muestras para muestreo farmacocinético en cada visita de estudio. Se medirán los niveles de compuesto usando una ELISA.

Se piensa que la administración del compuesto mimético de TPO de conformidad con el método de la invención, proveerá muchas ventajas que
10 incluyen, entre otras:

- Reducción en el tiempo medio al injerto de plaquetas (definido como conteo de plaquetas $>20 \times 10^9/L$) de 3 días cuando se añaden a la terapia estándar. La reducción es de 1 día cuando se usa en lugar de la terapia estándar.
- 15 - Reducción en la proporción de pacientes con tiempo retardado al injerto de plaquetas de 40% a 10%.
- Incremento en la proporción de pacientes que logran recuperación primaria de plaquetas (definida como pacientes que mantienen un conteo de plaquetas $>50,000$ por 7 días), de 60% a 85%.
- 20 - Reducción en el número de transfusiones de plaquetas requeridas (de una media de 5 a una media de 3).
- Reducción en el tiempo medio a $ANC > 0.5 \times 10^9/L$, de 1 día.

- Reducción en la proporción de pacientes que fallan en cumplir las cosechas mínimas de células madre ($3 \times 10^6/\text{kg}$) para el trasplante (de 35% a 5%) cuando se usan en combinación con el G-CSF.

- Aumento en el rendimiento de células CD34+ cuando se usan en combinación con el G-CSF ($4 \times 10^6/\text{kg}$ contra $1 \times 10^6/\text{kg}$).

- Reducción en el número de cosechas requeridas para dar células suficientes para sustentar el trasplante cuando se usan en combinación con el G-CSF (de una media de 3 a una media de 1).

La terapia de una sola dosis conveniente mejora la eficiencia del trasplante de células madre, permite el tratamiento más agresivo de tumores sólidos, mieloma y linfoma, y aumenta el número de candidatos para el trasplante de células madre.

Aunque sólo se han descrito específicamente modalidades particulares de la invención, se apreciará que modificaciones y variaciones de la invención son posibles sin apartarse del espíritu y alcance deseado de la invención.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un método para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas en un sujeto, que comprende un paso de administrar un compuesto mimético de TPO a dicho sujeto.

 2.- Un método para proveer células madre hematopoyéticas a un sujeto, que comprende los pasos de: administrar un compuesto mimético de
10 TPO a un sujeto para intensificar la expansión de una población de células madre dentro de la médula ósea, y/o para movilizar células madre en la circulación periférica; cosechar una o más de las células madre de la médula ósea o células madre en la circulación periférica; y trasplantar las células madre cosechadas en el sujeto.

15 3.- El método de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado además porque el sujeto es un humano. *confir.*

 4.- El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque las una o más células madre son criopreservadas después de la cosecha.

20 5.- El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque las una o más células madre criopreservadas son descongeladas, y se determina que sean viables antes de trasplantarlas en el sujeto.

6.- El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque las una o más células madre se trasplantan en el sujeto cuando el sujeto está en necesidad de dicho trasplante.

7.- El método de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado además porque el compuesto mimético de TPO tiene inmunogenicidad reducida respecto a una o más de rhTPO y rhIL-11.

8.- El método de conformidad con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado además porque el compuesto mimético de TPO tiene un perfil de PK mejorado respecto a una o más de rhTPO y rhIL-11.

9.- Un método para reducir el tiempo al injerto después de reinfusión de células madre en un sujeto, que comprende los pasos de: administrar un compuesto mimético de TPO al sujeto; intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea, y/o movilizar las células madre en la circulación periférica; y cosechar una o más de las células madre de médula ósea o una o más de las células madre en la circulación periférica; y trasplantar las una o más células madre cosechadas en el sujeto.

10.- Un método para reducir la incidencia de injerto primario retardado, que comprende los pasos de: administrar un compuesto mimético de TPO al sujeto; intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea, y/o movilizar las células madre en la circulación periférica; y cosechar una o más de las células madre de médula ósea o una o más de las células madre en la circulación periférica; y trasplantar las una o más células madre cosechadas en el sujeto.

11.- Un método para reducir la incidencia de falla secundaria de la producción de plaquetas, que comprende los pasos de: administrar un compuesto mimético de TPO al sujeto; intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea, y/o movilizar las células madre en la circulación periférica; y cosechar una o más de las células madre de médula ósea o una o más de las células madre en la circulación periférica; y trasplantar las una o más células madre cosechadas en el sujeto.

12.- Un método para reducir el tiempo de injerto de plaquetas y/o neutrófilos después de la reinfusión de células madre en un sujeto, que comprende los pasos de: administrar un compuesto mimético de TPO al sujeto; intensificar la expansión de la población de células madre dentro de la médula ósea, y/o movilizar las células madre en la circulación periférica; y cosechar una o más de las células madre de médula ósea o una o más de las células madre en la circulación periférica; y trasplantar las una o más células madre cosechadas en el sujeto.

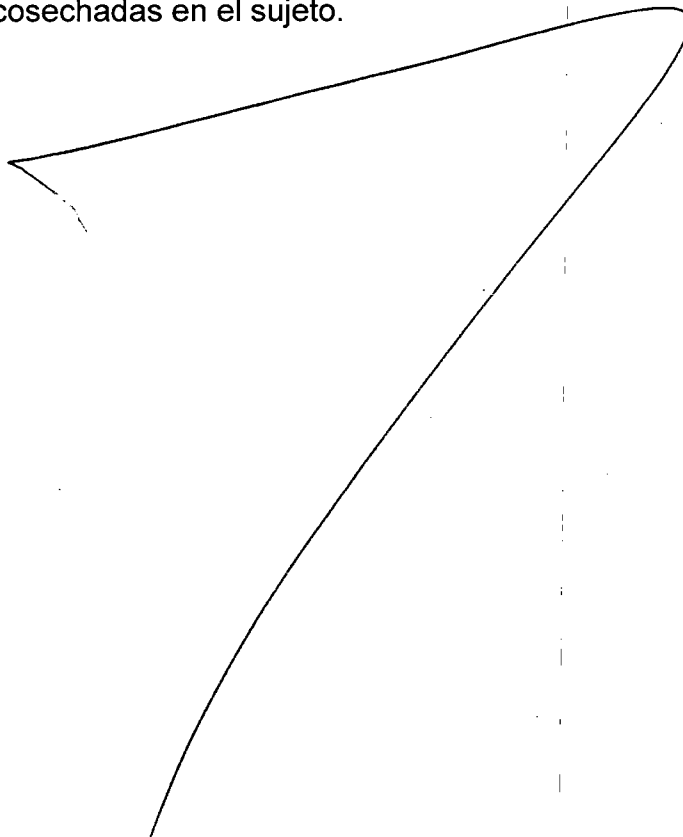
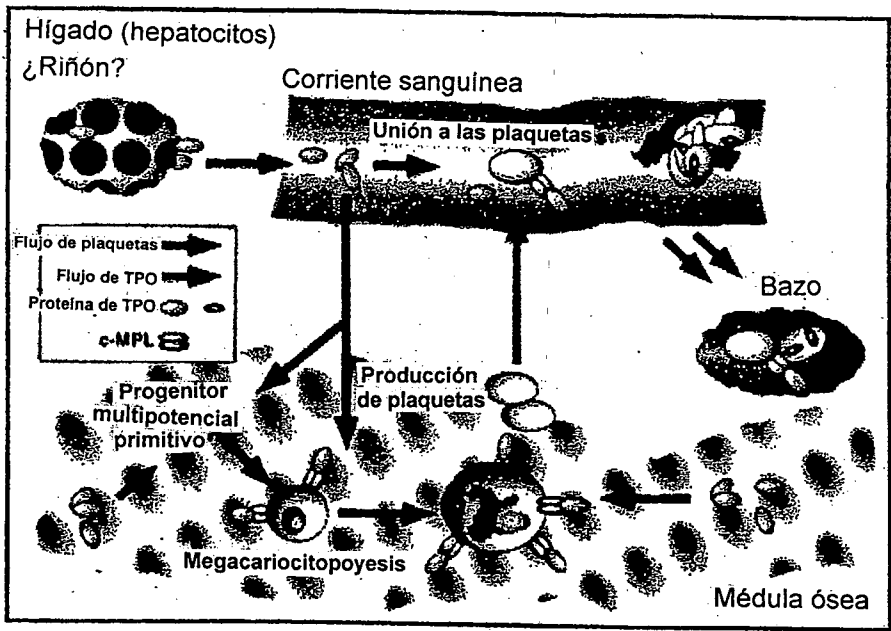
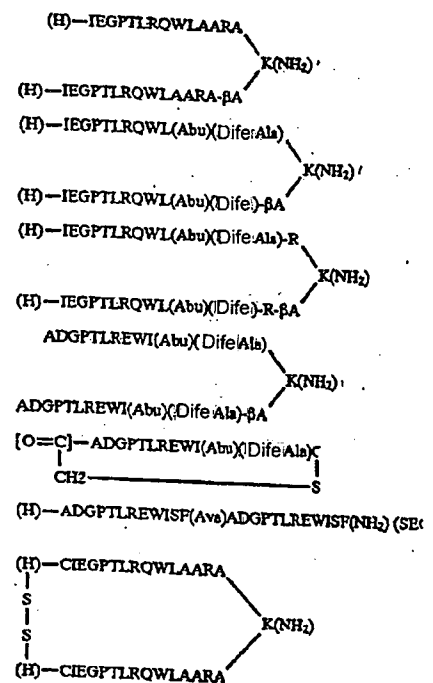
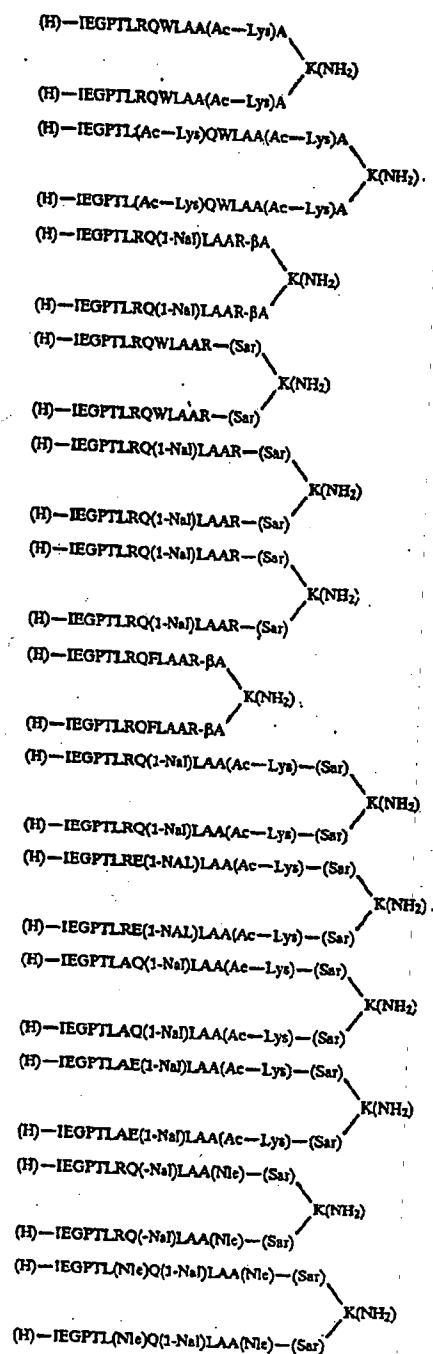
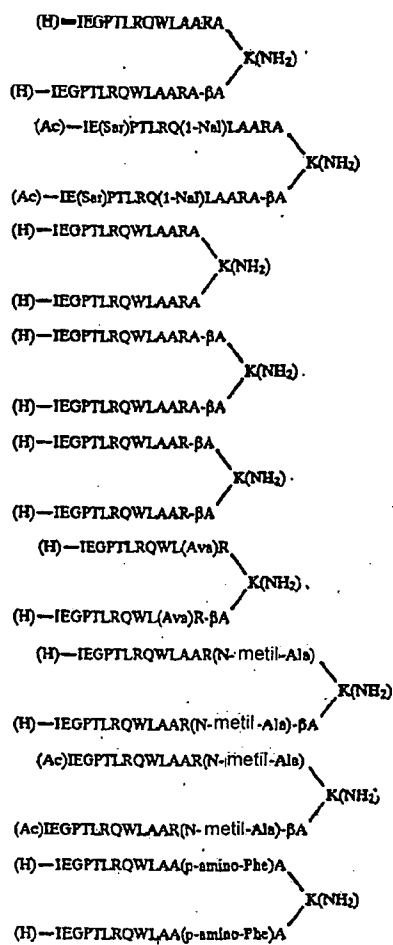


FIG. 1





PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.09.2003 04:52:24 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	PRD-2110-PCT
I	Title of invention	METHODS OF INCREASING PLATELET AND HEMATOPOIETIC STEM CELL PRODUCTION
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name	3-DIMENSIONAL PHARMACEUTICALS, INC.
II-5	Address:	Eagleview Corporate Center 665 Stockton Drive Exton, PA 19341 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	732-524-1729
II-9	Facsimile No.	732-524-2808
II-10	e-mail	Ldonnelly@corus.jnj.com
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	all designated States
III-1-4	Name (LAST, First)	MACDONALD, Brian, R.
III-1-5	Address:	280 South Roberts Road Bryn Mawr, PA 19010 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.09.2003 04:52:24 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	inventor only
III-2-4	Name (LAST, First)	KAUSHANSKY,, Kenneth
III-2-5	Address:	336 Pine Needles Drive Del Mar, CA 92014 United States of America
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	inventor only
III-3-4	Name (LAST, First)	MACDONALD,, Brian, R.
III-3-5	Address:	280 South Roberts Road Bryn Mawr, PA 19010 United States of America
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	JOHNSON, Philip, S.
IV-1-2	Address:	Johnson & Johnson One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, NJ 08933 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	732-524-1729
IV-1-4	Facsimile No.	732-524-2808
IV-1-5	e-mail	Ldonnelly@corus.jnj.com
IV-1-5	Agent's registration No.	27,200
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	DONNELLY, Laura, A. (38,435)
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.09.2003 04:52:24 PM

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VC VN YU ZA ZM ZW	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	18 September 2002	(18.09.2002)
VI-1-2	Number	60/411,779	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority claim of earlier national application		
VI-2-1	Filing date	18 September 2002	(18.09.2002)
VI-2-2	Number	60/411,700	
VI-2-3	Country	US	
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	

PCT REQUEST

PRD-2110-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.09.2003 04:52:24 PM

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	1	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

58

PCT REQUEST

PRD-2110-PCT

Original (for **SUBMISSION**) - printed on 18.09.2003 04:52:24 PM

VIII-1-1	Declaration: Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	in relation to this international application
	This declaration is made for the purposes of:	all designations except the designation of the United States of America

PCT REQUEST

PRD-2110-PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.09.2003 04:52:24 PM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	6	-
IX-2	Description	24	-
IX-3	Claims	2	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	2	-
IX-7	TOTAL	35	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	<i>Laura Donnelly</i>	
X-1-1	Name	3-DIMENSIONAL PHARMACEUTICALS, INC.	
X-1-2	Name of signatory	Laura A. Donnelly	
X-1-3	Capacity	Assistant Secretary	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 April 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/026332 A1

(51) International Patent Classification⁷: **A61K 38/18**

RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number:
PCT/US2003/029701

(22) International Filing Date:
18 September 2003 (18.09.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/411,779 18 September 2002 (18.09.2002) US
60/411,700 18 September 2002 (18.09.2002) US

(71) Applicant: **3-DIMENSIONAL PHARMACEUTI-
CALS, INC.** [US/US]; Eagleview Corporate Center, 665
Stockton Drive, Exton, PA 19341 (US).

(72) Inventors: **KAUSHANSKY, Kenneth**; 336 Pine Needles
Drive, Del Mar, CA 92014 (US). **MACDONALD, Brian**,
R.; 280 South Roberts Road, Bryn Mawr, PA 19010 (US).

(74) Agents: **JOHNSON, Philip, S.** et al.; Johnson & Johnson,
One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933
(US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i)) for the fol-
lowing designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS OF INCREASING PLATELET AND HEMATOPOIETIC STEM CELL PRODUCTION

(57) Abstract: A method of increasing hematopoietic stem cell production is disclosed. The method includes administering a TPO mimetic compound to a subject. Pharmaceutical compositions including a TPO mimetic compound and a pharmaceutically acceptable carrier are also disclosed.

WO 2004/026332 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/29701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 060 052 A (MURRAY LESLEY J ET AL) 9 May 2000 (2000-05-09) column 6, last paragraph column 6, line 66,67 column 1, paragraph 2 column 2, paragraph 2 column 3, line 65 -column 4, line 10 column 4, last paragraph column 7, paragraphs 3,4	1-12
X	WO 01 21180 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ;DUFFY KEVIN J (US); LUENGO JUAN I (US); L) 29 March 2001 (2001-03-29) page 1, paragraphs 1,3,4 page 2, paragraph 1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2004

Date of mailing of the international search report

03/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/29701

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 078612 A (PURDUE PHARMA L P ;BURCH RONALD M (US); OGERT ROBERT A (US); SOLTI) 10 October 2002 (2002-10-10) page 60, paragraphs 1,2; claims 53-55	9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 03/29701

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6060052	A	09-05-2000	AU 717783 B2	30-03-2000
			AU 7495396 A	22-05-1997
			CA 2236263 A1	09-05-1997
			WO 9716535 A2	09-05-1997
			EP 0858503 A1	19-08-1998
			JP 11514879 T	21-12-1999
			US 2003082805 A1	01-05-2003
			US 6326205 B1	04-12-2001
WO 0121180	A	29-03-2001	AU 7606400 A	24-04-2001
			EP 1223944 A1	24-07-2002
			JP 2003509462 T	11-03-2003
			WO 0121180 A1	29-03-2001
			US 6552008 B1	22-04-2003
WO 02078612	A	10-10-2002	WO 02078612 A2	10-10-2002

64

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCTREQUEST FOR THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1)

To:		Date of mailing (day/month/year)	08 March 2005 (08.03.2005)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211, Geneva 20 Switzerland		International filing date (day/month/year)	18 September 2003 (18.09.2003)
International application No. PCT/US2003/029701			

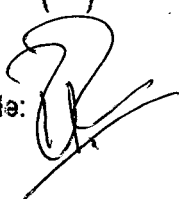
1. The following indications appear on record concerning:			
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative
Name and address 3-DIMENSIONAL PHARMACEUTICALS, INC. Eagleview Corporate Center 665 Stockton Drive Exton, Pennsylvania 19341		State of Nationality*	State of Residence*
		Telephone No. (610) 458-8959	
		Facsimile No. (732) 524-2808	
		Teleprinter No.	
2. This receiving Office hereby requests the International Bureau to record the following change in:			
☐ the person	☒ the name	☐ the address	☐ the nationality* ☐ the residence*
Name and address ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC. U.S. Route 202 Raritan, New Jersey 08869		State of Nationality*	State of Residence*
		Telephone No. (908) 218-6000	
		Facsimile No. (732) 524-2808	
		Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Attorney of Record: Laura A. Donnelly (Reg. No. 38,435) Tel. No.: Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza (732) 524-1729 New Brunswick, New Jersey 08933			
* To be indicated only for a change concerning the applicant.			

Name and mailing address of the receiving Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA INCOMPLETA	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL	()	()
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA INCOMPLETA	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO	()	()
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable:



Fecha: