

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 972**

51 Int. Cl.:

A61K 31/517 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/565 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/566 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05746231 .9**
96 Fecha de presentación: **26.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1763352**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54 Título: **Producto de combinación que comprende un inhibidor AZD0530 de quinasa Src y un anti-estrógeno o inhibidor de EGFR-TK**

30 Prioridad:

29.05.2004 GB 0412074

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)
151 85 Södertälje , SE**

72 Inventor/es:

GREEN, TIM, PAUL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 972 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

Producto de combinación que comprende un inhibidor AZD0530 de quinasa Src y un anti-estrógeno o inhibidor de EGFR-TK

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una combinación que comprende un anti-estrógeno y un inhibidor particular de la familia Src de tirosina quinasas no receptoras según se reivindica en la reivindicación 1. La combinación de la invención es útil en un método para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de mama, o en un método para el retraso del progreso de cánceres de este tipo. La invención se refiere también a una
10 composición farmacéutica que comprende una combinación de este tipo y al uso de la misma en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer o en la fabricación de un medicamento para uso en el retraso del progreso del cáncer.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una combinación que comprende un inhibidor de tirosina quinasa (TK – siglas en inglés) y del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR – siglas en inglés) y un inhibidor particular de la familia Src de tirosina quinasas no receptoras según se reivindica en la reivindicación 8. Esta combinación de la invención es útil en un método para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de cabeza y
20 cuello, o en un método para el retraso del progreso de cánceres de este tipo. Este aspecto de la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una combinación de este tipo y al uso de la misma en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer, particularmente de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello, o en la fabricación de un medicamento para uso en el retraso del progreso de cánceres de este tipo.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una combinación que comprende un anti-estrógeno, un inhibidor de TK del EGFR y un inhibidor particular de la familia Src de tirosina quinasas no receptoras según se reivindica en la reivindicación 14. La combinación de la invención es útil en un método para el tratamiento del cáncer, particularmente del cáncer de mama, o en un método para el retraso del progreso de cánceres de este tipo. Este aspecto de la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una combinación de
30 este tipo y al uso de la misma en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento del cáncer o en la fabricación de un medicamento para uso en el retraso en el progreso del cáncer.

Las opciones actuales para tratar el cáncer incluyen la resección quirúrgica, terapia de radiación con haces
35 externos y/o quimioterapia sistémica. Éstas tienen un éxito parcial en algunas formas del cáncer, pero tienen menos éxito en otras. Existe una clara necesidad de nuevos tratamientos terapéuticos para tratar el cáncer.

Muchos de los actuales regímenes de tratamiento para enfermedades de proliferación celular tal como cáncer utilizan compuestos que inhiben la síntesis de ADN. Compuestos de este tipo son tóxicos para células en general, pero su efecto tóxico sobre células de rápida división tales como células tumorales puede ser beneficioso.
40 Estrategias alternativas a agentes antitumorales que actúan mediante mecanismos distintos de la inhibición de la síntesis de ADN tienen el potencial de exhibir una selectividad potenciada de la acción.

En los últimos años se ha descubierto que una célula puede convertirse en cancerosa en virtud de la transformación de una parte de su ADN en un oncogen, *es decir*, un gen que tras la activación, conduce a la
45 formación de células tumorales malignas (Bradshaw, *Mutagenesis*, 1986, 1, 91). Varios oncogenes de este tipo dan lugar a la producción de péptidos que son receptores para factores de crecimiento. La activación del complejo receptor del factor de crecimiento conduce subsiguientemente a un incremento en la proliferación celular. Es sabido, por ejemplo, que varios oncogenes codifican enzimas tirosina quinasas y que determinados receptores del factor de crecimiento son también enzimas tirosina quinasa (Yarden, *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 1988, 57, 443; Larsen *et al.*, *Ann. Reports in Med. Chem.*, 1989, Capítulo 13). El primer grupo de tirosina quinasas a identificar surgió de oncogenes virales de este tipo, por ejemplo la tirosina quinasa pp60^{v-Src} (conocida de otra manera como v-Src), y las correspondientes tirosina quinasas en células normales, por ejemplo la tirosina quinasa pp60^{c-Src} (conocida de otro modo como c-Src).

55 Las tirosina quinasas receptoras son importantes en la transmisión de señales bioquímicas que inician la replicación de las células. Son enzimas grandes que se extienden sobre la membrana celular y que poseen un dominio de unión extracelular para factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y una parte intracelular que actúa como una quinasa para fosforilar aminoácidos tirosina en proteínas y, por lo tanto,

influir sobre la proliferación de las células. Se conocen diversas clases de tirosina quinasas receptoras (Wilks, Advances in Cancer Research, 1993, 60, 43-73) basadas en familias de factores de crecimiento que se unen a diferentes tirosina quinasas receptoras. La clasificación incluye tirosina quinasas receptoras de Clase I que comprenden la familia EGF de tirosina quinasas receptoras tales como los receptores de EGF, TGF α , Neu y erbB, 5 tirosina quinasas receptoras de Clase II que comprenden la familia insulina de tirosina quinasas receptoras tales como los receptores de insulina e IGF1 y el receptor relacionado con insulina (IRR – siglas en inglés) y tirosina quinasas receptoras de Clase III que comprenden la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF – siglas en inglés) de tirosina quinasas receptoras tales como los receptores de PDGF α , PDGF β y de factor estimulante de colonias 1 (CSF1 – siglas en inglés).

Es también sabido que determinadas tirosina quinasas pertenecen a la clase de tirosina quinasas no receptoras que están situadas de manera intracelular y están implicadas en la transmisión de señales bioquímicas tales como las que influyen sobre la motilidad, diseminación y capacidad de invasión de células tumorales y, 10 subsiguientemente, en el desarrollo de tumores metastásicos (Ullrich *et al.*, Cell, 1990, 61, 203-212, Bolen *et al.*, FASEB J., 1992, 6, 3403-3409, Brickell *et al.*, Critical Reviews in Oncogenesis, 1992, 3, 401-406, Bohlen *et al.*, Oncogene, 1993, 8, 2025-2031, Courtneidge *et al.*, Semin. Cancer Biol., 1994, 5, 239-246, Lauffenburger *et al.*, Cell, 1996, 84, 359-369, Hanks *et al.*, BioEssays, 1996, 19, 137-145, Parsons *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 1997, 9, 187-192, Brown *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1287, 121-149 y Schlaepfer *et al.*, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1999, 71, 435-478). Se conocen diversas clases de tirosina 15 quinasas no receptoras que incluyen la familia Src, tal como las tirosina quinasas Src, Lyn, Fyn y Yes, la familia Ab1 tales como Abl y Arg y la familia Jak, tal como Jak 1 y Tyk 2.

Es sabido que la familia Src de tirosina quinasas no receptoras está altamente regulada en células normales y en ausencia de estímulos extracelulares se mantienen en una conformación inactiva. Sin embargo, algunos miembros 25 de la familia Src, por ejemplo la tirosina quinasa c-Src, está con frecuencia significativamente activada (cuando se compara con niveles de células normales) en cánceres humanos comunes tales como el cáncer gastrointestinal, por ejemplo cáncer de colon, rectal y de estómago (Cartwright *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 558-562 y Mao *et al.*, Oncogene, 1997, 15, 3083-3090) y cáncer de mama (Muthuswamy *et al.*, Oncogene, 1995, 11, 1801-1810). La familia Src de tirosina quinasas no receptoras también ha sido localizada en otros cánceres humanos 30 comunes tales como cánceres de pulmón de células no pequeñas (NSCLCs – siglas en inglés) incluidos adenocarcinomas y cáncer de pulmón de células escamosas (Mazurenko *et al.*, European Journal of Cancer, 1992, 28, 372-7), cáncer de vejiga (Fanning *et al.*, Cancer Research, 1992, 52, 1457-62), cáncer de esófago (Jankowski *et al.*, Gut, 1992, 33, 1033-8), cáncer de próstata, cáncer de ovarios (Wiener *et al.*, Clin. Cancer Research, 1999, 5, 2164-70) y cáncer pancreático (Lutz *et al.*, Biochem. and Biophys. Res Comm., 1998, 243, 503-8). Dado que se 35 están sometiendo a ensayo tejidos tumorales humanos adicionales para la familia Src de tirosina quinasas no receptoras, se espera que se establezca su predominio generalizado.

Se conoce, además, que el papel predominante de tirosina quinasa no receptora c-Src consiste en regular el conjunto de complejos de adhesión focal a través de la interacción con un cierto número de proteínas 40 citoplásmicas que incluyen, por ejemplo, la quinasa de adhesión focal y paxilina. Además, c-Src está acoplada a vías de señalización que regulan el citoesqueleto de actina que facilita la motilidad de las células. De igual manera, papeles importantes lo juegan las tirosina quinasas no receptoras c-Src, c-Yes y c-Fyn en la señalización mediada por integrina y en la interrupción de uniones célula-célula dependientes de cadherina (Owens *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2000, 11, 51-64 y Klinghoffer *et al.*, EMBO Journal, 1999, 18, 2459-2471). La motilidad celular se requiere necesariamente para que un tumor localizado progrese a través de las fases de diseminación en el 45 torrente sanguíneo, la invasión de otros tejidos y el inicio del desarrollo del tumor metastásico. Por ejemplo, un progreso de tumor de colon de una enfermedad metastásica invasiva de localizada a diseminada, se ha correlacionado con una actividad de tirosina quinasa no receptora c-Src (Brunton *et al.*, Oncogene, 1997, 14, 283-293, Fincham *et al.*, EMBO J., 1998, 17, 81-92 y Verbeek *et al.*, Exp. Cell Research, 1999, 248, 531-537).

Por consiguiente, se ha reconocido que un inhibidor de tirosina quinasas no receptoras de este tipo sería valioso como un inhibidor selectivo de la motilidad de células tumorales y como un inhibidor selectivo de la diseminación y 50 capacidad de invasión de células cancerígenas en mamíferos que conducen a la inhibición del desarrollo del tumor metastásico. En particular, un inhibidor de tirosina quinasas no receptoras de este tipo sería valioso como un agente anti-invasivo para uso en la contención y/o tratamiento de la enfermedad de tumor sólido.

En las solicitudes de patentes internacional WO 01/94341 y WO 02/16352 se establece que los inhibidores de Src 55 quinasa descritos en las mismas se pueden administrar como una terapia única o pueden implicar, además de los

derivados de quinazolina de esas invenciones, una cirugía o radioterapia o quimioterapia convencional. Se estableció que una quimioterapia de este tipo incluía una o más de las siguientes categorías de agentes antitumorales:

- 5 (i) otros agentes anti-invasión (por ejemplo inhibidores de metaloproteinasa tales como marimastat e inhibidores de la función del receptor activador del plasminógeno uroquinasa);
- (ii) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos tal como se utiliza en la oncología médica tales como agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, nitrógeno mostaza, melfalan, clorambucilo, busulfano y nitrosourea); antimetabolitos (por ejemplo antifolatos tales como fluoropirimidinas tales como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina arabinósido e hidroxurea, o, por ejemplo, uno de los antimetabolitos preferidos descritos en la solicitud de patente europea nº 562734 tal como ácido (2S)-2-{o-fluoro-p-[N-{2,7-dimetil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-6-ilmetil)-N-(prop-2-inil)amino]benzamido}-4-(tetrazol-5-il)butírico); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas tales como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo alcaloides vinca tales como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides tales como taxol y taxotere); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecan y camptotecina);
- 10 (iii) agentes citostáticos tales como anti-estrógenos (por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona). antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo tales como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5 α -reductasa tal como finasterida;
- 20 (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento, por ejemplo inhibidores de este tipo incluyen anticuerpos del factor de crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento, inhibidores de tirosina quinasa e inhibidores de serina/treonina quinasa, por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo los inhibidores de tirosina quinasa de EGFR, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (ZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (CP 358774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas y, por ejemplo, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos; y
- 25 (v) agentes anti-angiogénicos tales como los que inhiben el factor de crecimiento endotelial vascular tales como los compuestos descritos en las solicitudes de patente internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354 y los que actúan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de integrina $\alpha v \beta 3$ y angiostatina).
- 30

35 Combinación de un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de Src

Los carcinomas de mama tempranos y avanzados son, generalmente, hormona-dependientes y, con ello, sensibles a la inhibición de la señalización del crecimiento impulsado por estrógenos por medio del receptor de estrógenos. La ablación con estrógenos se puede conseguir por medio de una castración quirúrgica. Preferiblemente, los efectos de estrógenos también se pueden contrarrestar utilizando una terapia con anti-estrógenos, por ejemplo utilizando un anti-estrógeno no esteroide tal como tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno, particularmente utilizando tamoxifeno. Los efectos de estrógenos también se pueden contrarrestar utilizando otras terapias con anti-estrógenos, por ejemplo utilizando un regulador negativo del receptor de estrógenos esteroide tal como fulvestrant.

45 También se ha reconocido que el crecimiento de otros determinados cánceres tales como cáncer de pulmón puede ser hormono-dependiente. Por ejemplo, se han detectado receptores de estrógenos en tejido tumoral de pulmón. Con ello, cánceres de este tipo pueden ser sensibles a la inhibición de la señalización del crecimiento impulsado por estrógenos por medio del receptor de estrógenos.

50 Sin embargo, la resistencia a la terapia endocrina presenta un obstáculo principal en el tratamiento del cáncer de mama. Tumores que responden inicialmente a un tratamiento anti-hormonas desarrollan posteriormente una resistencia que da como resultado un progreso del tumor. En los últimos años, se ha iniciado una investigación para comprender más sobre los mecanismos en los que se fundamenta el desarrollo de la resistencia a terapias endocrinas y el progreso de la enfermedad en cáncer de mama y próstata. Se han desarrollado modelos de células *in vitro* que reflejan la adquisición de resistencia a agentes anti-hormonas, particularmente la resistencia a tamoxifeno en cáncer de mama. Se ha demostrado que la resistencia en células de cáncer de mama humanas MCF7 al anti-estrógeno tamoxifeno es mediada, en parte, por la elevada expresión y activación de componentes de

la vía de señalización de EGFR (Knowlden *et al.*, Endocrinology, 2003, 144, 1032-1044). También se ha demostrado que receptores del factor de crecimiento tales como EGFR estimulan la migración de células por parte de un mecanismo que se piensa implica la inducción de la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK – siglas en inglés) (Price *et al.*, Cell. Commun. Adhesion, 2002, 9, 87-102). El factor más importante que afecta a la mortalidad de pacientes de cáncer es el desarrollo en sus tumores de células cancerígenas que tienen un fenotipo invasivo. Células de este tipo muestran una mejora de la motilidad y capacidad de invasión de las células que refleja el progreso de la enfermedad *in vivo*.

A partir de la solicitud de patente internacional WO 01/94341 se conoce que determinados derivados de quinazolina sustituidos en posición 5 poseen una actividad inhibidora de quinasa Src y son agentes anti-invasivos útiles en el tratamiento de diversos cánceres, incluido el cáncer de mama. El compuesto 4-(6-cloro-2,3-metilendioxi-anilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloxiquinazolina se describe como Compuesto nº 73 en el Ejemplo 14 de dicho documento. Ese compuesto es un potente inhibidor de quinasa Src y se identifica en esta memoria por medio del número de código AZD0530.

En la presente invención se ha demostrado que la actividad de la quinasa Src aumenta y es una vía dominante que controla la capacidad invasiva incrementada de células resistentes a anti-hormonas. Se ha demostrado que la inhibición de quinasa Src tiene como resultado una reducción de la invasión de las células, sugiriendo además un papel importante de la señalización de quinasa Src en células resistentes de este tipo. De manera inesperada, se ha encontrado que es muy eficaz una señalización particular a partir de las descripciones genéricas de terapias de combinación mencionadas en las solicitudes de patente internacional WO 01/94341 y WO 02/16352. En particular, la combinación de un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, produce resultados sorprendentemente eficaces. Más específicamente, la combinación de un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src produce un efecto mayor que el que se puede conseguir mediante la administración de un anti-estrógeno o el inhibidor AZD0530 de quinasa Src solo.

Mientras que en la descripción en las solicitudes de patente internacional WO 01/94341 y WO 02/16352 se indica que los inhibidores de quinasa Src descritos en las mismas se pueden utilizar en combinación con anti-estrógenos (por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), no existe descripción específica del uso en combinación de un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src, ni de que una combinación de este tipo produzca resultados sorprendentemente eficaces.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una combinación adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se reivindica en la reivindicación 1.

Se ha de entender que la expresión “una combinación” prevé la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes de la combinación. En un aspecto de la invención, “una combinación” prevé la administración simultánea del anti-estrógeno y el inhibidor de Src. En un aspecto adicional de la invención, “una combinación” prevé la administración secuencial de esos agentes. En otro aspecto de la invención, “una combinación” prevé la administración separada de esos agentes. En los casos en los que la administración de esos agentes es secuencial o separada, la demora en la administración del segundo componente no debería ser tal que se pierda el beneficio del efecto sinérgico de la terapia de combinación. Así, para evitar toda duda, la presente invención proporciona una combinación que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se reivindica en la reivindicación 1, para uso simultáneo, secuencial o separado en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, o para uso simultáneo, secuencial o separado del retraso sinérgico del progreso del cáncer de mama.

Un anti-estrógeno adecuado es tamoxifeno o fulvestrant. Un anti-estrógeno más preferido es tamoxifeno. El anti-estrógeno tamoxifeno (también conocido por el nombre comercial de AstraZeneca “Nolvadex”) es el isómero trans de 1-(*p*-2-dimetilaminoetoxifenil)-1,2-difenilbut-1-eno que se describe en la patente de EE.UU. nº 4.536.516. Un nombre alternativo para tamoxifeno es (Z)-2-[*p*-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]etildimetilamina.

El anti-estrógeno esteroide fulvestrant (también conocido por el nombre comercial de AstraZeneca “Faslodex”) y el número de código ICI 182.780 es el primero de una nueva clase de potentes anti-estrógenos puros que está completamente exenta del agonista parcial, actividad similar a estrógeno que es asociada con anti-estrógenos convencionales tales como tamoxifeno. El compuesto actúa como un regulador negativo del receptor de estrógenos. Fulvestrant ha demostrado ya una eficacia en ensayos clínicos en mujeres, cuyo cáncer de mama

había progresado tras terapia con tamoxifeno. El nombre químico para fulvestrant es 7- α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentilsulfonil)nonil]estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol, y el compuesto se describe en la solicitud de patente europea n° 0 138 504 en el Ejemplo 35 y en la reivindicación 4.

5 Además, un anti-estrógeno adecuado incluye el inhibidor de aromatasa no esteroide anastrozol o letrozol, o el inhibidor de aromatasa esteroide exemestano. Un inhibidor de aromatasa anti-estrógeno más preferido es anastrozol o letrozol. Por ejemplo, anastrozol (también conocido por el nombre comercial "Arimidex") tiene como ingrediente activo el compuesto 2,2'-[5-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-fenileno]di(2-metil-propionitrilo) que se describe en la patente de EE.UU. re-expedida n° 36.617. Un nombre alternativo para anastrozol es 2,2'-
10 [5-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-fenileno]bis(propionitrilo).

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de AZD0530 es, por ejemplo, una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una sal por adición de ácidos con un ácido inorgánico u orgánico tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, trifluoroacético, cítrico, maleico o fumárico, por ejemplo una sal del ácido mono- o di-fumárico.

Tal como se establece antes en esta memoria, la combinación de la presente invención que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src también puede ser útil en el tratamiento sinérgico de cáncer de pulmón, dado que en tejido tumoral de pulmón se han detectado receptores de estrógenos.

20 El tratamiento de cáncer de la presente invención incluye un efecto anti-tumoral que puede ser evaluado por medios convencionales tales como la tasa de respuesta, el tiempo hasta el progreso de la enfermedad y/o la tasa de supervivencia. Efectos anti-tumorales de la presente invención incluyen, pero no se limitan a inhibición del desarrollo del tumor, retraso del desarrollo del tumor, regresión del tumor, contracción del tumor, tiempo incrementado para el desarrollo renovado del tumor tras el cese del tratamiento y retraso del progreso de la enfermedad. Por ejemplo, se espera que cuando la combinación de la presente invención se administre a un animal homeotermo tal como un ser humano, que necesita tratamiento contra el cáncer que implica un tumor sólido, el tratamiento producirá un efecto beneficioso, tal como se mide, por ejemplo, por uno o más del grado del efecto anti-tumoral, la tasa de respuesta, el tiempo hasta el progreso de la enfermedad y la tasa de supervivencia.

30 Tal como se describe antes en esta memoria, la combinación de la presente invención es particularmente útil en el tratamiento sinérgico o la profilaxis del cáncer de mama. De acuerdo con la presente invención, un tratamiento de combinación se define como el que proporciona un efecto sinérgico si el efecto es terapéuticamente superior, según se mide, por ejemplo, por el grado de la respuesta, la tasa de respuesta, el tiempo hasta el progreso de la enfermedad o el período de supervivencia respecto al que se puede conseguir tras dosificar uno u otro de los componentes del tratamiento de combinación a su dosis convencional. Por ejemplo, el efecto del tratamiento de combinación es sinérgico si el efecto es terapéuticamente superior al efecto alcanzable con un anti-estrógeno o el inhibidor ADZ0530 de quinasa Src solo. Además, el efecto del tratamiento de combinación es sinérgico si se obtiene un efecto beneficioso en un grupo de pacientes que no responde (o responde deficientemente) a un anti-estrógeno o al inhibidor ADZ0530 de quinasa Src solo. Además, el efecto del tratamiento de combinación se define como el que proporciona un efecto sinérgico si uno de los componentes se dosifica a su dosis convencional, y el otro componente se dosifica a una dosis reducida y el efecto terapéutico, según se mide, por ejemplo, mediante el grado de la respuesta, la tasa de respuesta, el tiempo hasta el progreso de la enfermedad o el período de supervivencia, es equivalente o mejor que el que se puede alcanzar tras dosificar cantidades convencionales de uno cualquiera de los componentes del tratamiento de combinación. En particular, se considera que la sinergia está presente si la dosis convencional del anti-estrógeno o el inhibidor ADZ0530 de quinasa Src se puede reducir sin perjuicio de uno o más del grado de respuesta, la tasa de respuesta, el tiempo hasta el progreso de la enfermedad y los datos de supervivencia, en particular sin detrimento de la duración de la respuesta, pero con efectos secundarios menores y/o menos problemáticos que los que se producen cuando se utilizan dosis
45 convencionales de cada uno de los componentes.

50 La combinación terapéutica de la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica adecuada. De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende una combinación según se define antes en esta memoria en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones descritas en esta memoria pueden estar en una forma adecuada para la administración por vía oral, por ejemplo en forma de un comprimido o cápsula, para la inyección parenteral (incluida intravenosa,

- subcutánea, intramuscular, intravascular o por infusión), por ejemplo en forma de una disolución, suspensión o emulsión estéril, para la administración tópica, por ejemplo en forma de un ungüento o crema, para la administración rectal, por ejemplo en forma de un supositorio, o la vía de administración puede ser por inyección directa en el tumor o por suministro zonal o por suministro local. En otras realizaciones de la presente invención, el
- 5 inhibidor de quinasa Src del tratamiento de combinación se puede suministrar por vía percutánea, intravenosa o subcutánea, o mediante endoscopio o dentro de la tráquea, de la lesión, del peritoneo o del tumor. En general, las composiciones descritas en esta memoria se pueden preparar de una manera convencional utilizando excipientes o vehículos convencionales que son bien conocidos en la técnica.
- 10 Excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para una formulación de comprimido incluyen, por ejemplo, excipientes inertes tales como lactosa, carbonato sódico, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes granulantes y desintegrantes tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes ligantes tales como gelatina o almidón; agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; agentes conservantes tales como 4-hidroxibenzoato de etilo o propilo, y anti-oxidantes tales como ácido ascórbico. Las
- 15 formulaciones de comprimido pueden estar no revestidas o revestidas con el fin de modificar su desintegración y la subsiguiente absorción del ingrediente activo dentro del tracto gastrointestinal, o para mejorar su estabilidad y/o aspecto, en cualquier caso utilizando agentes de revestimiento convencionales y procesos bien conocidos en la técnica.
- 20 Composiciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura, en las que el ingrediente activo está mezclado con un excipiente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda, en las que el ingrediente activo está mezclado con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.
- 25 Las composiciones de la presente invención se presentan de manera ventajosa en forma de dosificación unitaria.
- El componente anti-estrógeno se puede administrar de acuerdo con la práctica clínica conocida. Por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de mama avanzado, se puede utilizar diariamente una dosis oral de tamoxifeno entre 0,5 y 100 mg, de manera conveniente se utiliza una dosis diaria entre 5 y 30 mg. Si está presente un componente
- 30 inhibidor de aromataza anti-estrogénico, éste se puede administrar de acuerdo con la práctica clínica conocida. Por ejemplo, se puede utilizar una dosis oral diaria de anastrozol entre 0,005 y 25 mg, convenientemente se utiliza una dosis entre 0,5 y 5 mg. Por ejemplo, se puede utilizar una dosis oral diaria de exemestano entre 5 y 200 mg, convenientemente se utiliza una dosis entre 10 y 40 mg.
- 35 Si está presente fulvestrant, éste se administrará generalmente de modo que se proporcione una dosis no tóxica eficaz. El tamaño de la dosis variará naturalmente de acuerdo con la vía de administración al paciente. En general, se pueden emplear dosis convencionales de fulvestrant. Más particularmente, se administra una dosis diaria en el intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 10 mg a 5 g, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a 1 g, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg a 300 mg de compuesto (es decir, aproximadamente 0,2 mg/kg a 100
- 40 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a 6 mg/kg de peso corporal) administrada, si se requiere, en dosis divididas. De manera conveniente, una dosis de fulvestrant se administra de modo que sea suficiente para alcanzar una respuesta a la enfermedad en el paciente, dosis de fulvestrant que se pueden utilizar incluyen las que se pueden administrar en una formulación de actuación corta de 1 a 15 mg al día, dependiendo de la vía de
- 45 administración, o en una forma de actuación prolongada equivalente a 200 hasta 300 mg de compuesto al mes. Una vía de administración preferida es mediante inyección intramuscular. Las dosis deberían administrarse con el fin de conseguir niveles en suero sanguíneo de fulvestrant de 5 a 20 ng/ml. Una formulación preferida consiste en disolver una dosis adecuada de fulvestrant, por ejemplo 250 mg, en una muestra de 5 ml de aceite de ricino que contiene etanol al 10% p/v, alcohol bencílico al 10% p/v y benzoato de bencilo al 15% p/v. Una formulación de este
- 50 tipo debería inyectarse por vía intramuscular y proporcionará niveles terapéuticos de fulvestrant durante alrededor de 28 días.
- El inhibidor AZD0530 de quinasa Src se administrará, generalmente, de modo que se reciba una dosis diaria en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 75 mg/kg de peso corporal, administrada si se requiere en dosis divididas.
- 55 En general, se administrarán dosis menores cuando se emplee una vía parenteral. Así, por ejemplo, para administración intravenosa, se utilizará generalmente una dosis en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal. De manera similar, para la administración por inhalación, se utilizará una dosis en el intervalo, por ejemplo, de 0,05 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, se prefiere la administración por

vía oral, particularmente en forma de comprimido. Generalmente, para la administración por vía oral se utilizará una dosis en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal. Particularmente, se utilizará una dosis oral en el intervalo, por ejemplo, de 0,2 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal; más particularmente, se utilizará una dosis oral en el intervalo, por ejemplo, de 0,5 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal. Típicamente, formas de dosificación unitaria contendrán aproximadamente 0,5 mg a 0,5 g del inhibidor de quinasa Src; más particularmente, formas de dosificación unitaria contendrán aproximadamente 25 mg a 250 mg de inhibidor de quinasa Src.

Las dosificaciones y programas descritos antes en esta memoria pueden variarse de acuerdo con el estado particular de la enfermedad y el estado general del paciente. Por ejemplo, puede ser necesario o deseable reducir las dosis antes mencionadas de los componentes del tratamiento de combinación con el fin de reducir la toxicidad. El programa de dosis puede determinarse por parte del médico que esté tratando a cualquier paciente particular utilizando su experiencia y conocimiento profesionales.

Se apreciará que la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye una composición que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo proporciona convenientemente el producto de combinación terapéutica de la invención para la administración simultánea en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.

De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama que comprende un anti-estrógeno, el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye también composiciones separadas que comprenden una primera composición que comprende un anti-estrógeno y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y una segunda composición que comprende el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo proporciona convenientemente la combinación terapéutica de la invención para la administración secuencial o separada en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, pero las composiciones separadas también se pueden administrar simultáneamente.

De manera conveniente, una composición farmacéutica de este tipo de la invención comprende un kit que comprende un primer recipiente con una composición adecuada que contiene el anti-estrógeno y un segundo recipiente con una composición adecuada que contiene el inhibidor AZD0530 de quinasa Src. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende:

- a) un anti-estrógeno junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una primera forma de dosificación unitaria (tal como un comprimido o cápsula);
- b) el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c) medios de recipiente para contener a dichas primera y segunda formas de dosificación unitarias.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una combinación según se define antes en esta memoria para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.

De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona también una composición farmacéutica para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende una combinación según se define antes en esta memoria, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un beneficio particular sorprendente de la presente invención es que el cáncer de mama que puede ser tratado con la combinación de la invención puede ser no sólo cáncer de mama en pacientes que no hayan sido tratados con una terapia con anti-estrógenos, sino también cáncer de mama que haya sido tratado con una terapia con anti-estrógenos y que no haya respondido a este tipo de terapia o que, después de haber sido tratado inicialmente con este tipo de terapia, se haya vuelto resistente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de una combinación según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una combinación según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama resistente a anti-estrógenos.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación según se define antes en esta memoria.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de mama resistente a anti-estrógenos, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación según se define antes en esta memoria.

15 De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un anti-estrógeno según se define antes en esta memoria, antes, simultáneamente con o después de la administración de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración simultánea, secuencial o separada a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación según se define antes en esta memoria.

25 De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un anti-estrógeno según se define antes en esta memoria y la administración simultánea, secuencial o separada de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 La presente invención se refiere también a una combinación que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el retraso del progreso del cáncer de mama desde un estado de respuesta hormonal a un estado de no respuesta hormonal, *es decir*, para inhibir la transformación de células de cáncer de mama desde un estado no invasivo hormona-dependiente a un estado más invasivo hormona-independiente. Por consiguiente, la combinación tiene un efecto beneficioso sobre el tiempo hasta el progreso de la enfermedad y la tasa de supervivencia.

35 De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona una combinación que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el retraso del progreso de cáncer de mama desde un estado de respuesta hormonal a un estado de no respuesta hormonal.

40 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la combinación para inhibir la transformación de células de mama en células cancerosas, *es decir*, la combinación de compuestos proporciona un efecto quimiopreventivo del cáncer de mama.

45 En el epitelio de mama humano normal en la mujer pre-menopáusica, las células tienen núcleos de un tamaño convencional y niveles de cromatina convencionales. Es sabido que existen una serie de cambios en el aspecto del epitelio de mama normal a medida que se desarrolla el cáncer. En tejido epitelial normal, el estrógeno estimula el desarrollo normal e induce la expresión del receptor de progesterona que permite que la progesterona medie en el desarrollo de la célula epitelial de mama. El desarrollo constitutivo de células epiteliales de este tipo comprende la regeneración de células de la línea de referencia, no dependiente de estrógenos. En mujeres pre-menopáusicas, la enfermedad de tejido epitelial de mama se vuelve por primera vez evidente cuando, en general, el tamaño de los núcleos ha comenzado a aumentar y los niveles de cromatina han comenzado a aumentar. Estos son cambios pre-malignos y en esta fase la afección se conoce (paradójicamente) como Carcinoma Ductal In Situ (DCIS – siglas en inglés). A medida que progresa la enfermedad y las células de DCIS se transforman en células malignas, las

células tienen núcleos o nucléolos acusadamente ampliados y también niveles de cromatina acusadamente incrementados.

5 Los autores de la invención han encontrado, inesperadamente, que la combinación de la presente invención tiene efectos no sólo sobre el desarrollo de células de cáncer de mama transformadas, sino también sobre el desarrollo constitutivo de células normales y de células anormales, no malignas, en el seno. La combinación de la presente invención puede utilizarse, por lo tanto, para reducir, preferiblemente para inhibir la transformación de células de mama en un estado maligno. La combinación de un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src de la presente invención pueden inhibir la transformación de células de mama normales en un estado de DCIS. Dicha combinación puede también inhibir la transformación de células de DCIS en un estado maligno.

Además, es de suponer que la combinación tendrá un efecto beneficioso en la prevención del brote del cáncer de mama en mujeres genéticamente predispuestas a la enfermedad.

15 De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la reducción, preferiblemente inhibición de la transformación de células de mama normales en un estado de DCIS.

20 De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también una combinación que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la reducción, preferiblemente inhibición de la transformación de células de mama normales o células DCIS en un estado maligno.

25 Un tratamiento de combinación de la presente invención tal como se define antes en esta memoria se puede administrar como una sola terapia o puede implicar, además, cirugía o radioterapia o la administración de un agente quimioterapéutico.

La cirugía puede comprender la etapa de la resección del tumor parcial o completa antes de, durante o después de la administración del tratamiento de combinación de la presente invención.

30 Agentes quimioterapéuticos para uso opcional con el tratamiento de combinación de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, las siguientes categorías de agentes terapéuticos:

- (i) fármacos antiproliferantes/antineoplásticos y combinaciones de los mismos tal como se utilizan en la oncología médica (por ejemplo carboplatino y cisplatino);
- 35 (ii) agentes citostáticos, por ejemplo inhibidores de la función del factor de crecimiento tal como anticuerpos del factor de crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab y el anticuerpos anti-erbB1 cetuximab), inhibidores de tirosina quinasa del receptor Clase I (por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidermal), inhibidores de la tirosina quinasa del receptor de Clase II (por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento de insulina tales como inhibidores del receptor de IGF1 según se describe, por ejemplo, por Chakravarti *et al.*, Cancer Research, 2002, 62, 200-207), inhibidores de serina/treonina quinasa, inhibidores de farnesil transferasa e inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas;
- 40 (iii) agentes anti-angiogénicos tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo, el anticuerpo del factor de crecimiento de células endoteliales anti-vascular bevacizumab y los inhibidores de tirosina quinasa del receptor de VEGF tales como 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474; Ejemplo 2 en el documento WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171; en el documento WO 00/47212), vatalanib (PTK787; documento WO 98/35985) y SU11248 (documento WO 01/60814));
- 45 (iv) agentes de lesión vascular tales como los compuestos descritos en las solicitudes de patente internacional WO 99/02166; WO 00/40529; WO 00/41669; WO 01/92224; WO 02/04434 y WO 02/08213;
- 50 (v) modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo interferón); y
- 55 (vi) un bisfosfonato tal como ácido tiludrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido risedrónico, ácido zoledrónico, ácido clodrónico, ácido neridrónico, ácido pamidrónico y ácido alendrónico.

Por ejemplo, la administración de una combinación de un anti-estrógeno, el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la radiación ionizante pueden producir efectos anticancerígenos tales como efectos anti-tumorales que son mayores que los conseguidos si se omite la radiación.

5 De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo tal como el hombre que necesita un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un anti-estrógeno, antes, simultáneamente con o después de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y antes, simultáneamente con o después de una cantidad eficaz de radiación ionizante.

10 La radiación ionizante se puede administrar a dicho animal homeotermo tal como el hombre en el período de una semana a antes de una semana después de la administración de la combinación de la presente invención según se define antes en esta memoria.

15 Se puede administrar radioterapia de acuerdo con las prácticas conocidas en la radioterapia clínica. Las dosificaciones de radiación ionizante serán las conocidas para uso en la radioterapia clínica. La terapia de radiación utilizada incluirá, por ejemplo, el uso de rayos γ , rayos X y/o el suministro dirigido de radiación procedente de radioisótopos. Otras formas de factores de lesión del ADN están también incluidas en la presente invención tales como microondas e irradiación UV. Por ejemplo, los rayos X se pueden dosificar en
20 dosis diarias de 1,8-2,0 Gy, durante 5 días a la semana durante 5-6 semanas.

Normalmente, una dosis fraccionada total se encontrará en el intervalo de 45-60 Gy. Dosis mayores sencillas, por ejemplo de 5-10 Gy se pueden administrar como parte de un curso de radioterapia. Dosis sencillas se pueden administrar por vía intra-operativa. Se puede utilizar radioterapia hiperfraccionada en la que pequeñas dosis de rayos X se administran de modo regular a lo largo de un período de tiempo, por ejemplo 0,1 Gy por hora a lo largo de un cierto número de días. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la potencia y del tipo de radiación emitida y de la absorción por parte de las células.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de una combinación según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo tal como el hombre, que está siendo tratado con radiación ionizante para proporcionar el tratamiento sinérgico del cáncer de mama.

Combinación de un TKI de EGFR y el inhibidor AZD0530 de Src

35 La presente invención se refiere también a una combinación que comprende un inhibidor de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (al que se alude en esta memoria como "EGFR TKI") y un inhibidor particular de la familia Src de tirosina quinasas no receptoras. La combinación de la invención es útil en un método para el tratamiento de cáncer.

40 Existe una amplia evidencia de altos niveles de expresión de EGFR en un cierto número de tumores humanos y que la expresión incrementada se puede correlacionar con el progreso de la enfermedad y un pronóstico deficiente para el paciente (Nicholson *et al.*, Breast Cancer Research Treatment, 1994, 29, 117-125 y European Journal of Cancer, 2001, 37, Suplemento 4, págs. 9-15). Por ejemplo, se ha demostrado que la resistencia en células de
45 cáncer de mama humanas MCF7 al anti-estrógeno tamoxifeno es mediada, en parte, por la expresión y activación elevadas de componentes de la vía de señalización de EGFR (Knowlden *et al.*, Endocrinology, 2003, 144, 1032-1044). También se demostró en dicho documento que el desarrollo basal y estimulado con TGF α de células de cáncer de mama MCF7 resistentes a tamoxifeno podía ser inhibido por parte del EGFR TKI ZD1839.

50 Cánceres que son susceptibles de tratamiento con la combinación de este aspecto de la invención incluyen cáncer esofágico, mieloma, cáncer hepatocelular, pancreático y cervical, tumor de Ewing, neuroblastoma, sarcoma de kaposi, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de pulmón [incluido cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)], cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer renal, linfoma y
55 leucemia. Más particularmente, esta combinación de la presente invención es útil en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, NSCLC y cáncer de cabeza y cuello, o en un método para el retraso del progreso de cánceres de este tipo.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer (particularmente de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de cabeza y cuello) que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según se reivindica en la reivindicación 8.

Ha de entenderse que la expresión "una combinación" prevé la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes de la combinación según se describe antes en esta memoria.

Es sabido que quinazinas de Clase I tales como la familia EGF de tirosina quinazinas receptoras están frecuentemente presentes en cánceres epiteliales humanos comunes tales como cáncer de próstata (*Visakorpi et al.*, Histochem. J., 1992, 24, 481). Por consiguiente, se reconoce que un inhibidor de tirosina quinazinas receptoras debería ser valioso como un inhibidor selectivo del desarrollo de carcinomas de próstata.

A partir de la solicitud de patente europea nº 0566226 y de las solicitudes de patente internacional WO 96/33980 y WO 97/30034 se conoce que determinados derivados de quinazolina que poseen un sustituyente anilino en la posición 4 poseen actividad inhibitora de tirosina quinasa de EGFR, y son inhibidores de la proliferación de tejido cancerígeno, incluido cáncer de próstata. Se ha descrito por J R Woodburn *et al.* en Proc. Amer. Assoc. Cancer Research, 1997, 38, 633 y Pharmacol. Ther., 1999, 82, 241-250 el compuesto N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (también conocido como gefitinib y por el nombre comercial de AstraZeneca "Iressa"). Ese compuesto es un potente EGFR TKI y se identifica en esta memoria en lo que sigue por el número de código ZD1839.

Se conoce además a partir de la solicitud de patente internacional WO 96/30347 que determinados derivados de quinazolina estructuralmente relacionados que poseen un sustituyente anilino en la posición 4 poseen también una actividad inhibitora de tirosina quinasa de EGFR. Se ha descrito en el documento WO 99/55683 que el compuesto N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (ligado a los números de código CP 358774 y OSI-774) es un EGFR TKI. Ese compuesto se conoce ahora como erlotinib y se identifica aquí en lo que sigue por el número de código OSI-774.

Se conoce además a partir de la solicitud de patente internacional WO 97/38983 que determinados otros derivados de quinazolina estructuralmente relacionados que poseen un sustituyente anilino en la posición 4 poseen también una actividad inhibitora de tirosina quinasa de EGFR. Se ha descrito en J. Med. Chem., 1999, 42, 1803-1815 y en el documento WO 00/31048 que el compuesto 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (ligado a los números de código PD 183805 y CI 1033) es un EGFR TKI. Ese compuesto se identifica aquí en lo que sigue por el número de código CI 1033).

Se conoce además a partir de la solicitud de patente internacional WO 97/02266 que determinados otros derivados heterocíclicos estructuralmente relacionados poseen también actividad inhibitora de tirosina quinasa de EGFR. Por ejemplo, el compuesto 4-[(1R)-1-feniletilamino]-6-(4-hidroxifenil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (ligado a los números de código PKI-166, CGP 75166 y CGP 59326) es un EGFR TKI. Ese compuesto se identifica aquí en lo que sigue por el número de código PKI-166.

Se conoce además a partir de la solicitud de patente europea nº 0787722 y de las solicitudes de patente internacional WO 98/50038, WO 99/09016 y WO 99/24037 que otros determinados derivados de quinazolina estructuralmente relacionados que poseen un sustituyente anilino en la posición 4 poseen también actividad inhibitora de tirosina quinasa de EGFR. Por ejemplo, el compuesto N-[4-(3-bromoanilino)quinazolin-6-il]but-2-inamida (ligado a los números de código CL-387785 y EKB-785) es un EGFR TKI. Ese compuesto se identifica aquí en lo que sigue por el número de código CL-387785.

Se conoce además a partir de Nature Medicine, 2000, 6, 1024-1028 y la patente de Estados Unidos de América Nº 6.002.008 que otros derivados de quinolina estructuralmente relacionados que poseen un sustituyente anilino en la posición 4 poseen también actividad inhibitora de tirosina quinasa de EGFR. Por ejemplo, el compuesto 4-(3-cloro-4-fluoroanilino)-3-ciano-6-(4-dimetilaminobut-2(E)-enamido)-7-etoxiquinolina (identificado aquí en lo que sigue por el número de código EKB-569) es un EGFR TKI.

El EGFR TKI se selecciona de ZD1839, OSI-774, CI 1033, PKI-166, CL-387795 y EKB-569. Preferiblemente, el componente EGFR TKI de la combinación es ZD1839 u OSI-774. Más preferiblemente, el componente EGFR TKI

de la combinación es ZD1839.

5 Tal como se establece antes en esta memoria, una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de AZD0530 es, por ejemplo, una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una sal por adición de ácidos con un ácido inorgánico u orgánico tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, trifluoroacético, cítrico, maleico o fumárico. Se pueden emplear sales farmacéuticamente aceptables similares del componente EGFR TKI de este aspecto de la presente invención.

10 Tal como se establece antes en esta memoria, la combinación de la presente invención que comprende un EGFR TKI y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src es útil en el tratamiento sinérgico de cáncer. El tratamiento de cáncer de la presente invención incluye un efecto antitumoral que puede ser evaluado por medios convencionales tal como se describe antes en esta memoria.

15 El tratamiento de combinación de la presente invención se define como que proporciona un efecto sinérgico si el efecto es terapéuticamente superior utilizando criterios análogos a los descritos antes en esta memoria.

20 Una combinación preferida de acuerdo con un aspecto de la presente invención comprende el EGFR TKI ZD1839 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una combinación preferida adicional de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende el EGFR TKI OSI-1774 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 La combinación terapéutica de este aspecto de la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica adecuada. De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, que comprende una combinación de un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones descritas en este aspecto de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada tal como las formas descritas antes en esta memoria.

35 Una composición farmacéutica preferida, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, comprende una combinación del EGFR TKI ZD1839 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Una composición farmacéutica preferida adicional, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, comprende una combinación del EGFR TKI OSI-774 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Para el componente EGFR TKI, una formulación de comprimido o cápsula prevista para la administración por vía oral contendrá generalmente, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a 1 g de ingrediente activo. Cuando el EGFR TKI es ZD1839, se puede utilizar una formulación de comprimido convencional para la administración oral que contiene 50 mg, 100 mg, 250 mg o 500 mg de ingrediente activo. De manera conveniente, la dosis oral diaria de ZD1839 es superior a 40 mg, por ejemplo en el intervalo de 50 a 750 mg, preferiblemente en el intervalo de 100 a 500 mg, más preferiblemente en el intervalo de 200 a 500 mg. Cuando el EGFR TKI es OSI-774, se puede utilizar una formulación de comprimido convencional para la administración oral que contiene 25 mg, 100 mg o 150 mg de ingrediente activo. Convenientemente, la dosis oral diaria de OSI-774 está en el intervalo de 50 a 300 mg, preferiblemente en el intervalo de 50 a 200 mg, más preferiblemente en el intervalo de 100 a 150 mg.

55 El inhibidor AZD0530 de quinasa Src se administrará generalmente utilizando cantidades y vías de administración análogas a las descritas antes en esta memoria.

Las dosificaciones y los programas descritos antes en esta memoria pueden variarse de acuerdo con el estado

patológico particular y el estado general del paciente. Por ejemplo, puede ser necesario o deseable reducir las dosis de los componentes del tratamiento de combinación antes mencionadas con el fin de reducir la toxicidad. El programa de dosis se puede determinar por parte del médico que esté tratando a cualquier paciente particular utilizando su experiencia y conocimiento profesionales.

5 Se apreciará que la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye una composición que comprende un EGFR TKI y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo proporciona convenientemente el producto de combinación terapéutico de la invención para la administración simultánea en el tratamiento sinérgico del cáncer.

10 De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye también composiciones separadas que comprenden una primera composición que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y una segunda composición que comprende el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo proporciona convenientemente la combinación terapéutica de la invención para la administración secuencial o separada en el tratamiento sinérgico de cáncer, pero las composiciones separadas también se pueden administrar simultáneamente.

25 Convenientemente, una composición farmacéutica de la invención comprende un kit que comprende un primer recipiente con una composición adecuada que contiene el EGFR TKI y un segundo recipiente con una composición adecuada que contiene el inhibidor AZD0530 de quinasa Src. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, que comprende:

- 30 a) un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una segunda forma de dosificación unitaria;
- c) medios de recipiente para contener a dichas primera y segunda formas de dosificación unitaria.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una combinación según se define antes en esta memoria para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer.

40 De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona también una composición farmacéutica para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer que comprende una combinación según se define antes en esta memoria en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Un beneficio particular sorprendente de la presente invención es que el cáncer que puede ser tratado con la combinación de la invención puede ser no sólo cáncer en pacientes que no hayan sido tratados con un inhibidor del factor de crecimiento, sino también cáncer que haya sido tratado con un inhibidor del factor de crecimiento, por ejemplo con EGFR TKI, y que no hayan respondido a una terapia de este tipo o que, después de haber sido inicialmente tratados con una terapia de este tipo, se hayan vuelto resistentes.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona el uso de una combinación según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento sinérgico de cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una combinación según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer resistente a EGFR TKI.

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento sinérgico de cáncer, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación según se define antes en esta memoria.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento de cáncer resistente a EGFR TKI, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación según se define antes en esta memoria.

5 De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer (incluido cáncer resistente a EGRF TKI) que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se define antes en esta memoria, antes, simultáneamente con o
10 después de la administración de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer (incluido cáncer resistente a EGRF TKI) que comprende la administración simultánea, secuencial o separada a un animal homeotermo que necesite de un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación según se define antes en esta memoria.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer (incluido cáncer resistente a EGRF TKI) que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se define antes en esta memoria, y la administración simultánea, secuencial o separada de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Un tratamiento de combinación de la presente invención según se define antes en esta memoria se puede administrar como una terapia única o puede implicar, además, cirugía o radioterapia, o la administración de un agente quimioterapéutico según se define antes en esta memoria.

Combinación de un anti-estrógeno, un EGFR TKI y el inhibidor AZD0530 de Src

30 La invención se refiere también a una combinación triple que comprende un anti-estrógeno, un inhibidor de tirosina quinasa de EGFR y un inhibidor particular de la familia de Src de tirosina quinasa no receptoras según se reivindica en la reivindicación 14. Esta combinación de la invención es útil en un método para el tratamiento de cáncer, particularmente de cáncer de mama.

35 Tal como se establece antes en esta memoria, se ha demostrado que la resistencia en células de cáncer de mama humanas MCF7 al anti-estrógeno tamoxifeno es mediada, en parte, por la expresión y activación elevadas de componentes de la vía de señalización de EGFR. También se estableció que el desarrollo de células de cáncer de mama MCF7 resistentes a tamoxifeno, tanto basal como estimulado con TGF α , podía ser inhibido por el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR ZD1839.

40 De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona una combinación triple, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Ha de entenderse que la expresión "una combinación" prevé la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes de la combinación según se describe antes en esta memoria.

50 Un anti-estrógeno adecuado tiene cualquiera de los significados definidos antes en esta memoria.

Un EGFR TKI adecuado tiene cualquiera de los significados definidos antes en esta memoria. En una combinación triple adecuada de la invención, el EGFR TKI se selecciona, por ejemplo, de ZD1839, OSI-774, CI 1033, PKI-166, CL-387785 y EKB-569. Preferiblemente, el componente EGFR TKI de la combinación triple es ZD1839 u OSI-774.
55 Más preferiblemente, el componente EGFR TKI de la combinación triple es ZD1839.

Tal como se establece antes en esta memoria, una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de EGFR TKI o de AZD0530 es, por ejemplo, una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, por ejemplo una sal por

adición de ácidos con un ácido inorgánico u orgánico tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, trifluoroacético, cítrico, maleico o fumárico.

5 Tal como se establece antes en esta memoria, la combinación triple de la presente invención es útil en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama. El tratamiento de cáncer de la presente invención incluye un efecto antitumoral que puede ser evaluado por medios convencionales tal como se describen antes en esta memoria.

10 El tratamiento con la combinación triple de la presente invención se define como que proporciona un aspecto sinérgico, si el efecto es terapéuticamente superior utilizando criterios análogos a los descritos antes en esta memoria.

15 Una combinación triple preferida de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende un anti-estrógeno, el EGFR TKI ZD1839 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una combinación triple preferida adicional de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende un anti-estrógeno, el EGFR TKI OSI-774 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Las combinaciones triples de la presente invención también pueden ser útiles en el tratamiento sinérgico de cáncer de pulmón, ya que se han detectado receptores de estrógenos en tejido tumoral de pulmón.

25 La combinación triple de este aspecto de la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica adecuada. De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama que comprende una combinación de un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones descritas en este aspecto de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada tal como las formas descritas antes en esta memoria.

35 Una composición farmacéutica preferida, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, comprende una combinación de un anti-estrógeno, el EGFR TKI ZD1839 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Una composición farmacéutica preferida adicional, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, comprende una combinación de un anti-estrógeno, el EGFR TKI OSI-774 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Cada uno del componente anti-estrógeno, el componente EGFR TKI y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src se administrará generalmente utilizando cantidades y vías de administración análogas a las descritas antes en esta memoria.

50 Las dosificaciones y los programas descritos antes en esta memoria se pueden variar de acuerdo con el estado de la enfermedad particular y del estado general del paciente. Por ejemplo, puede ser necesario o deseable reducir las dosis antes mencionadas de los componentes del tratamiento de combinación con el fin de reducir la toxicidad. El programa de dosis se puede determinar por parte del médico que esté tratando a cualquier paciente particular utilizando su experiencia y conocimiento profesionales.

55 Se apreciará que la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluye una composición que comprende un anti-estrógeno, un EGFR TKI y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo proporciona convenientemente el producto de combinación terapéutico de la invención para la administración simultánea en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.

De acuerdo con este aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente del mismo, el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Una composición farmacéutica de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluye también composiciones separadas que comprenden una primera composición que comprende un anti-estrógeno y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, una segunda composición que comprende, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y una
10 tercera composición que comprende el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo proporciona convenientemente la combinación terapéutica de la invención para la administración secuencial o separada en el tratamiento sinérgico de cáncer, pero las composiciones separadas también se pueden administrar simultáneamente.

15 Convenientemente, una composición farmacéutica de este tipo de la invención comprende un kit que comprende un primer recipiente con una composición adecuada que contiene el anti-estrógeno, un segundo recipiente con una composición adecuada que contiene el EGFR TKI y un tercer recipiente con una composición adecuada que contiene el inhibidor AZD0530 de quinasa Src. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, se
20 proporciona un kit para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende:

- a) un anti-estrógeno junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una primera forma de dosificación unitaria (tal como un comprimido o cápsula);
- b) un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una segunda forma de dosificación unitaria;
- 25 c) el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, en una tercera forma de dosificación unitaria; y
- d) medios de recipiente para contener a dichas primera, segunda y tercera formas de dosificación unitarias.

30 Se apreciará también que, por conveniencia, cualquiera de dos componentes de la combinación triple se pueden reunir en una primera forma de dosificación unitaria con el tercer componente en una segunda forma de dosificación unitaria.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación triple según se define antes en esta memoria para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.

35 De acuerdo con este aspecto de la invención se proporciona también una composición farmacéutica para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende una combinación triple según se define antes en esta memoria, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Tal como se establece antes, la resistencia a la terapia endocrina de cáncer de mama presenta un obstáculo principal. Tumores que responden inicialmente al tratamiento con anti-hormonas desarrollan posteriormente resistencia que da como resultado un progreso del tumor. De igual manera, también pueden desarrollar resistencia a la terapia de cáncer de mama con un EGFR TKI. Se han desarrollado modelos de células *in vitro* que reflejan la adquisición de resistencia de células de cáncer de mama tanto al tratamiento con anti-hormonas, por ejemplo
45 resistencia a tamoxifeno, como al tratamiento con EGFR TKI. Se ha demostrado ahora que la resistencia de células de cáncer de mama humanas MCF7 resistentes a tamoxifeno, al EGFR TKI ZD1839 es mediada, en parte, por la expresión y activación elevadas de componentes de la vía de señalización de quinasa Src que permite el desarrollo de células cancerígenas con un fenotipo invasivo. Células de este tipo muestran una mejora de la motilidad de las células y una capacidad de invasión que refleja el progreso de la enfermedad *in vivo*.

50 Un beneficio particular de este aspecto de la presente invención es que el cáncer de mama que puede ser tratado con la combinación triple de la invención puede no sólo ser cáncer de mama en pacientes que no hayan sido tratados todavía con una terapia anti-estrógenos ni con una terapia de EGFR TKI, sino también cáncer de mama que haya sido tratado con una cualquiera o ambas de la terapia anti-estrógenos y terapia de EGFR TKI y que no
55 hayan respondido a dicha terapia o que, después de haber sido tratados inicialmente con una terapia de este tipo, se hayan vuelto resistentes.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de una combinación triple

según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una combinación triple según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama resistente a anti-estrógenos.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una combinación triple según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama resistente a EGFR TKI.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de una combinación triple según se define antes en esta memoria en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar un tratamiento de cáncer de mama que es resistente a terapia tanto anti-estrógenos como de EGFR TKI.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación triple según se define antes en esta memoria.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de mama resistente a anti-estrógenos, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación triple según se define antes en esta memoria.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de mama resistente a EGFR TKI, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación triple según se define antes en esta memoria.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de mama que es resistente a una terapia tanto anti-estrógenos como de EGFR TKI, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación triple según se define antes en esta memoria.

40 De acuerdo este aspecto de la presente invención se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un anti-estrógeno antes, simultáneamente con o después de la administración de una cantidad eficaz de un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se define antes en esta memoria, y antes, simultáneamente con o después de la administración de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 De acuerdo este aspecto de la presente invención se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración simultánea, secuencial o separada a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de los componentes de la combinación triple según se define antes en esta memoria.

50 De acuerdo este aspecto de la presente invención se proporciona también un método para el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende la administración a un animal homeotermo que necesite un tratamiento de este tipo de una cantidad eficaz de un anti-estrógeno según se define antes en esta memoria y la administración simultánea, secuencial o separada de una cantidad eficaz de un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se define antes en esta memoria, y la administración simultánea, secuencial o separada de una cantidad eficaz del inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 La presente invención se refiere también a una combinación triple que comprende un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el retraso del progreso del cáncer de mama desde un estado

de respuesta hormonal a un estado de no respuesta hormonal, es *decir*, para inhibir la transformación de células de cáncer de mama desde un estado no invasivo, hormona-dependiente, a un estado más invasivo, hormona-independiente. Por consiguiente, la combinación triple tiene un efecto beneficioso sobre el tiempo hasta el progreso de la enfermedad y la tasa de supervivencia.

5 De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona una combinación triple que comprende un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el retraso del progreso del cáncer de mama desde un estado de respuesta hormonal a un estado de no respuesta hormonal.

10 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la combinación triple para inhibir la transformación de células de mama en células cancerosas, es *decir*, la combinación de compuestos proporciona un efecto quimiopreventivo del cáncer de mama.

15 Los autores de la invención han encontrado, inesperadamente, que la combinación triple de la presente invención tiene efectos no sólo sobre el desarrollo de células de cáncer de mama transformadas, sino también sobre el desarrollo constitutivo de células normales y de células anormales, no malignas, en el seno. La combinación triple de la presente invención puede utilizarse, por lo tanto, para reducir, preferiblemente para inhibir la transformación de células de mama en un estado maligno. La combinación triple de un anti-estrógeno, un EGFR TKI y el inhibidor
20 AZD0530 de quinasa Src de la presente invención puede inhibir la transformación de células de mama normales a un estado de DCIS. Dicha combinación triple también puede inhibir la transformación de células de DCIS en un estado maligno.

25 Se intuye adicionalmente que la combinación triple tendrá un efecto beneficioso para prevenir el brote de cáncer de mama en mujeres genéticamente predisuestas a la enfermedad.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona una combinación triple que comprende un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la reducción, preferiblemente inhibición
30 de la transformación de células de mama normales en un estado de DCIS.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona también una combinación triple que comprende un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la reducción,
35 preferiblemente inhibición de la transformación de células de mama normales o células DCIS en un estado maligno.

Un tratamiento con la combinación triple de la presente invención según se define en esta memoria se puede administrar en forma de una terapia única o puede, además, implicar cirugía o radioterapia o la administración de
40 un agente quimioterapéutico según se define antes en esta memoria.

Procesos de ensayo biológicos

45 Los siguientes métodos de ensayo se pueden utilizar para demostrar la actividad del inhibidor AZD0530 de quinasa Src cuando se utiliza en combinación con un anti-estrógeno y/o un EGFR TKI.

(a) Estudios de crecimiento de células

50 Diversos métodos de ensayo han sido descritos por Knowlden *et al.*, Endocrinology, 2003, 144, 1032-1044, e incluyen uno o más de:

- (i) células de cáncer de mama humanas MCF7 de "tipo salvaje" que responden a tamoxifeno;
- (ii) una variante insensible a endocrina de células de cáncer de mama MCF7 de este tipo que fue designada "Tam-R" (resistente a tamoxifeno); y
- (iii) una variante de células "TAM-R" de este tipo que también era insensible al tratamiento con el
55 EGFR TKI ZD1839 que se designó "Tam/TKI-R".

Células de cáncer de mama MCF7 "de tipo salvaje" que responden a tamoxifeno se cultivaron rutinariamente en medio RPMI exento de rojo fenol, suplementado con suero de ternero fetal al 5% más penicilina (10 UI/ml),

estreptomycin (10 µg/ml) y fungizona (2,5 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Cuando se utiliza para el análisis experimental en los ensayos descritos más abajo, las células se mantuvieron en medio RPMI exento de rojo fenol, suplementado con suero de ternero fetal al 5%, separado con carbón vegetal y agotado de esteroides, antibióticos como antes y glutamina (200 mM).

5 Células de cáncer de mama MCF7 "TAM-R" se mantuvieron en medio RPMI exento de rojo fenol suplementado con suero de ternero fetal al 5%, separado con carbón vegetal y agotado de esteroides, antibióticos como antes, glutamina (200 mM) y 4-hidroxitamoxifeno (10^{-7} M en etanol).

10 Células de cáncer de mama MCF7 "TAM/TKI-R" se obtuvieron mediante la exposición continua de células de cáncer de mama MCF7 "TAM-R" a ZD1839 (10^{-6} M) durante un período de 12 meses.

Se utilizaron artículos de plástico para el cultivo de tejidos Nunc (Roskilde, Dinamarca).

15 Monocapas de células se hicieron crecer durante 7 días en un medio DCCM exento de factor de crecimiento en suero en presencia de concentraciones crecientes de los componentes individuales de las combinaciones antes mencionadas o con las propias combinaciones. El crecimiento de la población celular se evaluó por medio de dispersión en tripsina de las monocapas de células, y el número de células se contó utilizando un contador Beckman Coulter (disponible de Beckman Coulter Limited, Luton, Gran Bretaña). Todos los experimentos del desarrollo celular se realizaron por triplicado.

20

(b) Análisis secuencial de la motilidad celular

Se cultivaron células en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos y se dejó que alcanzaran el crecimiento de fase logarítmica. Las placas se transfirieron a la fase caldeada de un microscopio invertido, y los cultivos de células se cubrieron con aceite mineral para minimizar los cambios de pH en el medio durante el análisis de la motilidad de las células. La motilidad de las células se registró a lo largo de un período de 6 horas utilizando una cámara de video acoplada a un sistema de registro de video secuencial. Para la cuantificación de la motilidad de las células, las imágenes se capturaron a intervalos de 10 minutos durante el playback del video, y el movimiento de al menos 10 células individuales se rastreó utilizando el software de análisis de imágenes Optimas (Media Cybernetics UK, Finchampstead, Berkshire, Gran Bretaña). El movimiento de las células se representó como la posición de las células (posición x frente a posición y) o la distancia total de migración (µm) como una función del tiempo. Para determinar la persistencia direccional de la motilidad de las células, se representaron trayectorias de las células de modo que todas las trayectorias comienzan desde el origen.

30

35

(c) Ensayo de cicatrización

Células de desarrollo exponencial se recolectaron y extendieron en placas de cultivo de células de 24 pocillos. Después del establecimiento de cultivos monocapa, las células fueron lesionadas raspando manualmente con una punta de pipeta y se lavaron con suero tamponado con fosfato (PBS – siglas en inglés). Se añadió medio reciente que contenía factores de crecimiento apropiados, compuestos inhibidores (o combinaciones de compuestos inhibidores). Al cabo de 36 horas, las células se fijaron con formaldehído al 4%, se tiñeron con cristal violeta (al 0,5% en PBS) y las lesiones se fotografiaron a un aumento de 20X. Algunos pocillos se fijaron y tiñeron directamente después de la lesión (instante t = 0 horas) para permitir el cálculo del porcentaje de cicatrización.

40

45

(d) Ensayo de migración de células de fibronectina

Las membranas de filtros de policarbonato de cámaras Transwell (6,5 mm de diámetro, 8,0 µm de tamaño de poros de Costar Inc., Cambridge, MA, EE.UU.) se revistieron sobre la cara inferior de la membrana con 50 µg/ml de fibronectina en RPMI exento de suero durante 2 horas a 37°C. Las membranas de policarbonato se aclararon una vez con PBS. Las células se recolectaron y se resuspendieron a una concentración de 5×10^5 células por ml en RPMI exento de suero. Partes alícuotas de células (100 µl; 5×10^4 células) se sembraron en cada uno de los pocillos a los que se habían añadido 500 µl de medio experimental. En experimentos control, se dejó que las células migraran hacia la cara inferior de la membrana durante 20 horas. En experimentos de ensayo, se añadieron concentraciones apropiadas de compuestos inhibidores (o combinaciones de compuestos inhibidores) y se dejó que las células migraran hacia la cara inferior de la membrana durante 20 horas. Las células no migratorias en la cara superior de la membrana se retiraron con un bastoncillo de algodón, y las células migratorias fijadas a la cara inferior de la membrana se fijaron en formaldehído al 4% y se tiñeron con 0,5% de

50

55

crystal violeta durante 10 min a la temperatura ambiente. Se contó el número de células migratorias a un aumento de 20X utilizando un microscopio invertido.

(e) Ensayo de invasión celular

5 Se utilizó una modificación del método previamente descrito por Hiscox *et al.* (Breast Cancer Research Treatment, 2000, 59, 245-254) para estudiar la naturaleza invasiva de las células de cáncer de mama.

10 Insertos de membrana de filtros de policarbonato de cámaras Transwell (6,5 mm de diámetro, 8 µm de tamaño de poros de Costar Inc.) se colocaron en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos y se revistieron con Matrigel (0,4 µg/ml) a la temperatura ambiente durante una noche en una campana de cultivo de tejidos estéril. Después de rehidratar los pocillos con RPMI exento de suero durante 1 hora a 37°C, las células se sembraron sobre los insertos de membrana a razón de 5×10^4 células/pocillo con o sin concentraciones apropiadas de compuestos inhibidores (o combinaciones de compuestos inhibidores) y se añadieron 600 µl de medio de cultivo, de modo que 15 los insertos de membrana estaban sumergidos. Los pocillos se cultivaron a 37°C durante 72 horas, después de lo cual las células no invasivas y el Matrigel se retiraron del interior de los pocillos con un bastoncillo de algodón. Aquellas células que habían invadido a través de la cara inferior de la membrana se fijaron en formaldehído al 4% y las membranas porosas se retiraron de la cámara de invasión utilizando una hoja de bisturí y se montaron sobre portaobjetos de microscopio de vidrio (utilizando Vectashield de Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) que 20 contenían la tinción nuclear, DAPI. La invasión de células se cuantificó con un microscopio fluorescente visualizando 5 campos separados por membrana a un aumento de 2X y contando el número de células en cada campo. Los datos se representaron como células medias por campo \pm error medio típico o porcentaje de invasión con respecto al testigo.

25 (f) Ensayo de fijación de células

Los pocillos de una placa de 96 pocillos se revistieron con Matrigel (50 µg/pocillo) y se secaron al aire durante una noche en una campana de cultivo de tejidos estéril. Se recolectaron células de desarrollo en fase logarítmica y se 30 ajustaron a una concentración de 2×10^5 células por ml en medio de cultivo que contenía concentraciones apropiadas de compuestos inhibidores (o combinaciones de compuestos inhibidores). Partes alícuotas de células (2×10^4 células) se sembraron en cada uno de los pocillos, y la placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS para separar las células no unidas antes de la adición a cada uno de los pocillos de 150 µl de disolución MTT (0,5 mg/ml en medio exento de suero). Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales a 37°C para permitir el desarrollo de cristales de tetrazolio dentro de las células. La disolución de 35 MTT se retiró de los pocillos y el colorante se extrajo a 4°C durante una noche con disolución TX-100 al 10%. La absorbancia se midió con un lector de placas Titertek Multiskan ELISA (Flow Laboratories, Reino Unido), equipado con un filtro de 540 nm. La fijación de las células en respuesta a los tratamientos se calculó como un porcentaje de las células adheridas en los pocillos testigo (no tratados).

40 (g) Ensayo de proliferación de fibroblastos NIH 3T3 transfectados con c-Src (c-src 3T3) in vitro

Este ensayo determinó la capacidad de un compuesto de ensayo (o combinación de compuestos de ensayo) de 45 inhibir la proliferación de células de fibroblastos 3T3 de ratón del National Institute of Health (NIH) que habían sido transfectadas de modo estable con un mutante activante (Y530F) de c-Src humano.

Utilizando un proceso similar al descrito por Shalloway *et al.*, Cell, 1987, 49, 65-73, células NIH 3T3 se transfectaron con un mutante activante (Y530F) de c-Src humana. Las células c-Src 3T3 resultantes se sembraron típicamente a razón de $1,5 \times 10^4$ células por pocillo en placas de ensayo transparentes tratadas con cultivo de 50 tejido de 96 pocillos (Costar), conteniendo cada una de las cuales un medio de ensayo que comprendía medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma) más suero de ternero fetal (FCS) al 0,5%, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina en disolución acuosa de cloruro de sodio al 0,9%. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C en una incubadora humidificada (7,5% de CO₂ : 95% de aire).

Compuestos de ensayo se solubilizaron en DMSO para formar una disolución de partida 10 mM. Partes alícuotas 55 de la disolución de partida se diluyeron con el medio DMEM descrito anteriormente y se añadieron a pocillos apropiados. Se realizaron diluciones en serie para proporcionar un intervalo de concentraciones de ensayo. Los pocillos de ensayo a los que no se añadió compuesto de ensayo se incluyeron en cada una de las placas. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C en una incubadora humidificada (7,5% de CO₂ : 95% de aire).

Reactivo de marcaje BrdU (Boehringer Mannheim, N° de catálogo 647 229) se diluyó en un factor de 1:100 en medio DMEM que contenía FCS al 0,5% y se añadieron partes alícuotas (20 µl) a cada uno de los pocillos para dar una concentración final de 10 µM). Las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas. El medio se decantó. A cada uno de los pocillos se añadió una disolución desnaturalizante (disolución FixDenat, Boehringer Mannheim, N° de catálogo 647 229; 50 µl) y las placas se colocaron en un agitador de placas a la temperatura ambiente durante 45 minutos. El sobrenadante se decantó y los pocillos se lavaron con PBS (200 µl por pocillo). Disolución anti-BrdU-peroxidasa (Boehringer Mannheim, N° de catálogo 647 229) se diluyó en un factor de 1:100 en PBS que contenía BSA al 1% y leche desnatada seca al 0,025% (Marvel (marca registrada), Premier Beverages, Stafford, Gran Bretaña), y una parte alícuota (100 µl) de la disolución resultante se añadió a cada uno de los pocillos. Las placas se colocaron en un agitador de placas a la temperatura ambiente durante 90 minutos. Los pocillos se lavaron con PBS (5 veces) para asegurar la separación de conjugado de anticuerpos no unido. Las placas se secaron con papel secante y a cada uno de los pocillos se añadió disolución de sustrato de tetrametilbencidina (Boehringer Mannheim, N° de catálogo 647 229; 100 µl). Las placas se agitaron suavemente en un agitador de placas, al tiempo que se desarrollaba el color durante un período de 10 a 20 minutos. La absorbancia de los pocillos se midió a 690 nm. Se determinó el grado de inhibición de la proliferación celular a un intervalo de concentraciones de cada uno de los compuestos de ensayo (o combinación de compuestos de ensayo) y se derivó un valor CI_{50} anti-proliferativo.

20 (h) Ensayo de migración de microgotitas in vitro

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de ensayo (o combinación de compuestos de ensayo) de inhibir la migración de líneas de células de mamíferos adherentes, por ejemplo la línea de células tumoral humana A549.

Medio RPMI (Sigma) que contenía FCS al 10%, L-glutamina al 1% y agarosa al 0,3% (Difco, N° de catálogo 0142-01) se calentó a 37°C en un baño de agua. Una disolución en agar acuosa al 2% de partida se sometió a autoclave y se almacenó a 42°C. Una parte alícuota (1,5 ml) de la disolución de agar se añadió a medio RPMI (10 ml) inmediatamente antes de su uso. Células A549 (N° de acceso ATCC CCL185) se suspendieron a una concentración de 2×10^7 células/ml en el medio y se mantuvieron a una temperatura de 37°C.

Una gotita (2 µl) de la mezcla de células/agarosa se transfirió mediante pipeta al centro de cada uno de los pocillos de un cierto número de placas de microtitulación de 96 pocillos, de fondo plano y tratadas con cultivo no tisular (Bibby Sterilin N° de catálogo 642000). Las placas se colocaron brevemente sobre hielo para acelerar la gelificación de las gotitas con contenido en agarosa. Partes alícuotas (90 µl) de medio que habían sido enfriadas hasta 4°C se transfirieron a cada uno de los pocillos, teniendo cuidado de no perturbar las microgotitas. Los compuestos de ensayo se diluyeron a partir de una disolución de partida 10 mM en DMSO utilizando medio RPMI tal como se describe anteriormente. Partes alícuotas (10 µl) de los compuestos de ensayo diluidos se transfirieron a los pocillos, teniendo de nuevo cuidado de no perturbar las microgotitas. Las placas se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada (7,5% de CO_2 : 95% de aire) durante aproximadamente 48 horas.

La migración se evaluó visualmente, y la distancia de migración se midió con respecto al borde de la gotita de agar. Se derivó una CI_{50} inhibidora migratoria, representando la medición de migración media frente a la concentración del o de los compuestos de ensayo.

45 (i) Ensayos de crecimiento de xenoinjerto in vivo

Este ensayo mide la capacidad del producto de combinación de la invención de inhibir el desarrollo de carcinomas humanos y/o de ratón desarrollados como tumores en ratones inmunológicamente deficientes atímicos. Células cancerígenas adecuadas para inyección incluyen células de cáncer de mama MCF7 humanas (obtenibles de American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209; N° de cat. HTB-22), células cancerígenas de fibroblastos 3T3 de ratón transfectadas con c-Src (transfección con un mutante activante (Y530F) de c-Src humano a través de un proceso similar al descrito por Shalloway *et al.*, *Cell*, 1987, 49, 65-73), células de cáncer colorrectal LoVo humanas (obtenibles de la European Collection of Cell Cultures, ECACC, CAMR, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido; N° de cat. CCL 229), células de cáncer de pulmón CaLu-6 humanas (ATCC N° de cat. HTB-56) y células cancerígenas NSCLC A549 humanas (ATCC N° de cat. CCL185).

Un total de aproximadamente 1×10^6 células cancerígenas humanas en 0,1 ml de una mezcla 1:1 de Matrigel

(Becton Dickinson, N° de catálogo 40234) y medio esencial mínimo de Eagle (EMEM; Gibco, N° de catálogo 21090-022) se inyectaron por vía subcutánea en un flanco de cada uno de los ratones de ensayo, y se dejó que los tumores resultantes se desarrollaran durante aproximadamente 10 días. Se seleccionaron animales para proporcionar grupos testigo y de tratamiento de un volumen de tumor medio aproximadamente igual. Cada uno de los productos de combinación se preparó como una suspensión tratada en molino de bolas en vehículo polisorbato-80 al 1% (0,1 ml por cada 10 g de peso corporal a la dosis de ensayo apropiada) y se dosificó por vía oral una vez al día comenzando el día 10 durante un período de aproximadamente 28 días. El tamaño del tumor se midió dos veces semanalmente utilizando calibradores y se calculó un volumen teórico. Se evaluó el efecto sobre el desarrollo del tumor.

En general, la actividad poseída por el inhibidor AZD0530 de quinasa Src, cuando se utiliza solo, se puede demostrar a las siguientes concentraciones o dosis en uno o más de los ensayos anteriores:

- Ensayo (a):- CI_{50} en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 – 5 μ M;
- Ensayo (b):- CI_{50} en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 – 1 μ M;
- Ensayo (d):- CI_{50} frente a células "TAM-R" de aproximadamente 0,1 μ M;
- Ensayo (e):- CI_{50} frente a células "TAM-R" de aproximadamente 0,1 μ M;
- Ensayo (f):- CI_{50} en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 – 1 μ M;
- Ensayo (g):- actividad en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 – 5 μ M;
- Ensayo (h):- actividad en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 – 5 μ M;
- Ensayo (i):- actividad en el intervalo, por ejemplo, de 1 – 200 mg/kg/día.

En general, cuando el inhibidor AZD0530 de quinasa Src se utiliza en combinación con un anti-estrógeno y/o un EGFR TKI en uno o más de los ensayos anteriores, se puede demostrar una actividad incrementada frente a la observada con AZD0530 solo. Alternativamente, la actividad poseída por el inhibidor AZD0530 de quinasa Src, cuando se utiliza en combinación con un anti-estrógeno y/o un EGFR TKI, se puede demostrar a concentraciones o dosis menores en uno o más de los ensayos anteriores.

Por ejemplo, cuando se utiliza la combinación de AZD0530 (0,1 μ M) y ZD1839 (1 μ M) frente a células "TAM-R", se puede demostrar la siguiente actividad:

- Ensayo (d):- un efecto de aproximadamente CI_{70} ;
- Ensayo (e):- un efecto de aproximadamente CI_{70} ;

y cuando se utiliza una combinación de AZD0530 ((1 μ M) y ZD1839 (1 μ M) frente a células "TAM-R", se puede demostrar la siguiente actividad:

- Ensayo (d):- un efecto de aproximadamente CI_{85} ;
- Ensayo (e):- un efecto de aproximadamente CI_{75} .

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una combinación, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src (4-(6-cloro-2,3-metilendioxianilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloquinazolina), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el anti-estrógeno es tamoxifeno, fulvestrant, anastrozol, letrozol o exemestano.
- 10 2.- Una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 3.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende un inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 4.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende una primera composición que comprende un anti-estrógeno y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y una segunda composición que comprende el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 5.- El uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.
- 6.- El uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama resistente a anti-estrógenos.
- 30 7.- Una combinación que comprende un anti-estrógeno y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el retraso del progreso de cáncer de mama de un estado que responde hormonalmente a un estado que no responde hormonalmente.
- 35 8.- Una combinación adecuada para el uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src (4-(6-cloro-2,3-metilendioxianilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloquinazolina) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el EGFR TKI se selecciona de ZD1839, OSI-774, C11033, PKI-166, CL-387785 y EKB-569.
- 40 9.- Una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer, que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 8 en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 10.- Una composición farmacéutica adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo o una sal farmacéuticamente aceptable.
- 50 11.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una primera composición que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y una segunda composición que comprende el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo o farmacéuticamente aceptable.
- 55 12.- El uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 8, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento sinérgico de cáncer.
- 13.- El uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 8, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer resistente a EGFR TKI.
- 14.- Una combinación triple, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende

- 5 un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src (4-(6-cloro-2,3-metilendioxi-anilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloxiquinazolina) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el anti-estrógeno es tamoxifeno, fulvestrant, anastrozol, letrozol o exemestano y el EGFR TKI se selecciona de ZD1839, OSI-774, C11033, PKI-166, CL-387785 y EKB-569.
- 10 15.- Una composición farmacéutica, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende una combinación triple de acuerdo con la reivindicación 14 en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 16.- Una composición farmacéutica, adecuada para uso en el tratamiento sinérgico de cáncer de mama, que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 14, de un anti-estrógeno, un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 17.- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende una primera composición que comprende un anti-estrógeno y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, una segunda composición que comprende un EGFR TKI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, y una tercera composición que comprende el inhibidor AZD0530 de quinasa Src o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo o farmacéuticamente aceptable.
- 20 18.- El uso de una combinación triple de acuerdo con la reivindicación 14, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento sinérgico de cáncer de mama.
- 25 19.- El uso de una combinación triple de acuerdo con la reivindicación 14, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama resistente a anti-estrógenos.
- 30 20.- El uso de una combinación triple de acuerdo con la reivindicación 14, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama resistente a EGFR TKI.
- 35 21.- El uso de una combinación triple de acuerdo con la reivindicación 14, en la fabricación de un medicamento para la administración a un animal homeotermo para proporcionar el tratamiento de cáncer de mama que es resistente tanto a terapia con anti-estrógenos como con EGFR TKI.