

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 556**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61K 31/727** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2016 PCT/IB2016/051196**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16142814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2016 E 16709148 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3265075**

54 Título: **Terapia combinada con roneparstat del mieloma múltiple**

30 Prioridad:

**06.03.2015 US 201562129221 P**

**28.04.2015 US 201562153899 P**

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

**04.06.2019**

73 Titular/es:

**LEADIANT BIOSCIENCES SA IN LIQUIDAZIONE (50.0%)**

**Corso Elvezia, 9**

**6900 Lugano, CH y**

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SANDERSON, RALPH D.;**

**PRAKASH C. RAMANI, VISHNU;**

**NOSEDA, ALESSANDRO y**

**BARBIERI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 715 556 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Terapia combinada con roneparstat del mieloma múltiple

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a roneparstat para uso en una terapia combinada para el tratamiento del mieloma múltiple.

**Antecedentes de la invención**

10 El mieloma de células plasmáticas (o mieloma múltiple o MM) representa aproximadamente el 1,3% de las enfermedades neoplásicas y 17,9% de los cánceres hematológicos (Globocan-EU28, 2012, véase [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)). La edad media en el momento del diagnóstico es de aproximadamente 70 años; el 37% de los pacientes es menor de 65 años, el 26% está entre las edades de 65 y 74 años y el 37% tiene 75 años o más. El mieloma de células plasmáticas (MCP) es ligeramente más común en los hombres que en las mujeres y es dos veces más común en los afroamericanos que en comparación con los caucásicos.

El MCP sigue siendo incurable a pesar de la quimioterapia convencional y de dosis elevada.

15 A pesar de las mejoras en el arsenal terapéutico, no existe una terapia curativa y todos los pacientes experimentan eventualmente una recidiva. El pronóstico es particularmente malo para los pacientes con enfermedad recidivante y refractaria, con unas estimaciones de supervivencia desde 6 a 9 meses. Además de la resistencia a las terapias disponibles en la actualidad, los pacientes que evolucionan no respondiendo a los múltiples agentes nuevos, tienen opciones de tratamiento limitadas, debido a la presencia de afecciones comórbidas debidas a la enfermedad primaria o a terapias previas.

20 Por lo tanto, todavía siguen siendo necesarios agentes nuevos, eficaces y bien tolerados para el tratamiento del mieloma recidivante.

25 En los años 1960, se introdujo la terapia con melfalán + prednisona (MP) para el tratamiento de la MM, la cual alargó la supervivencia media desde aproximadamente 1,5 años a 2 años. Desde finales de los años 1990, una terapia con dosis elevadas de melfalán (200 mg/m<sup>2</sup>) seguida de un trasplante autólogo de células madre (TACM) se ha aplicado después de una terapia de inducción con vincristina + adriamicina + dexametasona (VAD) en pacientes menores de 65 años, lo que ha dado lugar a una mejora adicional de la supervivencia hasta 5 años. En consecuencia, una terapia de inducción + TACM se ha contemplado como una terapia estándar para los pacientes más jóvenes con un buen estado de salud, y la terapia con MP se ha contemplado como una norma asistencial para pacientes ancianos con una edad de 65 años o superior. El trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (TCMH) implica la infusión intravenosa (IV) de células madre autólogas para restablecer la función hematopoyética en pacientes cuya médula ósea o sistema inmune está dañado o es defectuoso.

30 En la fase temprana del siglo 21, han entrado en la práctica clínica agentes novedosos tales como talidomida, bortezomib y lenalidomida y se han convertido en medicamentos clave en el tratamiento de la MM.

35 Los regímenes basados en bortezomib se utilizan ahora como una terapia de inducción antes de un TACM en pacientes aptos para un trasplante, y MP + talidomida, MP + bortezomib y lenalidomida + dexametasona son los regímenes ampliamente utilizados para pacientes no aptos para un trasplante. Diversos estudios clínicos han mostrado una mejora de la tasa de respuesta global y de la supervivencia sin progresión (SSP) en pacientes tanto aptos para trasplante como no aptos para trasplante, mediante la incorporación de agentes novedosos en la terapia antimieloma. El mieloma múltiple sigue siendo una enfermedad incurable a pesar de la disponibilidad de múltiples tratamientos tales como la quimioterapia convencional y de dosis elevada. La falta de terapias eficaces y seguras disponibles para el tratamiento de tumores resistentes/recidivantes constituye una necesidad médica no satisfecha decisiva y constante.

40 La inhibición del proteasoma ha asumido de hecho un papel central en la atención médica del MM, debido a la eficacia de esta estrategia de tratamiento y a un perfil de seguridad manejable.

Bortezomib se utiliza en cada estadio del tratamiento del MM, desde una terapia de combinación de primera línea, hasta un retratamiento para una enfermedad recidivante, una terapia para una enfermedad refractaria y como una terapia de inducción, consolidación y mantenimiento antes y después de un auto TCMH.

50 Bortezomib es un inhibidor reversible de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma 26S en células de mamífero. El proteasoma 26S es un gran complejo proteico que degrada las proteínas ubiquitinadas. La vía de ubiquitina-proteasoma tiene un papel esencial en la regulación de la concentración intracelular de proteínas específicas, manteniendo de este modo la homeostasis dentro de las células. La inhibición del proteasoma 26S evita esta proteólisis dirigida que puede afectar a múltiples cascadas de señalización dentro de la célula. Esta alteración de los mecanismos homeostáticos normales puede conducir a una muerte celular. Los experimentos han

demostrado que bortezomib es citotóxico para una variedad de tipos de células cancerosas *in vitro*. Bortezomib provoca un retraso en el crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de tumores no clínicos, incluyendo el mieloma múltiple. Por lo tanto, las células del MM sufren una apoptosis más rápidamente cuando se altera la homeostasis proteica (Adams J., Nat. Rev. Cancer, 2004, 4, 349-360). Esto confiere una selectividad a estos agentes y un índice terapéutico que no es específico del ciclo celular (a diferencia de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos, que afectan a todas las células en división y su selectividad proviene del hecho de que una fracción más elevada de las células cancerosas están experimentando mitosis en cualquier momento dado, en comparación con las células normales).

Bortezomib (VELCADE®) es un ácido borónico dipéptido y un inhibidor quimotriptico selectivo del sitio del proteasoma 20S. Ha sido aprobado en los EE.UU. para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple y para el tratamiento de pacientes con linfoma de células del manto. Ha sido aprobado en Europa como monoterapia para el tratamiento de pacientes adultos con mieloma múltiple progresivo que han recibido al menos 1 terapia previa y que ya han sido sometidos a un trasplante de médula ósea o no son adecuados para el mismo.

En combinación con melfalán y prednisona, bortezomib está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con mieloma múltiple que no ha sido tratado previamente, que no son aptos para una quimioterapia de dosis alta con trasplante de médula ósea.

En el mieloma múltiple, se han obtenido respuestas clínicas completas en pacientes con una enfermedad refractaria diferente o que avanza rápidamente (Merin NM, Kelly KR. Pharmaceuticals (Basel). 2014 Dic 24; 8(1):1-20).

El átomo de boro en el bortezomib se une al sitio catalítico del proteasoma 26S con afinidad y especificidad elevadas. En las células normales, el proteasoma regula la expresión y la función de las proteínas mediante una degradación de las proteínas ubicuitinadas, y también limpia la célula de proteínas anormales o mal plegadas.

Carfilzomib (KYPROLIS®) es un tetrapéptido con epoxicetona inhibidor del proteasoma que se une irreversiblemente a los sitios activos que contienen treoninas N-terminales del proteasoma 20S, la partícula del núcleo proteolítico dentro del proteasoma 26S. El nombre químico de carfilzomib es (2S)-N-((S)-1-((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-ilcarbamoil)-2-feniletil)-2-((S)-2-(morfolinoacetamido)4-fenilbutanamido)-4-metilpentanamida.

Carfilzomib tenía actividades antiproliferativas y proapoptóticas *in vitro* en las células de tumores sólidos y hematológicos. En los animales, carfilzomib inhibía la actividad del proteasoma en la sangre y los tejidos y retrasaba el crecimiento tumoral en modelos de mieloma múltiple, tumores hematológicos y sólidos. Carfilzomib ha sido aprobado por la FDA de EE.UU. para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple que han recibido al menos dos terapias previas, incluyendo bortezomib y un agente inmunomodulador, y han mostrado una progresión de la enfermedad a o dentro de los 60 días después de la finalización de la última terapia.

Los inhibidores del proteasoma se estudian actualmente para el tratamiento de un mieloma múltiple recidivante/refractario, véase la revisión de Lonial y Boise, Oncology Journal, noviembre de 2011.

Melfalán (Alkeran®, L-sarcolisina) es un fármaco para quimioterapia que pertenece a la clase de agentes alquilantes de mostaza nitrogenada. Un agente alquilante funciona mediante la adición de un grupo alquilo ( $C_nH_{2n+1}$ ) al ADN. En particular, une el grupo alquilo a la base guanina del ADN, en el átomo de nitrógeno número 7 del anillo de imidazol, produciendo de este modo enlaces entre las hebras del ADN. Esta modificación química inhibe la síntesis de ADN y la síntesis de ARN, que son funciones biológicas esenciales para que las células sobrevivan. Por tanto, esas modificaciones químicas causan citotoxicidad tanto en las células tumorales que se dividen como en las que no se dividen.

Estructuralmente el melfalán es un derivado de mecloretamina con fenilalanina.

Ronaparstat (DCI propuesta, previamente también designado como <sup>100</sup>NA-RO.H o SST0001 o G4000) es un derivado de heparina modificado que está 100% N-desulfatado, N-reacetilado y con escisión de glicol (Casu B et al., Pathophysiol Haemost Thromb 2008; 36:195-20; Naggi A et al., J Biol Chem 2005; 280:12103-13). Estas modificaciones inhiben la actividad anticoagulante a las dosis esperadas para lograr una inhibición enzimática significativa, mientras que cualquier posible actividad anticoagulante residual en el intervalo de dosis elevada, está desprovista de cualquier relevancia clínica, pero mejora la inhibición de la heparinasa. Ronaparstat ha mostrado eficacia en modelos preclínicos de cánceres y recientemente se ha iniciado la fase I de ensayos clínicos en pacientes con mieloma múltiple. Ronaparstat disminuía notablemente el grado de albuminuria y lesión renal en modelos en ratón de nefropatía diabética. Esto tiene una importante relevancia clínica ya que la insuficiencia renal afecta al 15-40% de los pacientes con mieloma múltiple (JCO 2010; 28: 4976).

### Descripción de la invención

Se ha encontrado ahora inesperadamente que el uso combinado de ronaparstat con melfalán mejora la eficacia, especialmente mostrando sinergismo, para disminuir la carga tumoral global con respecto a la administración de cada ingrediente activo solo. La carga tumoral promedio se determinó a partir de los niveles de cadena ligera de inmunoglobulina humana y mediante la formación de imágenes con luciferasa.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es roneparstat para uso en una terapia combinada con melfalán o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento del mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas o mieloma recidivante refractario.

Otro objeto de la presente invención es un kit de partes que comprende los siguientes componentes:

- 5           a) Roneparstat;  
              b) melfalán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para uso en la prevención o el tratamiento del mieloma múltiple.

10 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende Roneparstat y melfalán o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o varios vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Los ingredientes activos mencionados anteriormente de acuerdo con la presente invención se pueden administrar de manera coordinada o de forma combinada.

15 Lo que se entiende por uso combinado de los compuestos mencionados anteriormente es, indistintamente, o bien la coadministración, es decir, la complementación sustancialmente concomitante o secuencial, o la administración de una composición que comprende los ingredientes activos mencionados anteriormente en combinación y en una mezcla que opcionalmente comprende además uno o varios excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

20 La presente invención incluye métodos para tratar, inhibir y/o prevenir el mieloma múltiple en cualquier estadio, el mieloma de células plasmáticas, el mieloma recurrente o el mieloma recidivante o cualquier enfermedad o trastorno asociado con el mieloma múltiple. Los métodos de la presente invención comprenden la administración de roneparstat en combinación con melfalán a un sujeto que lo requiere.

Las sustancias activas descritas en la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, también se pueden usar en forma de un hidrato o incluir otros disolventes usados para la cristalización, también conocidos como solvatos.

25 Lo que se entiende por sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto descrito en la presente invención, es cualquier sal de este último con un ácido que no da lugar a efectos tóxicos o secundarios.

30 Ejemplos no limitantes de tales sales son: cloruro, bromuro, orotato, aspartato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, oxalato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato, sulfato ácido, fosfato de glucosa, tartrato y tartrato ácido, glicerofosfato, mucato, tartrato de magnesio, 2-amino-etanosulfonato, 2-amino-etanosulfonato de magnesio, metanosulfonato, tartrato de colina, tricloroacetato y trifluoroacetato.

Una lista de sales farmacéuticamente aceptables aprobadas por la FDA se proporciona en la publicación Int. J. of Pharm. 33 (1986), 201-217.

35 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables, vehículos biológicamente compatibles adecuados para la administración a un animal (por ejemplo, solución salina fisiológica) y, eventualmente, que comprenden agentes auxiliares (como excipientes, estabilizantes o diluyentes) que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar de forma farmacéutica.

40 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede formular de cualquier manera aceptable para satisfacer las necesidades de la forma de administración. El uso de biomateriales y otros polímeros para la administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo específico de administración, se describen en las publicaciones.

Se puede emplear cualquier modo de administración aceptado y determinado por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la administración puede ser por diversas vías parenterales, tales como la vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, oral o bucal.

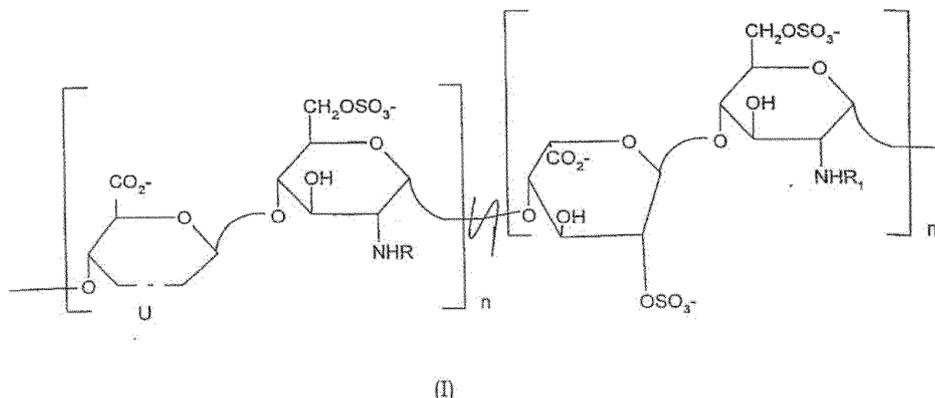
45 Melfalán se administra generalmente por vía oral o intravenosa. Roneparstat se administra generalmente por vía subcutánea.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad eficaz para lograr el resultado médicamente deseable en el sujeto tratado.

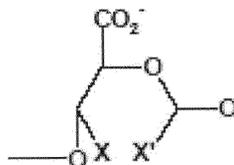
50 Roneparstat (DCI) (previamente también designado como <sup>100</sup>NA-RO.H o SST0001 o G4000) es un derivado de heparina modificado que está 100% N-desulfatado, N-reacetilado y con escisión de glicol. Estas modificaciones inhiben cualquier actividad anticoagulante clínicamente relevante, pero mejoran la inhibición de la heparinasa.

Roneparstat ha mostrado eficacia en modelos preclínicos de cánceres y recientemente se ha iniciado la fase I de ensayos clínicos en pacientes con mieloma múltiple (un tumor líquido) (10, 20, 22).

Roneparstat tiene la siguiente fórmula (I):



5 en donde el anillo U es:



X y X' son el grupo -CH<sub>2</sub>-D, en donde D es hidroxil;

R y R<sub>1</sub> son un residuo acetilo;

10 n y m, que pueden ser iguales o diferentes, pueden variar desde 1 a 40; la suma de m+n varía de 6 a 40; la relación m:n varía de 10:2 a 1:1,

el símbolo

U

indica que las unidades marcadas m y n están distribuidas estadísticamente a lo largo de la cadena de polisacárido y no están necesariamente en secuencia.

15 Para una descripción completa de este compuesto y su procedimiento de preparación, se puede hacer referencia a los documentos de patentes publicadas EP2343077, US7781416 y US8067555. También se puede hacer referencia al documento US8222231 y a Ritchie JP, Ramani VC, Ren Y, Naggi A, Torri G, Casu B, et al. SST0001, una heparina modificada químicamente, inhibe el crecimiento del mieloma y la angiogénesis a través de la interrupción del eje heparanasa/sindecan-1. Clin Cancer Res 2011; 17:1382-93.

20 La preparación de Roneparstat también se ha descrito en el documento de patente de EE.UU. 7781416 (véase, <sup>100</sup>NA,RO-H, párrafo que une las columnas 24 y 25).

25 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar a partir de materiales de partida, fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Se apreciará que en donde se proporcionan condiciones experimentales típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempo, moles de reactivos, disolventes, etc.) también se pueden utilizar otras condiciones experimentales a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes usados en particular, pero tales condiciones pueden ser determinadas por un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización rutinarios.

30 Cualquier combinación de roneparstat y melfalán o cualquier régimen que contiene melfalán, el método de tratamiento de un animal de sangre caliente, preferiblemente un ser humano, que comprende administrar estos dos componentes, una composición farmacéutica que comprende estos dos componentes para uso simultáneo, separado o secuencial, el uso de la combinación para retrasar la progresión o el tratamiento del mieloma múltiple o

para la elaboración de una preparación farmacéutica para estos fines o un producto comercial que comprende una combinación tal de componentes de este tipo, a todos tal y como se han mencionado o se han definido anteriormente, se hará referencia posteriormente también como una combinación de la invención (de forma que este término se refiere a cada una de estas realizaciones que pueden sustituir de este modo a este término cuando sea apropiado).

La administración simultánea puede, por ejemplo, tener lugar en forma de una combinación fija de dos o más ingredientes activos, o mediante la administración simultánea de dos o más ingredientes activos que se formulan de forma independiente. El uso (administración) secuencial significa preferiblemente la administración de uno (o varios) componentes de una combinación en un punto temporal, otros componentes en un punto temporal diferente, es decir, de una manera escalonada en el tiempo, preferiblemente de tal manera que la combinación muestra más eficacia que los compuestos individuales administrados independientemente (especialmente mostrando sinergismo). La utilización (administración) por separado significa preferiblemente la administración de los componentes de la combinación de forma independiente unos de otros en diferentes puntos temporales.

También son posibles combinaciones de dos o más administraciones secuenciales, separadas y simultáneas, preferiblemente de tal manera que la combinación de componentes-fármacos muestra un efecto terapéutico conjunto que supera el efecto que se encuentra cuando la combinación de componentes-fármacos se utiliza de forma independiente a intervalos de tiempo tan grandes que no se puede encontrar ningún efecto compartido sobre su eficacia terapéutica, siendo especialmente preferido un efecto sinérgico.

Los términos "tratamiento" o "tratar", tal y como se usan en esta memoria, incluyen el concepto de retraso de la progresión de la enfermedad o la patología que se va a tratar. De acuerdo con la presente invención, se hará referencia a la inhibición del crecimiento de células tumorales, a una reducción de la masa de células tumorales y/o a una inhibición de la producción de metástasis.

La expresión "retraso de la progresión", tal y como se usa en esta memoria, significa la administración de la combinación a pacientes que están en un estadio previo o en una etapa temprana, de la primera manifestación o las siguientes; o una recidiva de la enfermedad que se va a tratar los pacientes a los que se ha diagnosticado, por ejemplo, una forma previa de la enfermedad correspondiente; o en los pacientes que están en un estado de ese tipo, por ejemplo, durante un tratamiento médico.

En general, la palabra "prevención" incluye una amplia gama de actividades - conocidas como "intervenciones" - destinadas a reducir riesgos o amenazas para la salud. Estas se suelen agrupar en tres categorías. La primera es la "prevención primaria". Aquí el objetivo es proteger a las personas sanas frente al desarrollo de una enfermedad o de padecer una lesión en primer lugar, por ejemplo, los programas de escrutinio de rutina para controlar factores de riesgo para una enfermedad, la inmunización contra enfermedades infecciosas, etc.

La segunda es la denominada "prevención secundaria". Estas intervenciones se producen después de que ya se haya diagnosticado una enfermedad o factores de riesgo graves. El objetivo en este caso es detener o retrasar el progreso de la enfermedad (si es posible) en sus primeros estadios.

La tercera es la "prevención terciaria". Esta se centra en ayudar a las personas a solucionar problemas de salud complicados, a largo plazo, como el cáncer. Los objetivos incluyen prevenir un mayor deterioro físico y maximizar la calidad de vida. ("At Work", publicación 43, invierno 2006: Institute for Work & Health, Toronto).

De acuerdo con la presente invención, la palabra prevención se entiende que se refiere más a una prevención secundaria y terciaria del mieloma múltiple.

"Activo terapéuticamente de forma conjunta" o "efecto terapéutico conjunto" significa que los dos componentes (o ingredientes activos) se pueden administrar por separado (de una manera escalonada en el tiempo, sobre todo de una manera específica de secuencia) en intervalos de tiempo de tal tipo que, preferiblemente, en el animal de sangre caliente, especialmente el ser humano, que se va a tratar, todavía muestran una interacción (preferiblemente sinérgica) (efecto terapéutico conjunto).

"Terapéuticamente eficaz" se refiere preferentemente a una cantidad que es terapéuticamente o en un sentido más amplio, también profilácticamente eficaz contra la progresión de una enfermedad proliferativa. Una cantidad de ese tipo se encuentra a través de ensayos clínicos normales, cuyo diseño está dentro de las habilidades de la persona con experiencia ordinaria en ese campo. Véanse también las directrices de la EMA o FDA.

La expresión "un envase comercial" o "un producto", tal y como se usan en esta memoria, define especialmente un "kit de partes" en el sentido que contiene roneparstat (a) y melfalán (b); esto implica combinaciones de solo 2 componentes.

Tenemos que indicar también que los compuestos que se pueden utilizar en la "combinación" tal y como se ha definido anteriormente, se pueden dosificar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades caracterizadas de los componentes (a) y (b), es decir, simultáneamente o en diferentes puntos temporales. Por otra parte, estos términos comprenden un envase comercial que comprende (especialmente que

combinar) como ingredientes activos los componentes (a) y (b), junto con instrucciones para un uso simultáneo, secuencial (secuencia escalonada en el tiempo, secuencia específica en el tiempo, preferencialmente) o por separado (menos preferiblemente) de los mismos en el retraso de la progresión o el tratamiento de una enfermedad proliferativa. Las partes del kit de partes se pueden administrar entonces, por ejemplo, de forma simultánea o escalonada en el tiempo, es decir en diferentes puntos temporales y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. Muy preferiblemente, los intervalos de tiempo se eligen de manera que el efecto sobre la enfermedad tratada en el uso combinado de las partes, sea mayor que el efecto que se obtendría mediante el uso de solamente uno cualquiera de los copartícipes (a) y (b) de la combinación, tal y como se puede determinar de acuerdo con métodos convencionales. La relación de las cantidades totales del copartícipe (a) de la combinación frente al copartícipe (b) de la combinación, que se van a administrar en la preparación combinada se puede variar, por ejemplo, con el fin de hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes que se va a tratar o las necesidades de un paciente individual, cuyas necesidades diferentes se pueden deber a la enfermedad particular, la edad, el sexo, el peso corporal, etc., de los pacientes. Preferentemente, hay al menos un efecto beneficioso, por ejemplo, un aumento mutuo del efecto de los copartícipes (a) y (b) de la combinación, en particular, un efecto más que aditivo, que por lo tanto se podría lograr con dosis más bajas de cada uno de los fármacos combinados, respectivamente, que las tolerables en el caso de un tratamiento con los fármacos individuales sin una combinación, produciendo efectos ventajosos adicionales, por ejemplo, menos efectos secundarios o un efecto terapéutico combinado en una dosificación no efectiva de uno o ambos de los copartícipes (componentes) (a) y (b) de la combinación, y muy preferiblemente un fuerte sinergismo de los copartícipes (a) y (b) de la combinación.

Tanto en el caso del uso de la combinación de los componentes (a) y (b) como del envase comercial, también es posible cualquier combinación de un uso simultáneo, secuencial o por separado, lo que significa que los componentes (a) y (b) se pueden administrar en un punto temporal de forma simultánea, seguido de la administración de un solo componente con menor toxicidad para el hospedador, ya sea de forma crónica, por ejemplo, más de 3-4 semanas de dosificación diaria, en un punto temporal posterior y a continuación, el otro componente o la combinación de ambos componentes en un punto temporal todavía más posterior (en los ciclos de tratamiento con la combinación de fármacos subsiguientes para un efecto antitumoral óptimo) o similares.

El kit de partes de la presente invención se puede comercializar también en una forma en la que el componente a) (es decir, Roneparstat) y el componente b) (es decir, melfalán) se pueden envasar por separado.

La combinación de la invención también se puede aplicar en combinación con otros tratamientos, por ejemplo, una intervención quirúrgica, una hipertermia y/o una terapia con radiación.

La combinación de la invención se administrará generalmente en una formulación adecuada. Una formulación de ese tipo está en forma de composiciones farmacéuticas convencionales.

La terapia se puede combinar con otras quimioterapias, radioterapias o terapias hormonales conocidas, si se desea para una mayor eficacia clínica.

Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que comprenden roneparstat y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptable están también dentro del alcance de la presente invención. Tales composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo. Una persona experta en la técnica está al tanto de toda una variedad de tales compuestos de vehículos, diluyentes o excipiente adecuados para formular una composición farmacéutica.

Roneparstat junto con un agente auxiliar, vehículo, diluyente o excipiente empleado convencionalmente se puede colocar en forma de composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias de las mismas, y en esa forma se pueden emplear como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, todos para uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluyendo el uso subcutáneo). Tales composiciones farmacéuticas y formas de dosificación unitaria de las mismas pueden comprender ingredientes en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y tales formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo proporcional al intervalo de dosificación diaria que se pretende emplear.

Generalmente, cada ingrediente activo se administra en una "cantidad farmacéuticamente eficaz". La cantidad de compuesto realmente administrada será determinada típicamente por un médico, según las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la combinación de fármacos, la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares. Generalmente, una dosis eficaz será de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,05 mg/kg a 50 mg/kg. Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos, hormonas, radiación o cirugía. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o bien en ensayos de cultivos celulares o en modelos animales, generalmente de ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, monos o cerdos.

El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de

administración. Esa información se puede usar entonces para determinar las dosis útiles y las vías para la administración en seres humanos. Para el cálculo de la Dosis Equivalente Humana (DEH), se recomienda utilizar la tabla de conversión proporcionada por la FDA en el documento "Guidance for Industry and Reviewers" disponible en la FDA. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a través de una variedad de vías incluyendo la vía oral, rectal, sublingual, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intranasal y localmente en el tejido enfermo después de una operación quirúrgica.

La dosis y el modo de administración, así como la posología terapéutica las determinará el médico de acuerdo con su experiencia, gravedad de la enfermedad, estado del paciente y cualquier otra consideración perteneciente a la profesión médica.

En una realización de la presente invención, melfalán se administra a pacientes que lo requieren en dosis utilizadas comúnmente en la práctica clínica, por ejemplo, una dosis intravenosa: 16 mg/m<sup>2</sup>. El fármaco se administra como una sola infusión durante 15 a 20 minutos. Melfalán se administra a intervalos de dos semanas para cuatro dosis, y luego, después de una recuperación adecuada debido a la toxicidad, a intervalos de cuatro semanas.

La dosis oral más habitual para melfalán es 6 mg una vez al día. Después de 2 a 3 semanas de tratamiento, se puede establecer una dosis de mantenimiento de 2 mg diarios.

Roneparstat se administra a pacientes que lo requieren en dosis sugeridas por los médicos en la práctica clínica. Por ejemplo, dosis subcutáneas adecuadas están comprendidas entre 100 y 600 mg por día, preferiblemente entre 200 y 400 mg por día.

Dependiendo de la vía de administración prevista, roneparstat se formula preferiblemente como composiciones parenterales, tópicas u orales. Las composiciones para administración oral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas a granel, o polvos a granel. Más comúnmente, sin embargo, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitaria para facilitar una dosificación exacta. La expresión "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringuillas rellenas medidas previamente de las composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares, en el caso de composiciones sólidas. En composiciones de ese tipo, el compuesto de la invención puede ser un componente secundario o principal, siendo el resto diversos vehículos o soportes y adyuvantes de procesamiento útiles para formar la forma de dosificación deseada. En el caso de una composición liofilizada para inyectar, roneparstat está generalmente presente como un componente principal de la composición (80-100% en peso). Cuando se reconstituye con agua para ser inyectable, roneparstat tiene generalmente una concentración de 50 a 200 mg/ml.

El tratamiento con una dosificación puede ser una pauta de dosis única o una pauta de dosis múltiple.

Las formas líquidas adecuadas para una administración oral pueden incluir un vehículo acuoso o no acuoso adecuado con tampones, agentes de suspensión y dispensación, colorantes, aromas y similares.

Las formas sólidas pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma arábiga, goma de tragacanto, gelatina o polivinilpirrolidona; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de patata o de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como pimienta-menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Los comprimidos se pueden recubrir de acuerdo con métodos bien conocidos por personas expertas en la técnica de la práctica farmacéutica.

Las composiciones parenterales se basan típicamente en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Roneparstat también se puede administrar en formas de liberación sostenida o desde sistemas de administración de fármacos con liberación sostenida.

Una descripción de materiales representativos de liberación sostenida, así como otros materiales y técnicas de procesamiento se exponen en la Parte 5 de Remington's Pharmaceutical Sciences, 20<sup>a</sup> Edición, 2000, Merck Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Generalmente, los doctores en medicina describen un crecimiento o la propagación de un cáncer. Esto se conoce como el estadio de la enfermedad. Para el mieloma múltiple, se utiliza ahora más comúnmente un sistema de clasificación denominado Sistema de Estadificación Internacional (ISS, por sus siglas en inglés). En él se definen los factores que influyen en la supervivencia del paciente. El ISS se basa en datos recogidos a partir de pacientes con mieloma múltiple de todo el mundo. El sistema tiene tres estadios basados en la medición de la albúmina en suero y los niveles de microglobulina  $\beta_2$  en suero, del modo siguiente:

- Estadio I:  $\beta_2$ -M menor que 3,5 mg/L y albúmina mayor o igual a 3,5 gm/dL.

- Estadio II: o bien  $\beta$ 2-M mayor que 3,5 mg/L, pero no mayor que 5,5 mg/L y/o albúmina menor que 3,5 g/dL.
- Estadio III:  $\beta$ 2-M mayor que 5,5 mg/L.

5 El mieloma que vuelve después de un período de estar controlado después de un tratamiento, se llama mieloma recurrente o mieloma recidivante. Si hay una recurrencia, puede ser necesario establecer de nuevo el estadio del cáncer (llamado reestadificación).

De acuerdo con la clasificación de la OMS de 2008 de neoplasmas linfoides, el mieloma de células plasmáticas (mieloma múltiple) también se clasifica, como asintomático (indolente) o mieloma sintomático, dependiendo de la ausencia o presencia de una disfunción de un órgano o un tejido relacionado con el mieloma (Campo E. et al., Blood 2011; 117: 5019-5032).

10 Las neoplasias de células plasmáticas han mostrado ser un desafío para clasificarlas de una forma biológicamente correcta y clínicamente útil. Debido a que los productos de inmunoglobulina de las células plasmáticas se detectan fácilmente en el suero y la orina, una evidencia de pequeños clones de células plasmáticas se puede detectar mediante pruebas de laboratorio de rutina en pacientes que están sanos y puede que no desarrollen nunca un daño orgánico secundario a la proliferación clónica. Además, el depósito de cadenas pesadas o ligeras o ambas de inmunoglobulinas secretadas de forma anormal (por ejemplo, amiloidosis) en los tejidos, se puede producir en presencia de un clon muy pequeño de células plasmáticas, con daño orgánico que es debido a los depósitos, no relacionado con la carga de células plasmáticas. La definición de mieloma de células plasmáticas (MCP) se ha basado en la identificación de características clínicas y de laboratorio que predicen cuando se ha acumulado una carga suficiente de células plasmáticas de modo que el paciente se beneficiará del tratamiento.

20 El diagnóstico de MCP, en ausencia de un daño de un órgano diana relacionado con el mieloma (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia, lesiones óseas), requiere la presencia de una proteína M en el suero de 30 g/L y/o 10% de células plasmáticas clónicas de la médula ósea, el llamado mieloma asintomático (indolente). Los casos que no cumplen esos criterios se consideran gamopatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS, por sus siglas en inglés).

25 Por el contrario, si el daño de un órgano diana relacionado con el mieloma está presente, el MCP se diagnostica cuando se detecta una proteína M en el suero o la orina en cualquier cantidad y cualquier número de células plasmáticas clónicas de la médula ósea (por lo general superior al 10% de todas las células) o plasmocitoma (Campo E. et al., Blood 2011; 117: 5019-5032).

30 El tratamiento combinado de la presente invención es adecuado para el tratamiento de cualquiera de los estadios descritos anteriormente de pacientes con mieloma múltiple, de acuerdo con la determinación y la prescripción de los médicos.

A continuación, la presente invención se ilustrará por medio de algunos Ejemplos que no se consideran limitantes del alcance de la invención.

Los Ejemplos harán referencia a las siguientes Figuras o Dibujos.

### 35 Descripción de los dibujos

Figura 1. Presenta los resultados procedentes de los estudios de combinación *in vivo* de roneparstat (SST0001) con bortezomib. A los animales se les inyectó células CAG HPSE; después de 7 días, los animales se dividieron en cuatro grupos y se trataron durante dos semanas adicionales con a) vehículo, b) bortezomib (con una dosis de 0,5 mg/kg dos veces por semana por vía intraperitoneal, c) roneparstat (con una dosis de 120 mg/kg/día por vía subcutánea) o una combinación de (b) y (c).

Figura 2. Presenta los resultados procedentes de los estudios de combinación *in vivo* de roneparstat (SST0001) con melfalán. A los animales se les inyectó células CAG HPSE; después de 7 días, los animales se dividieron en cuatro grupos y se trataron durante dos semanas adicionales con a) vehículo, b) melfalán (a una dosis de 1,0 mg/kg/semana por vía intraperitoneal), c) roneparstat a una dosis de 60 mg/kg/día por vía subcutánea) o una combinación de (b) y (c).

Figura 3. Presenta los resultados procedentes de los estudios de combinación *in vivo* de roneparstat (SST0001) con melfalán. La duración del experimento fue de cinco semanas. A los animales se les inyectó células CAG HPSE; después de 7 días, los animales se dividieron en tres grupos y se trataron durante dos semanas adicionales con (a) una combinación de melfalán (con una dosis de 2,5 mg/kg/semana por vía intraperitoneal) y roneparstat (con una dosis de 60 mg/kg/día por vía subcutánea) y no se trataron durante las dos semanas restantes, (b) melfalán solo (con una dosis de 2,5 mg/kg/semana por vía intraperitoneal) y PBS durante las dos semanas restantes, o c) melfalán solo (con una dosis de 2,5 mg/kg/semana por vía intraperitoneal) y posteriormente roneparstat (con una dosis de 60 mg/kg/día por vía subcutánea) durante las dos semanas restantes.

Figura 4. Presenta la viabilidad de las células con nivel elevado de HPSE sin tratar, tratadas con roneparstat (Rone)

solo, con carfilzomib (CFZ) solo o con una combinación de roneparstat y carfilzomib; la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Roneparstat con bortezomib

#### 5 *Diseño experimental*

10 Todos los experimentos se realizaron utilizando un modelo de metástasis experimental de mieloma. Para este modelo, se inyectaron tres millones de células de mieloma humanas que expresaban niveles elevados de heparanasa, por vía intravenosa en la vena lateral de la cola de ratones SCID. Estas células se alojan y crecen predominantemente dentro del hueso de ratón y por lo tanto este modelo reproduce de forma cercana la enfermedad mieloma diseminado observada en los seres humanos. Se realiza un seguimiento del desarrollo de la enfermedad en tiempo real mediante la formación de imágenes bioluminiscentes de las células tumorales marcadas con luciferasa. Este modelo se utilizó para establecer si roneparstat en combinación con bortezomib podía superar la quimiorresistencia de las células CAG con nivel elevado de HPSE y potenciar el poder de destrucción de células tumorales de bortezomib.

15 La línea celular de mieloma humano CAG se estableció en el instituto Myeloma Institute for Research and Therapy (Little Rock, AR). Las células CAG con niveles modificados de expresión de heparanasa se han caracterizado ampliamente e incluyen (a) células con nivel bajo de heparanasa (HPSE-baja) preparadas mediante transfección con un vector vacío; y (b) células con nivel alto de heparanasa (HPSE-alta) preparadas mediante transfección con un vector que contiene el ADNc de la heparanasa humana. Aunque las células con HPSE-alta se expresan con un nivel 20 4 veces mayor de heparanasa en comparación con las células con HPSE-baja, los niveles elevados de actividad enzimática presentes en las células con HPSE-alta están en el mismo intervalo que como están presentes en la médula ósea de muchos pacientes con mieloma (Kelly T. et al., Cancer Res 2003; 63: 8749-56). Esto indica que las células con HPSE-alta imitan muy de cerca el nivel de actividad heparanasa presente en muchos pacientes con mieloma y, por lo tanto, representan un modelo apropiado para examinar los efectos de la heparanasa sobre los tumores del mieloma. La preparación de las células CAG-HPSE alta se describe en Yang Y, et al., The Journal of Biological Chemistry, vol. 282, n° 18, pp. 13326-13333, 4 de mayo de 2007 (véase en particular la página 13327, columna izquierda, el párrafo que comienza con "For transfections...").

#### *Pauta de tratamiento*

30 Siete días después de la inyección intravenosa de células CAG HPSE alta, los animales fueron divididos a continuación en cuatro grupos distintos y se trataron con a) vehículo o b) roneparstat (120 mg/kg/día) administrado por vía subcutánea o c) bortezomib (0,5 mg/kg/dos veces por semana) administrado por vía intraperitoneal o d) tanto roneparstat como bortezomib las dos semanas siguientes. Después de dos semanas de tratamiento, se recogió el suero (Día 21). (Número de animales utilizados = 40).

#### *Análisis*

- 35 a. El crecimiento y el tamaño del tumor se vigiló semanalmente mediante bioluminiscencia. Al terminar el experimento, la intensidad de las imágenes luminiscentes (tanto dorsales como ventrales) de todos los grupos experimentales se cuantificó usando el programa informático Living Image® (de Perkin Elmer). Los datos bioluminiscentes de los animales individuales se presentan como flujo total y como recuentos totales.
- 40 b. Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA) para estudiar los niveles de cadena ligera de inmunoglobulina humana en suero de ratón como un indicador de la carga tumoral total de los animales.
- c. El peso corporal total de los animales se registró semanalmente después de la inyección de células tumorales.

#### *Material*

45 Roneparstat fue proporcionado por Sigma-Tau Research S.A.; como vehículo se utilizó solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Bortezomib se utilizó como PS-341 (Velcade®); reconstituido en sulfóxido de dimetilo; como vehículo se usó PBS.

#### *Animales*

##### *Especie, raza, cantidad, sexo y edad*

50 Ratones, CB. 17/lcr SCID, machos, 10 animales por grupo, sexo masculino, 6-8 semanas, procedentes de Charles River.

##### *Cría de animales*

Los ratones se alojaron en el interior de jaulas microaislantes siguiendo la norma para ratones inmunocomprometidos. Los ratones se mantuvieron en jaulas con cubiertas de papel de filtro; el alimento y el lecho se esterilizan y el agua se acidifica. Los animales se alojaron bajo un ciclo de luz-oscuridad, manteniendo la temperatura y la humedad.

5 *Identificación de los animales y asignación a los grupos*

Los animales se subdividieron en los diferentes grupos de dosificación. Cada jaula se identificó por una etiqueta de papel que indicaba: número de ratón, nombre del producto del ensayo, dosis y vía de administración, tipo de células inyectadas, fecha de la inyección del tumor y número de grupo. Al final de los experimentos, los animales fueron sometidos a una anestesia suave y se sacrificaron por dislocación cervical.

10 *Resultados y conclusiones*

El derivado de heparina, roneparstat, mejoraba la eficacia de bortezomib en la disminución de la carga tumoral global, especialmente mostrando sinergismo. La carga tumoral promedio tal y como se determina a partir de los niveles de cadena ligera de inmunoglobulina humana y mediante la formación imágenes con luciferasa, reveló la carga tumoral más baja en los animales tratados con la combinación de ambos, roneparstat y bortezomib. Además, solo 3/10 animales en el grupo de la terapia de combinación tenían una carga tumoral detectable (los datos no se muestran en esta memoria, pero están disponibles a petición), mientras que 8/10 animales que recibieron PBS o bortezomib solo y 6/8 animales que recibieron roneparstat solo, tenían unos niveles detectables de cadena ligera de inmunoglobulina humana.

20 Esto era evidente tanto a partir de los niveles de kappa como de los datos de formación de imágenes luminiscentes; una disminución de los primeros siempre venía acompañada por una disminución de los últimos (véase la Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1 Estudios de combinación *in vivo* de Roneparstat con bortezomib

Grupo de tratamiento	% de animales con niveles de kappa (por encima del límite de detección)
Vehículo	80%
Roneparstat	70%
Bortezomib	75%
Roneparstat + Bortezomib	30%*

\* Solo 3/10 animales tenían niveles detectables de kappa en suero en el grupo de tratamiento combinado.

25 *Ejemplo 2 - Roneparstat con melfalán*

*Diseño experimental*

Todos los experimentos se realizaron utilizando el mismo modelo experimental que el presentado en el Ejemplo 1 en esta memoria, para establecer si roneparstat en combinación con melfalán podía superar la quimiorresistencia de las células CAG HPSE alta.

30 *Pauta de tratamiento*

Siete días después de la inyección i.v. de células CAG HPSE alta, los animales fueron divididos a continuación en cuatro grupos distintos y se trataron con a) vehículo o b) roneparstat (60 mg/kg/día) administrado por vía subcutánea o c) melfalán (1 mg/kg/semana) administrado por vía i.p. o d) tanto roneparstat como melfalán las dos semanas siguientes. Después de dos semanas de tratamiento, se recogió el suero (Día 21). (Número de animales utilizados = 40).

*Análisis*

Igual que en el Ejemplo 1.

*Material*

40 Roneparstat fue proporcionado por Sigma-Tau Research S.A.; como vehículo se utilizó solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Melfalán se adquirió en Sigma-Aldrich (nº de catálogo M2011, Lote nº 063M4122V).

*Animales*

*Especie, raza, cantidad, sexo y edad*

Ratones, CB. 17/lcr SCID, machos, 10 animales por grupo, sexo masculino, 6-8 semanas, procedentes de Charles River.

5 *Cría de animales*

Igual que en el Ejemplo 1

*Identificación de los animales y asignación a los grupos*

Igual que en el Ejemplo 1.

*Resultados y conclusiones*

- 10 El derivado de heparina, roneparstat, mejoraba la eficacia de melfalán en la disminución de la carga tumoral global, especialmente mostrando sinergismo. La carga tumoral promedio tal y como se determina a partir de los niveles de cadena ligera de inmunoglobulina humana y mediante la formación imágenes con luciferasa, reveló la carga tumoral más baja en los animales tratados con la combinación de ambos, roneparstat y melfalán. Sorprendentemente ningún animal en el grupo de tratamiento con la combinación tenía una carga tumoral detectable, mientras que 9/12
- 15 animales que recibieron PBS, 8/9 animales que recibieron roneparstat solo y 7/10 animales que recibieron melfalán solo, tenían niveles detectables de cadena ligera de inmunoglobulina humana (véase la Tabla 2 y la Figura 2).

Tabla 2 Estudios de combinación *in vivo* de Roneparstat con melfalán

Grupo de tratamiento	% de animales con niveles de kappa (por encima del límite de detección)
Vehículo	75%
Roneparstat	89%
Melfalán	70%
Roneparstat + Melfalán	0

Ejemplo 3 - Roneparstat con melfalán - Terapia de mantenimiento

20 *Diseño experimental*

Todos los experimentos se realizaron utilizando el mismo modelo experimental presentado en el Ejemplo 1 en esta memoria para establecer si roneparstat en combinación con melfalán podía superar la quimiorresistencia de las células CAG HPSE alta.

*Pauta de tratamiento*

- 25 Siete días después de la inyección intravenosa de células CAG HPSE alta, los animales fueron divididos a continuación en tres grupos distintos (de 11 animales cada uno) y se trataron del modo siguiente:

Grupo A - Los animales se trataron con una combinación de melfalán (2,5 mg/kg/semana) y roneparstat (60 mg/kg/día) durante dos semanas. Los animales se dejaron sin tratar después durante dos semanas adicionales;

- 30 Grupo B - Los animales se trataron con melfalán (2,5 mg/kg/semana) durante las dos primeras semanas, seguido de inyecciones diarias de PBS durante dos semanas adicionales; y

Grupo C - Los animales se trataron con melfalán (2,5 mg/kg/semana) durante dos semanas, seguido de inyecciones diarias de roneparstat (120 mg/kg/día) durante dos semanas adicionales (Nota - en este grupo un animal murió el día 32º del tratamiento. Por lo tanto se cambió a una dosis de roneparstat de 60 mg/kg/día durante los 3 últimos días del periodo de tratamiento).

- 35 La duración total del experimento fue de 5 semanas. Después de 5 semanas de tratamiento (Día 35) se recogió el suero. El número de animales utilizados era 33.

*Análisis*

Igual que en el Ejemplo 1.

*Material*

Igual que en el Ejemplo 2.

*Animales*

*Especie, raza, cantidad, sexo y edad*

5 Ratones, CB. 17/lcr SCID, machos, 11 animales por grupo, sexo masculino, 6-8 semanas, procedentes de Charles River.

*Cría de animales*

Igual que en el Ejemplo 1.

*Identificación de los animales y asignación a los grupos*

Igual que en el Ejemplo 1.

10 *Resultados y conclusiones*

En los animales tratados con la combinación de SST0001 y melfalán, solo 1/11 animales tenía una carga tumoral detectable cuando se sometió a ensayo dos semanas después de terminar la terapia. Después del tratamiento inicial con melfalán, en los animales que recibieron SST0001 durante las dos semanas siguientes, solo 3/10 animales tenían una carga tumoral detectable mientras que 7/11 animales que recibieron PBS mostraban una carga tumoral detectable. El uso de SST0001 ya sea junto con la quimioterapia o después de la misma, afecta claramente a la carga tumoral (véase la Tabla 3 y la Figura 3).

Tabla 3 - Roneparstat con melfalán - Terapia de mantenimiento

Grupos	Kappa promedio $\pm$ SEM (ng/ml)	Animales con niveles detectables de Kappa
A	6,163 $\pm$ 6,163	1 de 11
B	80,59 $\pm$ 29,60	7 de 11
C	25,35 $\pm$ 17,15	3 de 10

Ejemplo 4 - Roneparstat con carfilzomib

20 *Diseño experimental*

Las células HPSE-alta se cultivaron en medio exento de suero durante una noche y después se trataron con roneparstat (Rone) 6,75  $\mu$ M durante 6 horas, se lavaron y después se trataron con carfilzomib (CFZ) (15 nM) durante 14 horas y la viabilidad se evaluó mediante un ensayo de MTT. El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico para la evaluación de la viabilidad celular, que toma su nombre del colorante de tetrazolio, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). En determinadas condiciones, las enzimas oxidorreductasas celulares reducen el MTT a su formazán insoluble, que tiene un color púrpura.

*Material*

Roneparstat fue proporcionado por Sigma-Tau Research S.A.; como vehículo se utilizó solución salina tamponada con fosfato (PBS).

30 Carfilzomib se adquirió a partir de (Selleckchem, Houston, TX, EE.UU.).

*Resultados y conclusiones*

El derivado de heparina roneparstat mejoraba la eficacia de carfilzomib al disminuir la viabilidad de las células de mieloma sometidas a ensayo, especialmente mostrando sinergismo. En particular se obtuvo un resultado significativo, aproximadamente el 35% de las células de mieloma mostraban supervivencia después del tratamiento combinado (véase la Figura 4), aunque ni roneparstat ni carfilzomib proporcionaban resultados significativos cuando se administraban solos.

**REIVINDICACIONES**

1. Ronaparstat para uso en la prevención o el tratamiento del mieloma múltiple en una terapia combinada con melfalán o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o en un régimen que contiene melfalán.
- 5 2. Ronaparstat para el uso según la reivindicación 1, en el que el mieloma múltiple está en cualquier estadio.
3. Ronaparstat para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho mieloma múltiple es un mieloma recurrente, refractario o recidivante.
4. Ronaparstat para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que se administra en una dosis subcutánea de 100 a 600 mg al día.
- 10 5. Ronaparstat para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que para la terapia combinada melfalán se administra por vía intravenosa en una dosis de 16 mg/m<sup>2</sup> como una sola infusión durante 15 a 20 minutos.
6. Ronaparstat para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que para la terapia combinada melfalán se administra en una dosis oral de 6 mg una vez al día durante 2 a 3 semanas.
7. Un kit de partes que comprende los siguientes componentes:
  - 15 a) ronaparstat;
  - b) melfalán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,para uso en la prevención o el tratamiento del mieloma múltiple.
8. El kit de partes para el uso según la reivindicación 7, en el que dicho tratamiento comprende una terapia combinada o un régimen que contiene melfalán.
- 20 9. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que dicho componente a) y dicho componente b) se administran simultáneamente.
10. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que dicho componente a) y dicho componente b) se administran secuencialmente.
- 25 11. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que dicho componente a) y dicho componente b) están envasados por separado.
12. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que el mieloma múltiple está en cualquier estadio.
13. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en el que dicho mieloma múltiple es un mieloma recurrente, refractario o recidivante.
- 30 14. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en el que dicho componente a) se administra en una dosis subcutánea de 100 a 600 mg al día.
15. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-14, en el que dicho componente b) para la terapia combinada es melfalán y se administra por vía intravenosa en una dosis de 16 mg/m<sup>2</sup> como una sola infusión durante 15 a 20 minutos.
- 35 16. El kit de partes para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-15, en el que dicho componente b) para la terapia combinada es melfalán y se administra en una dosis oral de 6 mg una vez al día durante 2 a 3 semanas.
17. Una composición farmacéutica que comprende ronaparstat y melfalán o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o varios vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 40 18. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, para uso en el tratamiento del mieloma múltiple.

Figura 1

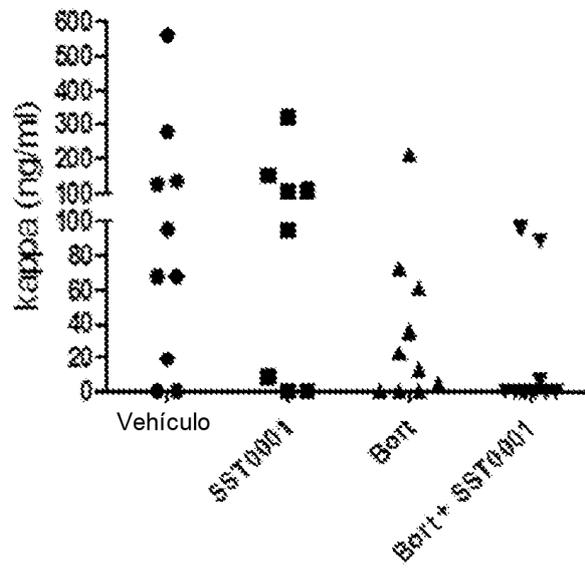


Figura 2

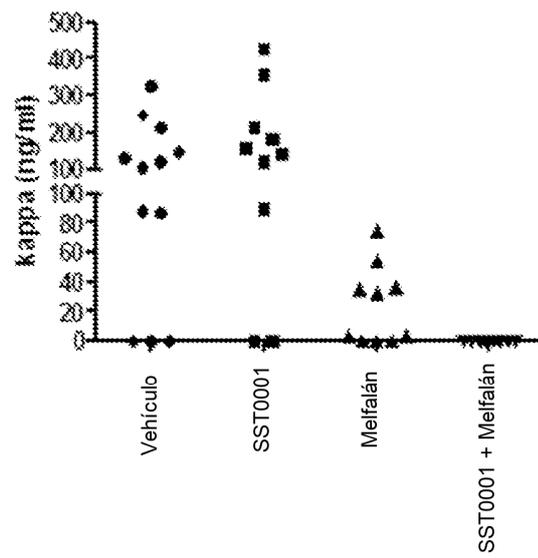


Figura 3

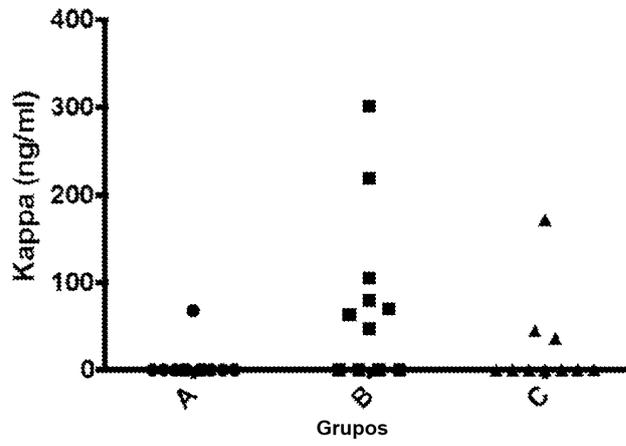
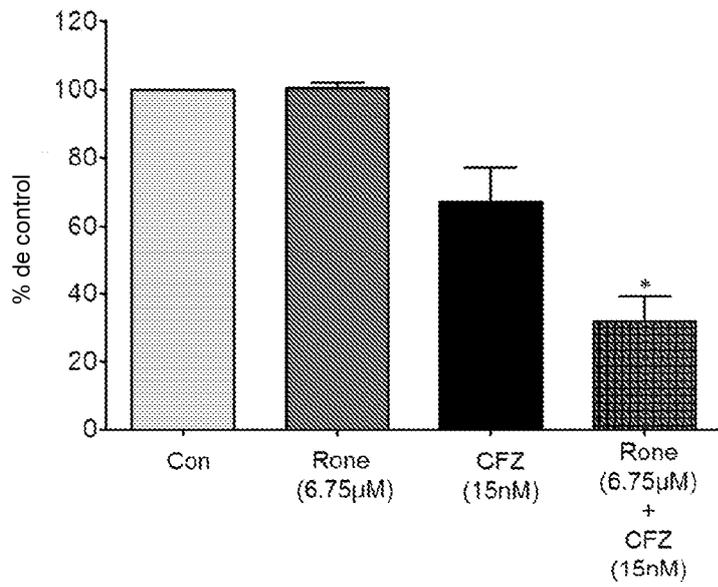


Figura 4

Experimentos de combinación de Carfilzomib y Ronaparstat



\*  $p < 0,05$  frente a CFZ solo