

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 977**

51 Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01) **A61K 31/5377** (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/5355 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09721522 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2254571**

54 Título: **Combinaciones de un conjugado de anticuerpo-fármaco anti-HER2 y agentes quimioterapéuticos, y métodos de uso**

30 Prioridad:

18.03.2008 US 37410 P

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

17.09.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**BERRY, LEANNE;
PHILLIPS, GAIL LEWIS y
SLIWKOWSKI, MARK X.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 545 977 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

Combinaciones de un conjugado de anticuerpo-fármaco anti-HER2 y agentes quimioterapéuticos, y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere por lo general a combinaciones farmacéuticas de compuestos con actividad frente al cáncer que expresan ErbB2 y combinaciones terapéuticas para uso en métodos para el tratamiento de cáncer que expresa ErbB2.

10

Antecedentes de la invención

La tirosina receptora de HER2 (ErbB2) es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de receptores transmembrana. La sobreexpresión de HER2 se observa en aproximadamente un 20 % de los cánceres de mama humano y está implicada en el crecimiento agresivo y malos resultados clínicos asociados con estos tumores (Slamon *et al.*, (1987) *Science* 235: 177-182).

15

El trastuzumab (CAS 180288-69-1, HERCEPTIN®, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) es una versión de anticuerpo monoclonal, IgG1 kappa, humanizado derivado de ADN recombinante del anticuerpo HER2 de murino que se une de forma selectiva con una afinidad celebrada en un ensayo basado en células (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de la proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2 (ErbB2) (documento de Patente de Estados Unidos N° 5677171; documento de Patente de Estados Unidos N° 5821337; documento de Patente de Estados Unidos N° 6054297; documento de Patente de Estados Unidos N° 6165464; documento de Patente de Estados Unidos N° 6339142; documento de Patente de Estados Unidos N° 6407213; documento de Patente de Estados Unidos N° 6639055; documento de Patente de Estados Unidos N° 6719971; documento de Patente de Estados Unidos N° 6800738; documento de Patente de Estados Unidos N° 7074404; Coussens *et al.*, (1985) *Science* 230: 1132-9; Slamon *et al.*, (1989) *Science* 244:707-12; Slamon *et al.*, (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792). El trastuzumab contiene regiones de marco conservado humanas con las regiones que determinan la complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. El trastuzumab se une al antígeno de HER2 y por lo tanto inhibe el crecimiento de células cancerígenas. Se ha mostrado que el trastuzumab, en ensayos tanto *in vitro* como en animales, inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (Hudziak *et al.*, (1989) *Mol Cell Biol* 9: 1165-72; Lewis *et al.*, (1993) *Cancer Immunol Immunother*; 37: 255-63; Baselga *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58: 2825-2831). El trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, ADCC (Lewis *et al.*, (1993) *Cancer Immunol Immunother* 37 (4): 255-263; Hotaling *et al.*, (1996) [resumen]. *Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res*; 37: 471; Pegram MD, *et al.*, (1997) [resumen]. *Proc Am Assoc Cancer Res*; 38: 602; Sliwkowski *et al.*, (1999) *Seminars in Oncology* 26(4), Supl 12: 60-70; Yarden Y. y Sliwkowski, M. (2001) *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, Macmillan Magazines, Ltd., Vol. 2: 127-137).

20

25

30

35

40

45

50

55

El HERCEPTIN® se aprobó en 1998 para el tratamiento de pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 (Baselga *et al.*, (1996) *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744) que han recibido una extensa terapia anticáncer anterior, y desde entonces se ha usado en más de 300.000 pacientes (Slamon DJ, *et al.*, *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92; Vogel CL, *et al.*, *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-26; Marty M, *et al.*, *J Clin Oncol* 2005; 23: 4265-74; Romond EH, *et al.*, *T N Engl J Med* 2005; 353: 1673-84; Piccart-Gebhart MJ, *et al.*, *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-72; Slamon D, *et al.*, [resumen]. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 100 (Supl 1): 52). En 2006, la FDA aprobó el HERCEPTIN® (trastuzumab, Genentech Inc.) como parte de un régimen de tratamiento que contiene doxorubicina, ciclofosfamida y paclitaxel para el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de mama positivos en nódulos, positivo para HER2. Aunque el desarrollo de HERCEPTIN® proporcionó a los pacientes con tumores positivos para HER2 un resultado notablemente mejor que solamente con la quimioterapia, virtualmente todos los pacientes con cáncer de mama metastásico (MBC), positivo para HER2 en ocasiones tendrán una evolución con las terapias disponibles. Aún quedan oportunidades para mejorar los resultados de los pacientes con MBC. A pesar de los diversos mecanismos de acción del trastuzumab, una serie de pacientes tratados con trastuzumab no muestran respuesta ni parada de la respuesta después de un periodo de beneficio por el tratamiento. Algunos tumores HER2+ (positivos para HER2) fracasan en la respuesta al HERCEPTIN® y la mayoría de los pacientes cuyos tumores responden evolucionar en ocasiones. Existe una necesidad clínica significativa para el desarrollo adicional de terapias para el cáncer dirigidas a HER2 para pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 u otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden escasamente, al tratamiento con HERCEPTIN®.

60

65

Un enfoque alternativo a la terapia dirigida a anticuerpo es el uso de anticuerpos para la administración de fármacos citotóxicos de forma específica a células cancerígenas que expresan antígeno. Los maitansinoides, derivados del fármaco antimetabólico maitansina, se unen a los microtúbulos de una manera similar a la de los fármacos alcaloides de la vinca (Issell BF *et al.*, (1978) *Cancer Treat. Rev.* 5: 199-207; Cabanillas F *et al.*, (1979) *Cancer Treat Rep*, 63: 507-9). Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) formados por el maitansinoide DM1 unido al trastuzumab muestran una potente actividad antitumoral en líneas celulares de tumor sensibles a trastuzumab y resistentes a trastuzumab que sobreexpresan HER2, y modelos de xenoinjerto de cáncer de mama humano. Un conjugado de maitansinoides unido al anticuerpo de cáncer de mama murino anti-HER2, TA.1, a través del conector de MCC, era

200 veces menos potente que el conjugado correspondiente con un conector de disulfuro (Chari *et al.*, (1992) Cancer Res. 127-133). Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) formados por el maitansinoide, DM1, unido al trastuzumab muestran una actividad antitumoral potente en líneas de células tumorales sensibles y resistentes al trastuzumab que sobreexpresan HER2 y modelos de xenoinjerto de cáncer humano. En la actualidad, el trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) está experimentando una evaluación en ensayos clínicos en fase II en pacientes cuya enfermedad es resistente a las terapias dirigidas a HER2 (Beeram *et al.*, (2007) "A phase I study of trastuzumab-MCC-DM (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (BC)", American Society of Clinical Oncology 43rd; junio 02 (Abs 1042; Krop *et al.*, European Cancer Conference ECCO, Poster 2118, 23-27 de septiembre de 2007, Barcelona; documento de Patente de Estados Unidos N° 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993).

La terapia de combinación en la que dos o más fármacos se usan en conjunto en algún régimen de dosificación o forma de administración, por lo general tienen uno o más objetivos: (i) reducir la frecuencia a la que aparece la resistencia adquirida mediante la combinación de fármacos con una resistencia cruzada mínima, (ii) reducción de las dosis de fármacos con una toxicidad que no se superpone y un perfil terapéutico similar con el fin de conseguir una eficacia con menos efectos secundarios, es decir, aumento del índice terapéutico, (iii) sensibilizar las células a la acción de un fármaco durante el uso de otro fármaco, tal como una etapa de alteración del ciclo celular o propiedades de crecimiento, y (iv) conseguir un aumento de potencia mediante la explotación de los efectos de aditividad, o superiores a la aditividad, en la actividad biológica de dos fármacos (Pegram, M., *et al.*, (1999) Oncogene 18: 2241-2251; Konecny, G., *et al.*, (2001) Breast Cancer Res. and Treatment 67: 223-233; Pegram, M., *et al.*, (2004) J. of the Nat. Cancer Inst. 96 (10): 739-749; Fitzgerald *et al.*, (2006) Nature Chem. Biol. 2 (9): 458-466; Borisy *et al.*, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci 100 (13): 7977-7982).

La aditividad de Loewe (Chou, T.C. y Talalay, P. (1977) J. Biol. Chem. 252: 6438-6442; Chou, T.C. y Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22:27-55; Berenbaum, M.C. (1989) Pharmacol. Rev. 41: 93-141) y la independencia/sinergia de Bliss (Bliss, C.I. (1956) Bacteriol. Rev. 20: 243-258; Greco *et al.*, (1995) Pharmacol. Rev. 47: 331-385) son métodos usados para calcular la relación esperada de dosis-respuesta para terapia de combinación en comparación con monoterapia basada en parámetros tales como CI_{50} , la dosis del fármaco necesaria para conseguir una inhibición de la diana de un 50 % e igual a K_i en el caso más sencillo.

Se ha informado de anticuerpos inhibidores de la dimerización de HER2 e inhibidores de EGFR para terapia de combinación frente al cáncer (documento US 2007/0020261). Trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y pertuzumab han demostrado de forma individual una actividad en pacientes con MBC, y no se ha demostrado que una combinación de pertuzumab y trastuzumab sea activa en pacientes con MBC positivos para HER (Baselga J, *et al.*, "A Phase II trial of trastuzumab and pertuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer that had progressed during trastuzumab therapy: full response data", European Society of Medical Oncology, Estocolmo, Suecia, 12-16 de septiembre de 2008).

Sumario de la invención

La invención se refiere generalmente al conjugado de anticuerpo-fármaco anti-HER2, trastuzumab-MCC-DM1, administrado en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos para inhibir el crecimiento de células cancerígenas. Ciertas combinaciones de trastuzumab-MCC-DM1 y un agente quimioterapéutico muestran efectos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. Las combinaciones y métodos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como cáncer. Las combinaciones pueden inhibir el crecimiento tumoral en mamíferos y pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de cáncer expresa ErbB2, en la que el método comprende la administración de una combinación terapéutica como una formulación combinada o alterna a un mamífero, en la que la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre GDC-094 y GNE-390.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las materias objeto que no se incluyen en el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

La cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0941 y GNE-390 se pueden administrar como una formulación combinada o de forma alterna.

La invención también se refiere al uso de combinaciones de agentes en las que la combinación terapéutica da como resultado un efecto sinérgico.

Otro aspecto de la invención son composiciones farmacéuticas que comprenden trastuzumab-MCC-DM1, un agente quimioterapéutico seleccionado entre GDC-0941 y GNE-390; y uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una combinación terapéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de mama que expresa ErbB2, en la que la combinación terapéutica se administra a un mamífero como una formulación combinada o de forma alterna, y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre GDC-0941 y GNE-390.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación de la viabilidad celular de SK-BR-3 *in vitro* a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI_{50} de trastuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), y la combinación de trastuzumab y T-DM1.

La Figura 2 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 EEL *in vitro* a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI_{50} de trastuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), y la combinación de trastuzumab y T-DM1.

La Figura 3 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) de KPL4 *in vitro* a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija a 1:10 de T-DM1 y GDC-0941 (de 62,5 nM a 1 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,25x a 4x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 4 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) de KPL4 *in vitro* a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija a 1:25 de T-DM1 (de 1,25 ng/ml a 80 ng/ml) y GDC-0941 (de 31,25 nM a 2 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,0625x a 16x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 5 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) de células KPL-4, mutantes para PIK3CA (H1047R), resistentes a HERCEPTIN®, amplificadas por Her2 *in vitro* a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941, a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0 a 16x.

La Figura 6 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de KPL4 Caspasa 3/7 a las 24 horas después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de T-DM1 y GDC-0941 con proporción de dosis fija a concentraciones de T-DM1 hasta 160 ng/ml.

La Figura 7 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de KPL4 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y GDC-0941 a concentraciones de T-DM1 de 0 a 200 ng/ml.

La Figura 8 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de MDA-0MB-361 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija a 1:20 de T-DM1 (de 3,125 ng/ml a 50 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 1 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,125x a 8x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 9 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de MDA-0MB-361 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija a 1:20 de T-DM1 (de 3,125 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (62,5 nM a 2 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,125x a 8x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 10 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de BT-474 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija a 1:10 de T-DM1 (de 3,125 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (de 31,25 nM a 1 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,125x a 4x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 11 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de BT-474 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija a 1:10 de T-DM1 (de 6,25 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 1 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,25x a 4x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 12 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de células AU565, no mutantes para PI3K, amplificadas por Her2, a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PT103, y T-DM1 + GDC-0941 a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0 a 16x.

La Figura 13 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de células EFM192A, mutantes para PIK3CA (C420R), amplificadas por Her2, a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941, a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0 a 16x.

La Figura 14 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de células HCC1954, mutantes para PIK3CA (H1047R), empresa HERCEPTIN®, amplificadas por Her2 después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941, a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0 a 16x.

La Figura 15 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mamá transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu después de la dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 5 mg/kg, iv, qd x1, (3) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21, (4) GDC-0152, 50 mg/kg, po, qwk x3, (5) T-DM1, 5 mg/kg, iv, qd x1 + GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21, (6) T-DM1, 5 mg/kg, iv, qd x1 + GDC-0152, 50 mg/kg, po, qwk x3.

La Figura 16 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de

mama MDA-MB-361.1 inoculado en ratones CRL nu/nu después de la dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21 (2) GDC-0941, 25 mg/kg, po, qd x21, (3) GDC-0941, 50 mg/kg, po, qd x21, (4) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21, (5) T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd x1, (6) T-DM1, 10 mg/kg, iv, qd x1, (7) GDC-0941, 25 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd x1, (8) GDC-0941, 50 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd x1, (9) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd x1, (10) GDC-0941, 25 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, qd x1, (11) GDC-0941, 50 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, qd x1, (12) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, qd x1

La Figura 17 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama MDA-MB-361.1 inoculado en ratones CRL nu/nu después de la dosificación con: (1) Vehículos [MCT (metilcelulosa al 0,5 %/TWEEN 80™ al 0,2 %) + tampón de succinato (succinato sódico 100 mM, 100 mg/ml de trehalosa, TWEEN 80 al 0,1 %, pH 5,0)], po + IV, qd x21 y qd (2) GNE-390, 1,0 mg/kg, po, qd x21, (3) GNE-390, 2,5 mg/kg, po, qd x21, (4) T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd, (5) GNE-390, 1,0 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd, (6) GNE-390, 2,5 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd.

15 Descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo

A continuación se hará referencia con detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Aunque la invención se describirá en conjunto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no pretenden limitar la invención a esas realizaciones.

20 DEFINICIONES

Los términos "comprenden", "que comprende", "incluyen", "que incluye", e "incluye", cuando se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, pretenden especificar la presencia de características, números enteros, componentes, o etapas indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una u otras características, números enteros, componentes, etapas, o grupos más de los mismos.

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es prevenir a ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el crecimiento, desarrolló o diseminación de una afección hiperproliferativa, tal como cáncer. Para fines de la presente invención, algunos resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, patología estabilizada (es decir, que no empeora), retraso o ralentización del avance de la enfermedad, mejora o alivio de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede hacer referencia a prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada sino se recibiera tratamiento. Los individuos con necesidad de tratamiento incluyen que ya padecen la afección o trastorno así como los propensos a padecer la afección o trastorno o los individuos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que (i) trata la enfermedad, afección, o trastorno en particular, (ii) atenúa, mejora, o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección, o trastorno en particular, o (iii) previene o retrasa el inicio de uno o más síntomas de la enfermedad, afección, o trastorno en particular que se describen en el presente documento. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar células cancerígenas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia para el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo de la evolución de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

El "trastorno hiperproliferativo" se indica con tumores, cánceres, y tejido neoplásico, que incluye estadios premalignos y no neoplásicos, y también incluye psoriasis, endometriosis, pólipos y fibroadenoma.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno" se refiere a o describen la afección fisiológica en mamíferos que por lo general se caracteriza por un crecimiento celular desregulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerígenas. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Algunos ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC"), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Algunas clases de quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: agentes de alquilación, antimetabolitos, alcaloides vegetales con actividad antimetabólica, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores, e inhibidores de quinasa. Algunos agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS N° 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS N° 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS N° 15663-27-1), carboplatino (CAS N° 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS N° 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, y rapamicina.

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de MEK, Exelixis, documento de patente WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semaphore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyet), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPOTAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas con ingeniería de albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Il), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyet), pazopanib (Glaxo Smith Kline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improfulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular la criptoficina 1 y la criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostaza de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma11, caliqueamicina omega11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados con la cromoproteína enediina), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostano, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; agentes reforzadores del ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; loxoxantrona; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicouona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (Ara-C); ciclosfosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mencionados anteriormente.

En la definición de "agente quimioterapéutico" también se incluyen: (i) agentes antihormonales que actúan para

regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos y modulador selectivos de receptores de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromataasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de la proteína quinasa tales como inhibidores MEK (documento de patente WO 2007/044515); (v) inhibidores de quinasa lípida; (vi) oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tal como oblimersén (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas para terapia genética, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; (ix) vacunas tales como vacunas de la topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (x) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mencionados anteriormente.

En la definición de "agente quimioterapéutico" también se incluyen anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tosimumab (Bexxar, Corixia), y el conjugado de anticuerpos-fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyet).

Algunos anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicin, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pectusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, sipilizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab celmoleuquina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab, y visilizumab.

Un "metabolito" es un producto producido durante el metabolismo en el organismo de un compuesto o sal específicos del mismo. Algunos metabolitos de un compuesto se pueden identificar usando técnicas de rutina conocidas en la técnica y de terminar sus actividades usando ensayos tales como los que se describen en el presente documento. Tales productos pueden resultar por ejemplo de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la invención incluye metabolitos de compuestos de la invención, que incluyen compuestos producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar un producto metabólico del mismo.

La expresión "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información aproximada sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de tales productos terapéuticos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Algunas sales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Algunos ejemplos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido

mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares. Algunos ácidos que generalmente se consideran adecuados para la formación de las sales farmacéuticamente útiles o aceptables de compuestos farmacéuticos básicos se analizan, por ejemplo, en P. Stahl *et al.*, Camille G. (eds.) Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66 (1) 1 19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201 217; Anderson *et al.*, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York; Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton PA; y en The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D.C. en su página web).

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Algunos ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

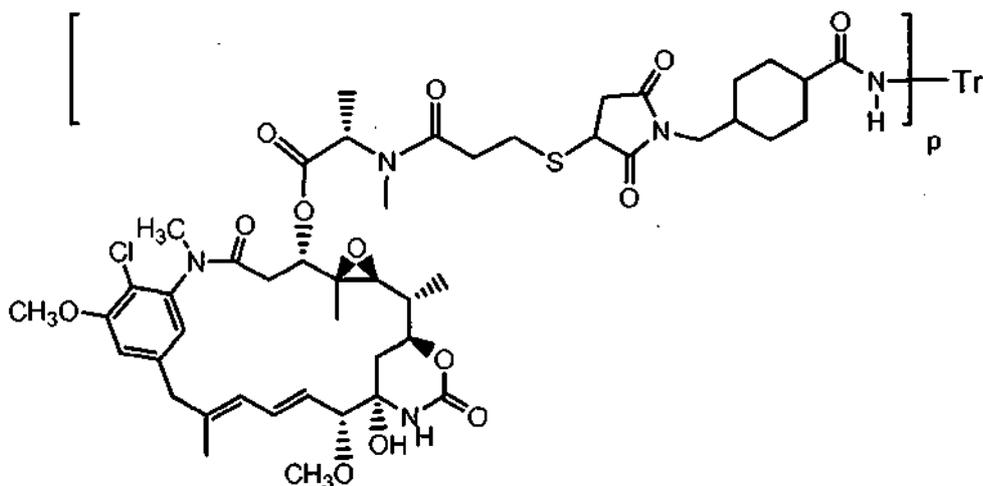
La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser químicamente y/o toxicológicamente compatible, con los otros ingredientes que comprenden una formulación, y/o el mamífero que se está tratando con los mismos.

Un "solvato" se refiere a una asociación o complejo físico de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención. Los compuestos de la invención pueden existir en formas sin solvatar así como solvatadas. Algunos ejemplos de disolventes que forman solvatos incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina. El término "hidrato" se refiere al complejo en el que la molécula de disolvente es el agua. Esta asociación física implica grados variables de enlace iónico y covalente, incluyendo en la sede hidrógeno. En ciertos casos, el solvato puede ser capaz de aislamiento, por ejemplo cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente en la estructura de la red cristalina del sólido cristalino. En general, se conoce la preparación de solvatos, por ejemplo, M. Caira *et al.*, J. Pharmaceutical Sci., 93 (3), 601 611 (2004). Algunas preparaciones similares de solvatos, hemisolvato, hidratos y similares se describen en E. C. van Tonder *et al.*, AAPS PharmSciTech., 5 (1), artículo 12 (2004); y A. L. Bingham *et al.*, Chem. Commun., 603 604 (2001). Un proceso no limitante, habitual implica la disolución del compuesto de la invención en cantidades deseadas del disolvente deseado (orgánico o agua o mezclas de los mismos) a una temperatura más elevada que la temperatura ambiente, y enfriar la solución a una tasa suficiente para formar cristales que a continuación se aíslan mediante métodos convencionales. Algunas técnicas analíticas tales como, por ejemplo espectroscopía de I.R., muestran la presencia del disolvente (o agua) en los cristales en forma de un solvato (o hidrato).

El término "sinérgica" uno se usa en el presente documento se refiere a una combinación terapéutica que es más eficaz que los efectos aditivos de los dos o más agentes individuales. Una determinación de una interacción sinérgica entre trastuzumab-MCC-DM1, y uno o más agentes quimioterapéuticos se puede basar en los resultados obtenidos a partir de los ensayos que se describen en el presente documento. Los resultados de estos ensayos se analizan usando el método de combinación de Chou y Talalay y Análisis de Dosis-Efecto con el software CalcuSyn para obtener un Índice de Combinación "IC" (Chou y Talalay (1984) Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55). Las combinaciones proporcionadas por la presente invención se han evaluado en varios sistemas de ensayo, y los datos se pueden analizar usando un programa convencional para la cuantificación de la sinergia, aditividad, y antagonismo entre agentes anticáncer. El programa usado preferentemente es el que se describe en Chou y Talalay, en "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy", Academic Press, 1987, Capítulo 2. Valores del Índice de Combinación (IC) inferiores a 0,8 indican sinergias, valores superiores a 1,2 indican antagonismo y valores entre 0,8 y 1,2 indican efectos aditivos. La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y puede demostrar que es "sinérgica", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos usados en conjunto es superior a la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Un efecto sinérgico se puede conseguir cuando los principios activos: (1) se coformulan y se administran o liberan de forma simultánea en una formulación de dosificación unitaria, combinada; (2) se administran de forma alternante como formulaciones separadas; o (3) mediante cualquier otro régimen. Cuando se administran en terapias de forma alternante, se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se liberan de forma secuencial, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de forma alternante, una dosificación eficaz de cada principio activo se administra en forma secuencial, es decir, en serie en el tiempo.

TRASTUZUMAB-MCC-DM1

La presente invención incluyen combinaciones terapéuticas que comprenden trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), un conjugado de anticuerpo-fármaco (Nº de Reg. CAS 139504-50-0), que tiene la estructura:



5 en la que Tr es trastuzumab, unido mediante un resto conector MCC, al resto del fármaco maitansinoide, DM1 (documento de Patente de Estados Unidos N° 5208020; documento de Patente de Estados Unidos N° 6441163). La proporción del fármaco a anticuerpo o carga del fármaco se representa mediante p en la estructura de trastuzumab-MCC-DM1 mencionada anteriormente, y daría en valores enteros de 1 a aproximadamente 8. El valor de la carga de fármaco p es de 1 a 8. El trastuzumab-MCC-DM1 incluye todas las mezclas de conjugados de anticuerpo-fármaco cargados y unidos de formas diversas en los que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 restos de fármacos se unen de forma covalente al anticuerpo trastuzumab (documento de Patente de Estados Unidos N° 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993). El trastuzumab-MCC-DM1 se puede preparar de acuerdo con el Ejemplo 1.

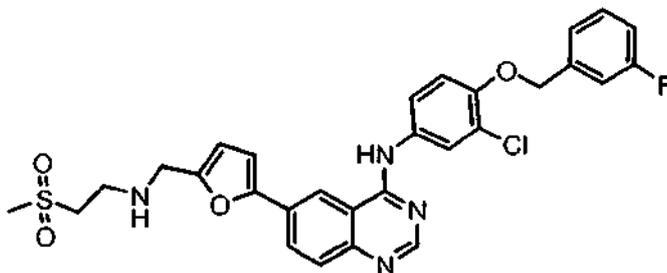
15 El trastuzumab se produce mediante un cultivo en suspensión de células de mamífero (Ovario de Hámster Chino, CHO). El proto-oncogén HER2 (o c-erbB2) codifica una proteína receptora de transmembrana de 185 kDa, que está relacionada de forma estructural con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. La sobreexpresión de la proteína HER2 se observa en un 25 %-30 % de cánceres de mama primarios y se puede determinar usando una evaluación basada en inmunohistoquímica de bloques de tumores fijos (Press MF, *et al.*, (1993) Cancer Res 53: 4960-70). El trastuzumab es un anticuerpo que tiene restos de unión a antígeno de, o derivados, del anticuerpo 4D5 murino (CRL 10463 de la ATCC, depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 en el Tratado de Budapest el 24 de mayo de 1990). Algunos anticuerpos 4D5 humanizados a modo de ejemplo incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8' (HERCEPTIN®) tal como en documento de Patente de Estados Unidos N° 5821337.

25 En un Estudio en Fase I, la dosis máxima tolerada (MTD) de T-DM1 administrado mediante infusión IV cada 3 semanas era de 3,6 mg/kg. Una DLT (Toxicidad Limitante de la Dosis) consistía en trombocitopenia de Grado 4 en 2 de 3 pacientes tratados con 4,8 mg/kg. Los sucesos adversos de Grado ≥ 2 relacionados a 3,6 mg/kg eran poco frecuentes y manejable. Este programa de tratamiento era bien tolerado y estaba asociado con una actividad clínica significativa como se ha descrito anteriormente. Un estudio en Fase II ha mostrado una tolerabilidad similar a nivel de dosis de 3,6 mg/kg administrado cada 3 semanas, solamente con un pequeño porcentaje de pacientes (3 de 112 pacientes) que necesitan una reducción de la dosis. Por tanto, la dosis de T-DM1 de 3,6 mg/kg administrada cada 3 semanas se seleccionó para someter a ensayo este estudio basándose en 1) la eficacia y seguridad demostradas de T-DM1 a 3,6 mg/kg cada 3 semanas, y 2) la conveniencia de un régimen de 3 semanas para esta población de pacientes.

35 AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

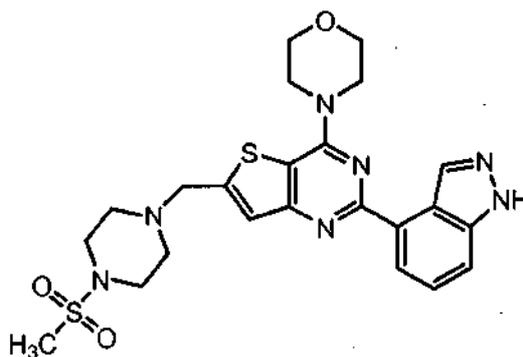
Ciertos agentes quimioterapéuticos han demostrado propiedades sorprendentes e inesperadas en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 en la inhibición de la proliferación celular *in vitro* e *in vivo*. Tales agentes quimioterapéuticos son GDC-0941, y GNE-390.

40



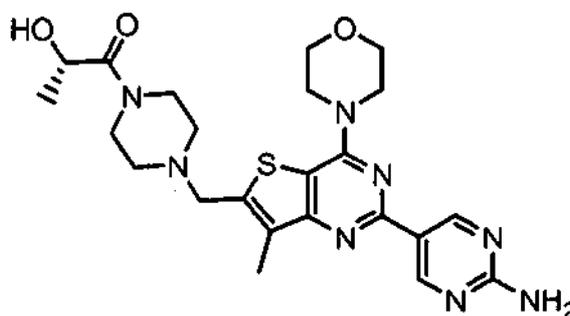
5 GDC-0941 (Genentech Inc.), es un inhibidor de tienopirimidina biodisponible por vía oral, selectivo de PI3K con propiedades farmacocinéticas y farmacéuticas prometedoras (Folkes *et al.*, (2008) Jour. of Med. Chem. 51 (18): 5522-5532; documento de patente US2008/0076768; (documento de patente US 2008/0207611; Belvin *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99º: 15 de abril, Resumen 4004; Folkes *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99º: 14 de abril, Resumen LB-146; Friedman *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99º: 14 de abril, Resumen LB-110). GDC-0941, muestra una actividad sinérgica *in vitro* e *in vivo* en combinación con ciertos agentes quimioterapéuticos frente a líneas celulares de tumor sólido (documento de patente con N° de Ser. US 12/208.227, Belvin *et al.*, "Combinations Of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor Compounds And Chemotherapeutic Agents, And Methods Of Use", presentado el 10 de septiembre de 2008). El GDC-0941 se denomina 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)metil)tieno[3,2-d]pirimidin-4-il)morfolina (N° de Reg. CAS 957054-30-7), y tiene la estructura:

15



20 GNE-390 (Genentech Inc.), es un inhibidor de tienopirimidina biodisponible por vía oral, selectivo de PI3K con propiedades farmacocinéticas y farmacéuticas prometedoras (documento de patente US 2008/0242665; documento de patente WO 2008/070740). GNE-390 muestra una actividad sinérgica *in vitro* e *in vivo* en combinación con ciertos agentes quimioterapéuticos frente a líneas celulares de tumor sólido (documento de con N° de Ser. US 12/208.227, Belvin *et al.*, "Combinations Of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor Compounds And Chemotherapeutic Agents, And Methods Of Use", presentado el 10 de septiembre de 2008). El GNE-390 se denomina (S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)piperazin-1-il)-2-hidroxiopropan-1-ona, y tiene la estructura:

25



EVALUACIÓN BIOLÓGICA

30

Se realizaron estudios de cultivo celular *in vitro* usando trastuzumab-MCC DM1 T-DM1) combinado con diferentes

agentes quimioterapéuticos o dirigidos de forma biológica en un número de líneas celulares amplificadas por HER2. Los datos se analizaron usando el método de Chou y Talalay para determinar el valor del Índice de Combinación (CI) para cada combinación, configuración en múltiplos de la CI_{50} para cada fármaco. Los valores del IC menores que 0,7 indican sinergia; los valores del IC entre 0,7-1,3 indican aditividad; y los valores del IC mayores que 1,3 indican antagonismo. T-DM1 combinado con GDC-0941 dio como resultado una actividad antiproliferativa aditiva o si

5 enérgica en experimentos de cultivo celular, y un aumento considerable de la eficacia antitumoral *in vivo* en comparación con el tratamiento con agentes individuales. Por el contrario, el trastuzumab sin conjugar antagonizaba la actividad de T-DM1 debido a la unión del mismo epítipo en HER2.

10 Se estudiaron combinaciones de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) con numerosos fármacos anticáncer midiendo tanto la actividad antiproliferativa *in vitro* en células de tumor de mama que sobreexpresan HER2 como la eficacia antitumoral *in vivo* en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama. En estos estudios, se añadió trastuzumab-MCC-DM1 a cualquiera de agentes quimioterapéuticos citotóxicos, anticuerpos, o inhibidores de quinasa de molécula

15 pequeña. El bloqueo de la ruta de la PI3 quinasa con GDC-0941, un pan inhibidor de quinasa de molécula pequeña de isoformas de p110 (documento de patente WO 2007/129161), potenciaba la actividad del trastuzumab-DM1.

20 T-DM1 combinado con el inhibidor GDC-0941 de PI3K aumentaba la actividad tumoral de, en líneas de cáncer de mama amplificado por HER2 PI3K con mutado: BT-474 (K111 N), MDA-361,1 (E545K), y KPL4 (H1047R). El tratamiento de combinación *in vitro* dio como resultado una inhibición aditiva o sinérgica de la proliferación celular, así como un aumento de la apoptosis. Del mismo modo, la eficacia *in vivo* aumentó con el tratamiento con fármacos combinados en comparación con la actividad de un solo agente en los modelos de xenoinjerto de amplificado por

25 HER2 de MDA-MB-361.1 y Fo5. Los análisis bioquímicos de biomarcadores para cada agente presentaban una inhibición de fosfoAkt y fosfo-ERK tanto con T-DM1 como con GDC-0941, una disminución de la fosforilación de Rb y PRAS40 por GDC-0941, un aumento de los niveles de los marcadores mitóticos fosfo-histona H3 y ciclina B1 después del tratamiento con T-DM1. Además, el tratamiento con T-DM1 dio como resultado la apoptosis en estos

30 modelos de cáncer de mama como se termina con el aspecto del fragmento de escisión de PARP de 23 kDa, disminución de los niveles de Bcl-XL, así como activación de las caspasas 3 y 7. La adición de GDC-0941 a T-DM1 aumentó de forma adicional la inducción de la apoptosis. Estos estudios proporcionan evidencias para el uso de combinaciones de fármacos racionales en cáncer de mama amplificado por HER2 y ofrecen enfoques terapéuticos adicionales para pacientes cuya enfermedad evoluciona con la terapia basada en trastuzumab o lapatinib.

35 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

La potencia *in vitro* de las composiciones de trastuzumab-MCC-DM1 con agentes quimioterapéuticos se midió mediante el ensayo de proliferación celular del Ejemplo 2; el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo[®], disponible en el mercado en Promega Corp., Madison, WI. Este método de ensayo homogéneo se basa en la

40 expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (documento de Patente de Estados Unidos N° 5583024; documento de Patente de Estados Unidos N° 5674713; documento de Patente de Estados Unidos N° 5700670) y determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch *et al.*, (1993) J. Immunol. Met. 160: 81-88; documento de Patente de Estados Unidos N° 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo[®] se realizó en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible a identificación sistemática de alto rendimiento automatizada (HTS) (Cree *et al.*, (1995) AntiCancer

45 Drugs 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición de un solo reactivo (Reactivo CellTiter-Glo[®]) directamente a células cultivadas en medio complementado con suero. No se requieren etapas de lavado celular, retirada del medio y pipeteo múltiple. El sistema detecta tan solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos a los 10 minutos después de la adición del reactivo y mezcla.

50 El formato de "añadir-mezclar-medir" homogéneo da como resultado lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en cultivo. El Ensayo de CellTiter-Glo[®] genera una señal luminiscente "de tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene por lo general una vida media superior a cinco horas, dependiendo del tipo de célula y medio usados. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia (RLU). El sustrato, Luciferina de Escarabajo, se descarboxila de forma oxidativa por la luciferasa de luciérnaga

55 recombinante con conversión simultánea de ATP en AMP y generación de fotones. La vida media prolongada elimina la necesidad de uso de inyectores para el reactivo y proporciona utilidad para el procesamiento en modo continuo o discontinuo de múltiples placas. Este ensayo de proliferación celular se puede usar con diversos formatos de múltiples pocillos, por ejemplo formato de 96 o 384 pocillos. Los datos se pueden registrar con un luminómetro o dispositivo de formación de imágenes con cámara CCD. La salida de luminiscencia se presenta como unidades

60 relativas de luz (RLU), medida en el tiempo.

Los efectos antiproliferativos del trastuzumab-MCC-DM1 y combinaciones, con agentes quimioterapéuticos se midieron con el Ensayo CellTiter-Glo[®] (Ejemplo 2) frente a las líneas de células tumorales en las Figuras 1-2 y 3-14.

65 Algunas realizaciones a modo de ejemplo incluyen un método para determinar compuestos a usar en combinación

para el tratamiento del cáncer que comprende: a) administrar una combinación terapéutica de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y un agente quimioterapéutico a una línea de células tumorales *in vitro*, y b) medir un efecto sinérgico o no sinérgico. Un valor del índice de combinación (IC) mayor que 1,3 indica antagonismo; los valores del IC entre 0,7-1,3 indican aditividad, y los valores de IC menores que 0,7 indican interacciones sinérgicas del fármaco.

5 La Figura 1 muestra el efecto antagonista de trastuzumab en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) a diversas concentraciones en múltiplos de los valores individuales de CI_{50} (Tabla 1) en células SK-BR-3 que son sensibles al trastuzumab. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplos de CI_{50} . El índice de combinación (IC) de CI_{10} a CI_{90} para cada combinación es mayor que 2, lo que indica antagonismo *in vitro*. Sin embargo, la combinación de T-DM1 + trastuzumab *in vivo* no muestra un efecto antagonista.

Tabla 1 Proliferación de SK-BR-3 - 3 días

múltiplo de CI_{50}	trastuzumab ng/ml	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,5 X	20,57	2,28	5,1	> 2
1 X	61,72	6,86	26,2	> 2
2 X	185,19	20,58	36,3	> 2
4 X	555,56	61,73	43,6	> 2
8 X	1666,67	185,19	45,0	> 2
16 X	5000	555,56	41,7	> 2

15 La Figura 2 muestra el efecto antagonista de trastuzumab en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) a diversas concentraciones en múltiplos de los valores individuales de CI_{50} (Tabla 2) en células BT-474 EEI que son resistentes al trastuzumab. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplos de CI_{50} . El índice de combinación (IC) de CI_{10} a CI_{90} para cada combinación es mayor que 2, lo que indica antagonismo.

20 Tabla 2 Proliferación de BT-474-EEI - 3 días

múltiplo de CI_{50}	trastuzumab ng/ml	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,125 X	1,52	1,52	9,5	> 2
0,25 X	4,57	4,57	4,5	> 2
0,5 X	13,71	13,71	3,1	> 2
1 X	41,15	41,15	12,1	> 2
2 X	123,46	123,46	10,8	> 2
4 X	370,4	370,4	11,6	> 2
8 X	1111,1	1111,1	18,4	> 2

25 La Figura 3 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de KPL4 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 (de 6,25 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 1 μ M) a concentraciones múltiplos de CI_{50} de 0,25x a 4x. La Tabla 3 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y el IC medio de 1.111. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos en la Figura 3. La representación de independencia de Bliss muestra la respuesta de la aditividad calculada de la combinación de dos compuestos individuales.

30 Tabla 3 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: KPL4 - 3 días

múltiplo de CI_{50}	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25x	62,5	6,25	1,0	6,319
0,5x	125	12,5	33,9	1,229
1x	250	25	71,8	1,053
2x	500	50	91,1	1,051
4x	1000	100	93,7	1,753

- La Figura 4 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de KPL4 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 (de 1,25 ng/ml a 80 ng/ml) y GDC-0941 (de 31,25 nM a 2 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,0625x a 16x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 23 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y el IC medio de 0,802. La combinación de T-DM1 y GDC-0941 es aditiva en la línea celular KPL4.

Tabla 4 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: KPL4 - 3 días

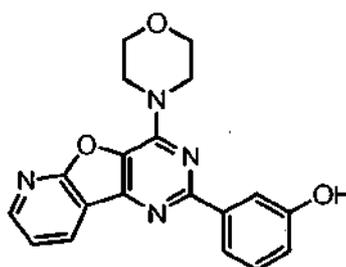
múltiplo de CI_{50}	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,125x	31,25	1,25	12,6	1,100
0,25x	62,5	2,5	20,6	1,344
0,5x	125	5	39,2	1,263
1x	250	10	84,5	0,452
2x	500	20	94,9	0,350
4x	1000	40	97,1	0,440
8x	2000	80	97,9	0,668

- La Figura 5 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de células KPL-4, mutantes para PIK3CA (H1047R), resistentes a HERCEPTIN®, amplificadas por Her2 después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941, a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0 a 16x. La Tabla 5 muestran los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren una sinergia *in vitro* moderada entre T-DM-1 y GDC-0941 ya que los valores del IC están entre 0,5 y 1, y la aditividad entre T-DM-1 y PI103 ya que los valores del IC son próximos a 1.

Tabla 5 Combinaciones: Proliferación de KPL4

IC a:	T-DM1 + GDC-0941	T-DM1 + PI103
DE ₅₀	0,74303	1,04069
DE ₇₅	0,63448	0,9721
DE ₉₀	0,54179	0,91094

- El inhibidor selectivo de PI3K, PI103 (Hayakawa *et al.*, (2007) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 2438-2442; Raynaud *et al.*, (2007) *Cancer Res.* 67: 5840-5850; Fan *et al.*, (2006) *Cancer Cell* 9: 341-349; documento de Patente de Estados Unidos N° 6608053), y tiene la estructura:



- La Figura 6 muestra una representación de la viabilidad celular de la apoptosis celular (muerte celular programada) *in vitro* de Caspasa 3/7 de KPL4 a las 24 horas después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y GDC-0941. La combinación de T-DM1 y GDC-0941 da como resultado un aumento de la apoptosis mucho mayor en comparación con cualquier agente solo.
- La Figura 7 muestra una representación de la viabilidad celular de la apoptosis celular (muerte celular programada) *in vitro* de KPL4 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y GDC-0941. La combinación de T-DM1 y GDC-0941 da como resultado un aumento de la apoptosis mucho mayor en comparación con cualquier agente solo.
- La Figura 8 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de MDA-MB-361 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 (de 3,125 ng/ml a 50 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 1 μ M) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,125x a 8x. La

predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 6 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 0,888. T-DM1 combinado con GDC-0941 da como resultado una actividad antiproliferativa aditiva en las células MDA-MB-361, con el IC medio = 0,889.

5 Tabla 6 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: MDA-MB-361 - 3 días

Cl ₅₀ múltiple	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25x	62,5	3.125	21,9	1,003
0,5x	125	6,25	37,3	0,862
1x	250	12,5	51,8	0,920
2x	500	25	73,1	0,742
4x	1000	50	82,3	0,917

10 La Figura 9 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de MDA-MB-361 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 (de 3,125 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 2 μM) a concentraciones múltiples de Cl₅₀ de 0,125x a 8x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 7 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 0,813. El T-DM1 combinado con GDC-0941 da como resultado una actividad antiproliferativa aditiva en las células MDA-MB-361, con el IC medio = 0,813.

15 Tabla 7 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: MDA-MB-361 - 3 días

múltiplo de Cl ₅₀	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25x	62,5	3.125	28,6	0,785
0,5x	125	6,25	36,7	0,960
1x	250	12,5	48,5	1,026
2x	500	25	66,6	0,807
4x	1000	50	82,2	0,590
8x	2000	100	87,7	0,709

20 La Figura 10 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de BT-474 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 (de 3,125 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (de 31,25 nM a 1 μM) a concentraciones múltiples de Cl₅₀ de 0,125x a 4x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 8 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 1,2122. GDC-0941 y T-DM1 no tienen un efecto de combinación en BT-474, usando estas proporciones de dosis.

25 Tabla 8 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: BT-474 - 3 días

múltiplo de Cl ₅₀	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,125x	31,25	3,125	8,0	> 2
0,25x	62,5	6,25	22,7	1,032
0,5x	125	12,5	31,4	1,178
1x	250	25	43,9	1,207
2x	500	50	53,9	1,473
4x	1000	100	71,5	1,171

30 La Figura 11 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de BT-474 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 (de 6,25 ng/ml a 100 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 1 μM) a concentraciones múltiples de Cl₅₀ de 0,25x a 4x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 9 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 0,997, lo que indica aditividad.

Tabla 9 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: BT-474 - 3 días

múltiplo de CI ₅₀	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25x	62,5	6,25	19,7	1,338
0,5x	125	12,5	31,5	1,167
1x	250	25	49,0	0,886
2x	500	50	66,0	0,708
4x	1000	100	73,9	0,886

La Figura 12 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de células AU565, no mutantes para PI3K, amplificadas por Her2 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941 a concentraciones múltiples de CI₅₀ de 0 a 16x. La Tabla 10 muestra los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren antagonismo *in vitro* entre T-DM-1 y GDC-0941 ya que los valores del IC están entre > 1, y aditividad o ligero antagonismo entre T-DM-1 y PI103 ya que los valores del IC son próximos o son ligeramente mayores que 1.

Tabla 10 Combinaciones: Proliferación de AU565

IC a:	T-DM1 + GDC-0941	T-DM1 + PI103
DE ₅₀	1,19123	1,12269
DE ₇₅	1,36342	0,97338
DE ₉₀	1,56063	0,84956

La Figura 13 muestra una representación de la viabilidad celular (proliferación) *in vitro* de células EFM192A, mutantes para PIK3CA (C420R), amplificadas por Her2, a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941, a concentraciones múltiples de CI₅₀ de 0 a 16x. La Tabla 11 muestra los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren una sinergia *in vitro* moderada entre T-DM-1 y GDC-0941 ya que los valores del IC están entre 0,5 y 1, y sinergia entre T-DM-1 y PI103 ya que los valores del IC son próximos a 0,5.

Tabla 11 Combinaciones: Proliferación de EFM 192A

IC a:	T-DM1 + GDC-0941	T-DM1 + PI103
DE ₅₀	0,80379	0,53861
DE ₇₅	0,66352	0,52087
DE ₉₀	0,5485	0,52001

La Figura 14 muestra una representación de la viabilidad celular de (proliferación) *in vitro* de células HCC1954, mutantes para PIK3CA (H1047R), resistentes a HERCEPTIN®, amplificadas por Her2 a los 3 días después del tratamiento con T-DM1, PI103, GDC-0941, y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 + PI103, y T-DM1 + GDC-0941, a concentraciones múltiples de CI₅₀ de 0 a 16x. La Tabla 12 muestra los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren aditividad o ligera sinergia *in vitro* entre T-DM-1 y GDC-0941 dado que los valores del IC son próximos a 1, y ligera sinergia entre T-DM-1 y PI103 dado que los valores del IC son <1.

Tabla 12 Combinaciones: Proliferación de HCC1954

IC a:	T-DM1 + GDC-0941	T-DM1 + PI103
DE ₅₀	1,15864	0,78902
DE ₇₅	0,92365	0,78684
DE ₉₀	0,74198	0,80771

EFICACIA DEL XENOINJERTO DE TUMOR *IN VIVO*

La eficacia de las combinaciones de la invención se puede medir *in vivo* mediante implante de aloinjertos o xenoinjertos de células cancerígenas en roedores y tratamiento de los tumores con las combinaciones. Se van a esperar resultados variables dependiendo de la línea celular, la presencia o ausencia de ciertas mutaciones en las

células tumorales, la secuencia de administración de trastuzumab-MCC-DM1 y agente quimioterapéutico, régimen de dosificación, y otros factores. Los ratones objeto se trataron con fármaco o fármacos o control (Vehículo) y se controlaron durante varias semanas o más para medir el tiempo de duplicación del tumor, log de la muerte celular, e inhibición tumoral (Ejemplo 3). Las Figuras 15 a 17 muestran la eficacia de trastuzumab-MCC-DM1 en combinaciones con agentes quimioterapéuticos mediante la inhibición de tumor con xenoinjerto en ratones.

La Figura 15 muestra una representación de la viabilidad celular del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk, (3) GDC-0941, 100 mg/kg, po, bid x21, (4) GDC-0152, 50 mg/kg, po, qwk x2, (5) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk + GDC-0941, 100 mg/kg, po, bid x21, (6) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk + GDC-0152, 50 mg/kg, po, qwk x2. El tratamiento con T-DM1 y GDC-0941 da como resultado un aumento de la actividad tumoral en comparación con el tratamiento con un solo agente, mientras que la combinación de T-DM1 y GDC-0152 no era más eficaz que T-DM1 solo.

GDC-0152 es un inhibidor de caspasas que son inhibidores de proteínas de apoptosis (Call *et al.*, (2008) *The Lancet Oncology*, 9 (10): 1002-1011; Deveraux *et al.*, (1999) *J Clin Immunol* 19: 388-398).

La Figura 16 muestra una representación de la viabilidad celular del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama MDA-MB-361.1 inoculado en ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21, (2) GDC-0941, 25 mg/kg, po, qd x21, (3) GDC-0941, 50 mg/kg, po, qd x21, (4) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21, (5) T-DM1, 3 mg/kg, iv, q3wk, (6) T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (7) GDC-0941, 25 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, q3wk, (8) GDC-0941, 50 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, q3wk, (9) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, q3wk, (10) GDC-0941, 25 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (11) GDC-0941, 50 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (12) GDC-0941, 100 mg/kg, po, qdx21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk.

Los animales dosificados con Vehículo (1) proporcionaban 0 respuestas parciales (PR) y 0 respuestas completas (CR). Los animales dosificados con GDC-0941 a 25 mg/kg solo (2) proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con GDC-0941 a 50 mg/kg solo (3) proporcionaron 1 PR y 0 CR. Los animales dosificados con GDC-0941 a 100 mg/kg solo (4) proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con T-DM1 a 3 mg/kg (5) solo proporcionaron 1 (PR) y 1 (CR). Los animales dosificados con T-DM1 a 10 mg/kg (6) solo proporcionaron 8 (PR) y 1 (CR). Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 3 mg/kg y GDC-0941 a 25 mg/kg (7) proporcionaron 5 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 3 mg/kg y GDC-0941 a 50 mg/kg (8) proporcionaron 3 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 3 mg/kg y GDC-0941 a 100 mg/kg (9) proporcionaron 3 PR y 1 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 10 mg/kg y GDC-0941 a 50 mg/kg (10) proporcionaron 9 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 10 mg/kg y GDC-0941 a 50 mg/kg (11) proporcionaron 7 PR y 2 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 10 mg/kg y GDC-0941 a 100 mg/kg (12) proporcionaron 9 PR y 1 CR.

La Figura 17 muestra una representación de la viabilidad celular del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama MDA-MB-361.1 inoculado en ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículos [MCT (metilcelulosa al 0,5 %/TWEEN 80 al 0,2 %) + tampón de succinato (succinato sódico 100 mM, 100 mg/ml de trehalosa, TWEEN 80 al 0,1 %, pH 5,0)], po + IV, qd x21 y qd (2) GNE-390, 1,0 mg/kg, po, qd x21, (3) GNE-390, 2,5 mg/kg, po, qd x21, (4) T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd, (5) GNE-390, 1,0 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd, (6) GNE-390, 2,5 mg/kg, po, qd x21 + T-DM1, 3 mg/kg, iv, qd.

Los animales dosificados con Vehículo (1) proporcionaron 0 respuestas parciales (PR) y 0 respuestas completas (CR). Los animales dosificados con GNE-390 a 1,0 mg/kg solo (2) proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con GNE-390 a 2,5 mg/kg solo (3) proporcionaron 1 PR y 0 CR. Los animales dosificados con T-DM1 a 3 mg/kg (5) solo proporcionaron 1 (PR) y 1 (CR). Los animales dosificados con T-DM1 a 3 mg/kg (4) solo proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 3 mg/kg y GNE-390 a 25 mg/kg (5) proporcionaron 3 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 3 mg/kg y GNE-390 a 2,5 mg/kg (6) proporcionaron 5 PR y 1 CR. La combinación de GNE-390 con T-DM1 aumentaba de forma significativa el número de respuestas antitumorales parciales y completas cuando se compara con GNE-390 o T-DM1 solo en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MDA-MB-361.1.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen combinaciones de trastuzumab-MCC-DM1, GDC-0941 y/o GNE-390 y uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las combinaciones terapéuticas de trastuzumab-MCC-DM1 y GDC-0941 o GNE-390 de la invención pueden existir en formas sin solvatar así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente fetales tales como agua, etanol, y similares, y se pretende que la invención incluya formas tanto solvatadas como sin solvatar.

Las combinaciones terapéuticas de trastuzumab-MCC-DM1 y GDC-0941 o GNE-390 de la presente invención también pueden existir en diferentes formas tautoméricas, y todas estas formas se incluyen dentro del alcance de la invención. El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que se pueden interconvertir mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante migración de un protón, tales como isomerías ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante reorganización de algunos de los electrones del enlace.

Las composiciones farmacéuticas incluyen tanto la composición a granel y unidades de dosificación individuales formadas por más de un (por ejemplo, dos) principios farmacéuticamente activos que incluyen combinaciones terapéuticas de trastuzumab-MCC-DM1 y GDC-0941 o GNE-390 que se describen en el presente documento, junto con cualquier excipiente, diluyente, vehículo o sustancia de deslizamiento farmacéuticamente inactivos. La composición a granel y cada unidad de dosificación individual puede contener cantidades fijas de los principios farmacéuticamente activos mencionados anteriormente. La composición a granel es material que todavía no se ha formado en unidades de dosificación individual. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares.

Las composiciones farmacéuticas también incluyen compuestos de la presente invención marcados de forma isotópica que son idénticos a los que se mencionan en el presente documento, pero por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan con un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado normalmente en la naturaleza. Todos los isótopos de cualquier átomo o elemento en particular como se especifica se contemplan dentro del alcance de los compuestos de la invención, y sus usos. Algunos isótopos a modo de ejemplo que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro e yodo, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I e ^{125}I . Ciertos compuestos de la presente invención marcados de forma isotópica (por ejemplo, los marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles ensayos de distribución de compuesto y/o tejido de sustrato. Los isótopos tritados (^3H) y de carbono 14 (^{14}C) son útiles por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (^2H) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una estabilidad metabólica más elevada (por ejemplo, aumento de la vida media *in vivo* o reducción de los requisitos de dosificación) y por lo tanto pueden ser preferentes en algunas circunstancias. Algunos isótopos que emiten positrones tales como ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F son útiles para estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Por lo general, algunos compuestos de la presente invención marcados de forma isotópica se pueden preparar siguiendo procedimientos análogos a los que se desvelan en los Esquemas y/o en los Ejemplos que siguen a continuación en el presente documento, mediante sustitución de un reactivo marcado de forma isotópica por un reactivo no marcado de forma isotópica.

El trastuzumab-MCC-DM1 y algunos agentes quimioterapéuticos se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional para uso en una combinación terapéutica para tratamiento terapéutico (incluyendo el tratamiento profiláctico) de trastornos hiperproliferativos en mamíferos que incluyen seres humanos. La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende trastuzumab-MCC-DM1 en asociación con with uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Algunos vehículos, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen materiales tales como carbohidratos, ceras, polímeros solubles y/o hinchables en agua, materiales hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El vehículo, diluyente o excipiente en particular usado dependerá de los medios y finalidad para los que se está aplicando el compuesto de la presente invención. Los disolventes por lo general se seleccionan basándose en disolventes reconocidos como seguros (GRAS) por personas expertas en la materia para su administración a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tales como agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Algunos disolventes acuosos adecuados incluyen agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 300), etc. y mezclas de los mismos. Las formulaciones también pueden incluir uno o más tampones, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes mercantes, agentes lubricantes, emulgentes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes de opacidad, sustancias de deslizamiento, adyuvantes de procesamiento, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes saborizantes y otros aditivos conocidos por proporcionar una presentación del fármaco elegante (es decir, un compuesto de la presente invención o composición farmacéutica del mismo) o por ayudar en la preparación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

Las formulaciones se pueden preparar usando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. For por ejemplo, la sustancia farmacológica a granel (es decir, el compuesto de la presente invención o forma estabilizada del compuesto (por ejemplo, complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente de formación de complejos conocido) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes que se han descrito anteriormente. El compuesto de la presente invención por lo general se formula en forma de dosificación farmacéutica para proporcionar una dosificación del fármaco que se puede controlar fácilmente y para permitir al paciente el cumplimiento del régimen prescrito.

La composición (o formulación) farmacéutica para aplicación se pueden basar en diversas formas dependiendo del método usado para la administración del fármaco. Por lo general, un artículo para distribución incluye un envase que tiene depositado en el mismo la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Los expertos en la materia conocen bien los envases adecuados e incluyen materiales tales como frascos (plástico y vidrio), sobrecitos, ampollas, bolsas de plástico, cilindros de metal, y similares. El envase también puede incluir un ensamblaje a prueba de manipulación para evitar el acceso indiscreto a los contenidos del envase. Además, el envase tiene depositado en el mismo una etiqueta que describe los contenidos del envase. La etiqueta también puede incluir las advertencias apropiadas.

Las formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente invención se pueden preparar para diversas vías y tipos de administración con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1995) 18ª edición, Mack Publ. Co., Easton, PA), en la forma de una formulación liofilizada, polvo molido, o una solución acuosa. La formulación se puede realizar mezclando a temperatura ambiente con el pH apropiado, y con el grado de pureza deseado, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que no son tóxicos para los receptores a las clasificaciones y concentraciones usadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso y de la concentración de compuesto en particular, pero puede variar de aproximadamente 3 a aproximadamente 8.

La formulación farmacéutica es preferentemente estéril. En particular, las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Tal esterilización se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtraciones estériles.

La formulación farmacéutica habitualmente se puede almacenar como una composición sólida, una formulación liofilizada o como una solución acuosa.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención se dosificarán y administrarán de una manera, es decir, cantidades, concentraciones, programas, transcurso, vehículos y vía de administración, coherentes con la buena práctica médica. Algunos factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto a administrar estará regida por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar el trastorno mediado por el factor de coagulación. Tal cantidad es preferentemente inferior a la cantidad que es tóxica para el hospedador o que hace al hospedador más susceptible al sangrado de forma significativa.

Como una propuesta general, la cantidad farmacéuticamente eficaz inicial de trastuzumab-MCC-DM1 administrada por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01-100 mg/kg, en particular de aproximadamente 0,1 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal del paciente al día, siendo el intervalo inicial de compuesto habitual usado de 0,3 mg/kg/día a 15 mg/kg/día.

Algunos diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo, etanol, o alcohol bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos) polipéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, que incluyen Tween 80, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG), que incluye PEG400. Los principios farmacéuticos activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, (1995) Mack Publ. Co., Easton, PA.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para las vías de administración que se detallan en el presente documento. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Algunas técnicas informaciones por lo general se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formaciones se preparan poniendo la asociación de forma uniforme de íntima el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, se da forma al producto.

Algunas formulaciones de un agente quimioterapéutico adecuadas para administración oral se pueden preparar comunidades separadas tales como píldoras, duras o blandas por ejemplo, cápsulas de gelatina, obleas, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, jarabes o elixires cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de un compuesto de trastuzumab-MCC-DM1 y/o un agente quimioterapéutico. Tales formulaciones se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la preparación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, para proporcionar una preparación de sabor agradable. Los comprimidos formados por compresión se pueden preparar mediante la compresión del principio activo en una máquina adecuada en una forma del flujo libre tal como un polvo o gránulos, mezclados opcionalmente con un agente aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente de superficie activa o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar por moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del principio activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden revestir o ranurar opcionalmente y se formulan de forma opcional con el fin de proporcionar una liberación lenta o controlada el principio activo a partir del mismo.

Algunos excipientes de comprimidos de una formulación farmacéutica pueden incluir: Carga (o diluyente) para aumentar el volumen a granel del fármaco en polvo que forma el comprimido; Agentes disgregantes para fomentar que el comprimido se rompa en pequeños fragmentos, de forma ideal en partículas de fármaco individuales, cuando se ingiere y estimular la rápida disolución y absorción del fármaco; Agente aglutinante para asegurar que se pueden formar gránulos y comprimidos con la resistencia mecánica requerida y pueden mantener un comprimido en conjunto después de que se haya formado por compresión, evitando que se descomponga en sus componentes en polvo durante el envasado, transporte y manipulación de rutina; Agente de deslizamiento para aumentar la fluidez del polvo que compone el comprimido durante la producción; Lubricante para asegurar que el polvo para la formación de comprimidos no se adhiere al equipo usado para presionar el comprimido durante la preparación. Éstos mejoran el flujo de las mezclas de polvo a través de las prensas y reducen al mínimo la fricción y la rotura a medida que los comprimidos acabados se expulsan del equipo; Sustancia antiadherente con función similar a la del agente de deslizamiento, que reduce la adhesión entre el polvo que forma el comprimido y la máquina que se usa para perforar la forma del comprimido durante la preparación; Sabor incorporado en los comprimidos para darles un sabor más agradable o para enmascarar un sabor desagradable y Colorante para facilitar la identificación y el cumplimiento del paciente.

Son aceptables algunos comprimidos que contienen el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la preparación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico o sódico, lactosa, fosfato cálcico o sódico; agentes de granulación y disgregantes, tales como almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Algunos comprimidos pueden estar sin revestir o se pueden revestir mediante técnicas conocidas que incluyen microencapsulación para retrasar la disgregación y adsorción en el tracto gastrointestinal y de este modo proporcionan una acción sostenida durante un periodo de tiempo más largo. For ejemplo, se puede usar un material de retraso del tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

Para el tratamiento del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, boca y piel, las formulaciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica que contiene el principio o principios activos en una cantidad, por ejemplo, de un 0,075 % a un 20 % en p/p. Cuando se formulan como una pomada, los principios activos se pueden usar con cualquiera de una base para pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, los principios activos se pueden formular en una crema con una base de crema de aceite en agua.

Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (que incluye PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir de forma deseable un compuesto que aumenta la absorción o penetración del principio activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Algunos ejemplos de tales potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención puede estar formada por ingredientes conocidos de una manera conocida, que incluye una mezcla de al menos un agente emulgente con una grasa o un aceite, o tanto con una grasa como con un aceite. Preferentemente, se incluye un agente emulgente hidrófilo junto con un agente emulgente lipófilo que actúa como un estabilizante. En conjunto, el emulgente o emulgentes con o sin estabilizante estabilizantes forman una cera de emulsión, y la cera en conjunto con el aceite y la grasa comprenden una base de pomada emulgente que forman la fase dispersa oleosa de las formulaciones de crema. Algunos emulgentes y estabilizantes de emulsión adecuados para uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetoestearílico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico.

Algunas suspensiones acuosas de las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la preparación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropil

- metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilén sorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más agentes conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.
- 10 Algunas composiciones farmacéuticas se pueden presentar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida que usa los agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación estéril inyectable puede ser una solución o una suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución en 1,3-butanodiol o se puede preparar a partir de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar se encuentran el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, de forma convencional se pueden usar aceites no volátiles estériles como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite no volátil insípido que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de agentes inyectables se pueden usar del mismo modo ácidos grasos tales como ácido oleico.
- 15 La cantidad de principio activo que se puede combinar con el material vehículo para producir una forma de clasificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración en particular. Por ejemplo, una formulación de liberación en el tiempo destinada a la administración oral a seres humanos puede contener de aproximadamente 1 mg a 1000 mg de material activo mezclado con una cantidad conveniente y apropiada de material vehículo que puede variar de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 95 % de las composiciones totales (peso:peso). La composición farmacéutica se puede preparar para que proporcione cantidades que se pueden medir fácilmente para su administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada a la infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 µg a 500 µg del principio activo por mililitro de solución para que se produzca la infusión de un volumen adecuado a una tasa de aproximadamente 30 ml/h.
- 20 Algunas formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.
- 25 Algunas formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo incluyen gotas oculares en las que el principio activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el principio activo. El principio activo está presente preferentemente en tales formulaciones en una concentración de aproximadamente un 0,5 % a un 20 % en p/p, por ejemplo de aproximadamente un 0,5 % a un 10 % en p/p, por ejemplo aproximadamente un 1,5 % en p/p.
- 30 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base de sabor, normalmente sacarosa y goma arábica o de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.
- 35 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende por ejemplo manteca de cacao o un salicilato.
- 40 Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula por ejemplo en el intervalo de 0,1 micrómetros a 500 micrómetros (incluyendo tamaño de partícula en un intervalo entre 0,1 micrómetros y 500 micrómetros en incrementos micrométricos tales como 0,5 micrómetros, 1 micrómetro, 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administran mediante inhalación rápida a través de la vía nasal o mediante inhalación a través de la boca con el fin de alcanzar los sacos alveolares. Algunas formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo. Algunas formulaciones adecuadas para administración de aerosol o polvo seco se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales y se pueden administrar con otros agentes terapéuticos tales como compuestos usados hasta el momento en el tratamiento o profilaxis de trastornos como se describe a continuación.
- 45 Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio activo tales vehículos que en la técnica se sabe que son apropiados.
- 50 Las formulaciones se pueden envasar en envases de dosis individual o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua, para inyección inmediatamente antes de su uso. Algunas

soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo que se ha descrito anteriormente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferentes son las que contienen una dosis diaria o subdosis diaria unitaria, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

5 La invención proporciona adicionalmente composiciones veterinarias que comprenden al menos un principio activo como se ha definido anteriormente en conjunto con un vehículo veterinario del mismo. Algunos vehículos veterinarios son materiales útiles con el fin de administración de la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que de otro modo son inertes o aceptables en la clínica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía parenteral, por vía oral o mediante cualquier otra ruta deseada.

TERAPIA DE COMBINACIÓN

15 El trastuzumab-MCC-DM1 se puede usar en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer que expresa ErbB2. En ciertas realizaciones, el trastuzumab-MCC-DM1 se combina en una formulación de la combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anti-hiperproliferativas o que es útil para el tratamiento del cáncer que expresa ErbB2. El segundo compuesto de la formulación de la combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferentemente actividades complementarias con el trastuzumab-MCC-DM1, y de modo que no influyen de forma adversa entre sí. Tales compuestos están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad pretendida. En una realización, una composición de la presente invención comprende trastuzumab-MCC-DM1 en combinación con una combinación terapéutica de GDC-0941 o GNE-390 que se describe en el presente documento. El Ejemplo 4 es un protocolo clínico para T-DM1+ GDC-0941.

25 La terapia de combinación se puede administrar como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra de forma secuencial, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que existe preferentemente un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) principios activos ejercen de forma simultánea sus actividades biológicas.

Algunas dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente son las que se usan en la actualidad se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente recién identificado y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

35 En una realización en particular de terapia anticáncer, el trastuzumab-MCC-DM1 se puede combinar con una combinación terapéutica de GDC-0941 o GNE-390 que se describe en el presente documento, así como combinado con terapia quirúrgica y radioterapia. Las cantidades de trastuzumab-MCC-DM1 y el otro u otros agentes quimioterapéuticos farmacéuticamente activos y los tiempos relativos de administración se seleccionarán para conseguir el efecto terapéutico combinado deseado.

ADMINISTRACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Los compuestos de la invención se pueden administrar mediante cualquier vía apropiada para la afección a tratar. Algunas vías adecuadas incluyen oral, parenteral (que incluye técnicas subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, inhalación, intradérmica, intratecal, epidural, y difusión), transdérmica, rectal, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), vaginal, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. La administración tópica también puede implicar el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. La formulación de los fármacos se analiza en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Otros ejemplos de formulaciones farmacológicas se pueden encontrar en Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol 3, 2^a Ed., New York, NY. Para tratamiento inmunosupresor local, los compuestos se pueden administrar mediante administración intralesional, que incluye perfusión o de otro modo puesto en contacto del injerto con el inhibidor antes del trasplante. Se observará que la vía preferente puede variar por ejemplo con la afección del receptor. Cuando el compuesto se administra por vía oral, se puede formular como una píldora, cápsula, comprimido, etc. con un vehículo, sustancia de deslizamiento, por excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando el compuesto se administra por vía parenteral, se puede formular con un vehículo o diluyente parenteral farmacéuticamente aceptable, y en una forma inyectable de dosificación unitaria, como se detalla a continuación.

60 Una dosis de trastuzumab-MCC-DM 1 para tratar pacientes humanos puede variar de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg. La dosis de trastuzumab-MCC-DM1 se puede administrar una vez cada seis semanas, una vez cada tres semanas, semanalmente, o de forma más frecuente, dependiendo de las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD), que incluyen absorción, distribución, metabolismo, y excreción. Una dosis del agente quimioterapéutico, usada en combinación con trastuzumab-MCC-DM 1, puede variar de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg. El agente quimioterapéutico se puede administrar una vez cada seis semanas, una vez cada tres semanas, semanalmente, o de forma más frecuente, tal como una vez o dos

veces al día. Además, algunos factores de toxicidad pueden influir en la dosificación y régimen de administración. Cuando se administra por vía oral, la píldora, cápsula, o comprimidos se puede ingerir diariamente o de forma menos frecuente durante un periodo de tiempo especificado. El régimen se puede repetir para un número de ciclos de terapia.

5

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Las combinaciones terapéuticas de: (1) trastuzumab-MCC-DM1 y (2) GDC-0941 o GNE-390 son útiles para el tratamiento de cáncer caracterizado por la activación de la ruta de HER2.

10

Algunos cánceres que se pueden tratar de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, mama, ovario, cuello uterino, próstata, testículo, tracto genitourinario, esófago, laringe, glioblastoma, neuroblastoma, estómago, piel, queratoacantoma, pulmón, carcinoma epidermoide, carcinoma macrocítico, carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma microcítico, adenocarcinoma de pulmón, hueso, colon, adenoma, páncreas, adenocarcinoma, tiroides, carcinoma folicular, carcinoma no diferenciado, carcinoma papilar, seminoma, melanoma, sarcoma, carcinoma de vejiga, carcinoma de hígado y vías biliares, carcinoma de riñón, trastornos mieloides, trastornos linfoides, células pilosas, cavidad bucal y faringe (oral), labio, lengua, boca, faringe, intestino delgado, colon-recto, intestino grueso, recto, cerebro y sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin y leucemia.

15

20

Las composiciones farmacéuticas o combinaciones terapéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que padece cáncer que expresa ErbB2.

ARTÍCULOS PARA PREPARACIÓN

25

Las combinaciones terapéuticas que pueden proporcionar como un artículo de preparación, o se proporciona un "kit", que contiene trastuzumab-MCC-DM1 útil para el tratamiento de las enfermedades o trastornos que se han descrito anteriormente. El kit puede comprender un envase que comprende trastuzumab-MCC-DM1. El kit puede comprender adicionalmente una etiqueta o prospecto, en el envase o asociado al mismo. El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información aproximada sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de tales productos terapéuticos. Tales envases incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envase de tipo blíster, etc. El envase se puede formar a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El envase puede contener trastuzumab-MCC-DM1 o una formulación del mismo que es eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede estar en una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perfora bien mediante una aguja para inyección hipodérmica). Al menos un principio activo en la composición es trastuzumab-MCC-DM1. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección de elección, tal como cáncer. En una realización, la etiqueta prospectos indica que la composición que comprende trastuzumab-MCC-DM1 se puede usar para tratar un trastorno que resulta de crecimiento celular anómalo. La etiqueta o prospecto también puede indicar que la composición se puede usar para tratar otros trastornos. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de preparación también puede comprender un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

30

35

40

45

El kit puede comprender adicionalmente directrices para la administración de trastuzumab-MCC-DM1 y, si está presente, GDC-0941 o GNE-390. For ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende trastuzumab-MCC-DM1 y una formulación farmacéutica de GDC-0941 o GNE-390, el kit puede comprender adicionalmente directrices para la administración simultánea, secuencial o separada del primero y las formulaciones de GDC-0941 o GNE-390 a un paciente con necesidad de las mismas.

50

En otra realización, los kits son adecuados para la administración de formas orales sólidas de trastuzumab-MCC-DM1, tales como comprimidos o cápsulas. Tal kit incluye preferentemente un número de dosificaciones unitarias. Tales kits pueden incluir una tarjeta que tiene las dosificaciones orientadas en el orden de su uso pretendido. Un ejemplo de tal kit es un "envase de tipo blíster". Los envases de tipo blíster se conocen bien en la industria del envasado y se usan ampliamente para el envasado de formas de dosificación unitaria farmacéuticas. Si se desea, se puede proporcionar una ayuda nemotécnica, por ejemplo en forma de números, letras, u otras marcas o con un inserto de calendario, que marca los días en el programa de tratamiento en el que se pueden administrar las dosificaciones.

55

60

De acuerdo con una realización, un kit puede comprender (a) un primer envase con trastuzumab-MCC-DM1 contenido en el mismo; y opcionalmente (b) un segundo envase con una segunda formulación farmacéutica contenida en el mismo, en el que la segunda formulación farmacéutica comprende GDC-0941 o GNE-390.

65

Como alternativa, o adicionalmente, el kit también puede comprender adicionalmente un tercer envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución

salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables a partir de un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

- 5 Cuando el kit comprende una composición de trastuzumab-MCC-DM1 y un segundo agente terapéutico, es decir, GDC-0941 o GNE-390, el kit puede comprender un envase para contener las composiciones separadas tal como un frasco dividido o un paquete de papel de aluminio dividido, sin embargo, las composiciones separadas también pueden estar contenidas dentro de un envase sin dividir, individual. Por lo general, el kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en formas de dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se administran en intervalos de dosificación diferentes, o cuando el médico que prescribe desea la valoración de los componentes individuales de la combinación.

Ejemplos

- 15 Para ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 Preparación de trastuzumab-MCC-DM1

- 20 El trastuzumab se purificó a partir de HERCEPTIN® mediante intercambio de tampón a 20 mg/ml en fosfato potásico 50 mM / cloruro sódico 50 mM / EDTA 2 mM, pH 6,5 y se trató con 7,5 a 10 equivalentes molares de 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc), 20 mM en DMSO o DMA (dimetilacetamida), 6,7 mg/ml (documento de patente US 2005/0169933; documento de patente US 2005/0276812). Después de agitación de 2 a 4 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con fosfato potásico 50 mM/ 50 mM cloruro sódico/ EDTA 2 mM, pH 6,5. Como alternativa, la mezcla de reacción se filtró en gel con citrato 30 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 6. Las fracciones que contienen anticuerpo se combinaron y se sometieron a ensayo. La recuperación de trastuzumab-SMCC fue de un 88 %.

- 30 El compuesto intermedio de fármaco-conector, el trastuzumab-MCC mencionada anteriormente, se diluyó con fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de 10 mg/ml, y se hizo reaccionar con una solución de DM1 10 mM (1,7 equivalentes suponiendo 5 SMCC/trastuzumab, 7,37 mg/ml) en dimetilacetamida. DM1 se puede preparar a partir de productos de fermentación de ansamitocina (documento de Patente de Estados Unidos N° 6790954; documento de Patente de Estados Unidos N° 7432088) y se puede derivatizar para conjugación (documento de Patente de Estados Unidos N° 6333410; RE 39151). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón de 4 a aproximadamente 16 horas. La mezcla de la reacción de conjugación se filtró a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con 1 x PBS a pH 6,5. Como alternativa, la mezcla de reacción se filtró en gel con succinato 10 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 5. La proporción de DM1/trastuzumab (p) era de 3,1, como se mide mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm. La proporción de fármaco con respecto al anticuerpo (p) también se puede medir mediante espectrometría de masas. La conjugación también se puede controlar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. La agregación se puede evaluar mediante análisis por dispersión de luz láser.

- 45 Como alternativa, el trastuzumab-MCC-DM1 se puede preparar formando un reactivo de conector-fármaco MCC-DM1 y a continuación se hace reaccionar con el trastuzumab.

- Por lo general, una reacción de conjugación de trastuzumab-MCC con DM1 da como resultado una mezcla heterogénea que comprende diferentes números de anticuerpos de fármacos de DM1 conjugados, unidos, es decir una carga de fármaco en la que p es una distribución de 1 a aproximadamente 8. Una dimensión adicional de heterogeneidad existe con diferentes sitios de unión de SMCC a trastuzumab en los que muchos nucleófilos diferentes en el trastuzumab, por ejemplo grupos amino de lisina terminal, pueden reaccionar con SMCC. Por lo tanto, el trastuzumab-MCC-DM1 incluye moléculas de especies purificadas, aisladas así como mezclas de carga media del fármaco de 1 a 8 y en las que MCC-DM1 se une a través de cualquier sitio del anticuerpo trastuzumab.

- 55 El número medio de restos de fármaco DM1 por anticuerpo trastuzumab en preparaciones de trastuzumab-MCC-DM1 a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar mediante medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA, electroforesis, y HPLC. La distribución cuantitativa de trastuzumab-MCC-DM1 en términos de p también se puede determinar. Mediante ELISA, se puede determinar el valor medio de p en una preparación en particular de ADC (Hamblett *et al.*, (2004) *Clinical Cancer Res.* 10: 7063-7070; Sanderson *et al.*, (2005) *Clinical Cancer Res.* 11: 843-852). Sin embargo, la distribución de los valores de p (fármaco) no se puede discernir mediante la unión de anticuerpo-antígeno y limitación de la detección de ELISA. Además, el ensayo de ELISA para detección de jugados de anticuerpo-fármaco no determina cuando se unen los restos de fármaco al anticuerpo, tal como los fragmentos de cadena pesada o de cadena ligera, o los restos de aminoácido en particular. En otros casos, la separación, purificación y caracterización de trastuzumab-MCC-DM1 homogéneo en el que p es un valor determinado para trastuzumab-MCC-DM1 con otras cargas de fármaco se puede conseguir por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

Ejemplo 2 Ensayo de Proliferación Celular *In Vitro*

La eficacia de las combinaciones de la invención se midió mediante un ensayo de proliferación celular que usa el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza *et al.*, (2002) Cancer Res. 62: 5485-5488).

5 Los reactivos del ensayo de Cell-Titer Glo y el protocolo están disponibles en el mercado (Promega). El ensayo evalúa la capacidad de los compuestos para entrar en las células e influir en la proliferación celular. El principio del ensayo es la determinación del número de células viables presentes mediante la cuantificación del ATP celular. Cell-Titer Glo es el reactivo usado para esta cuantificación. Se trata de un ensayo homogéneo en el que la adición del Cell-Titer Glo da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente a través de la reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente.

DMSO y Placas de los Medios: placas de polipropileno de fondo cónico de 96 pocillos de Nunc (Nº de cat. 249946)

15 Placas de Células: placas de TC, de fondo transparente (microtransparente), de color negro de 384 pocillos, con tapa de Falcon (353962)

Medio del Cultivo Celular: RPMI o DMEM de glucosa elevada; F-12 de Ham (50:50), Suero Bovino Fetal al 10 %, L-Glutamina 2 mM

20 Cell Titer-Glo: Promega (Nº de cat. G7572)

Procedimiento:

25 Día 1 - Sembrar Placas de Células, Cosechar células, Sembrar células a 1000-2000 células por 54 µl por pocillo en Placas de Células de 384 pocillos para ensayo de 3 días. Incubar durante una noche (aprox. 16 h) a 37 °C, CO₂ al 5 %.

30 Día 2 - Añadir Fármaco a las Células, Dilución del Compuesto, Placas con DMSO (en serie de 1:2 para 9 puntos). Añadir 20 µl de compuestos (solución de reserva 10 mM para fármacos de molécula pequeña) en la 2ª columna de la placa de 96 pocillos. Realizar series de 1:2 a través de la placa (10 µl + 10 µl de DMSO al 100 %) para un total de 9 puntos usando Placas de Medios de Precisión (dilución a 1:50). Añadir 147 µl de Medios en todos los pocillos de placas de medios de 96 pocillos separadas. Transferir 3 µl de DMSO + compuesto de cada pocillo en la Placa de DMSO a cada pocillo correspondiente en la Placa de Medios usando Rapidplate. Para estudios de combinación de 2 fármacos, transferir 1,5 µl de un fármaco de DMSO + compuesto de cada pocillo en la Placa de DMSO a cada pocillo correspondiente en la Placa de Medios usando Rapidplate. A continuación, transferir otro 1,5 µl de fármaco a la placa de medio.

40 Adición de Fármaco a las Células, Placa de Células (dilución a 1:10), Añadir 6 µl de medios + compuesto directamente a las células (54 µl de medios en las células rápidamente). Incubar 3 días a 37 °C, CO₂ al 5 % en una incubadora que no se abrirá a menudo.

45 Día 5 - Desarrollar las Placas, Descongelar el Tampón Cell Titer Glo a temperatura ambiente. Retirar las Placas con Células de 37 °C y equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Añadir Tampón de Cell Titer Glo a Sustrato de Cell Titer Glo (de frasco a frasco). Añadir 30 µl de Reactivo de Cell Titer Glo a cada pocillo de células. Colocar en el agitador de placas durante aproximadamente 30 minutos. Leer la luminiscencia en Lector de placas de PerkinElmer Envision (0,1 segundos por pocillo) o Analyst HT (medio segundo por pocillo).

50 Ensayos de viabilidad celular y ensayos de combinación: Las células se sembraron a 1000-2000 células/pocillo en placas de 384 pocillos durante 16 h. En el día dos, se realizaron nueve diluciones a 1:2 del compuesto en serie en DMSO en una placa de 96 pocillos. Los compuestos se diluyeron adicionalmente en medios de crecimiento usando un robot Rapidplate (Zymark Corp., Hopkinton, MA). Los compuestos diluidos se añadieron a continuación a pocillos por cuadruplicado en placas de células de 384 pocillos y se incubó a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de 4 días, los números relativos de células viables emitieron por luminiscencia usando Cell-Titer Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyeron en un Lector Multimarca de Envision o un Lector Wallac (PerkinElmer, Foster City). Los valores de la CE₅₀ se calcularon usando el software Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software) o Prism 4.0 (GraphPad, San Diego). Los fármacos en ensayos de combinación se dosificaron comenzando en concentraciones de CE₅₀ de 8X. En los casos en los que la CE₅₀ del fármaco era >2,5 µM, la concentración más elevada usada era de 10 µM. Se añadieron trastuzumab-MCC-DM1 y agentes quimioterapéuticos de forma simultánea o separada por 4 horas (una antes de la otra) en todos los ensayos.

60 Un ensayo de proliferación celular *in vitro* a modo de ejemplo adicional incluye las siguientes etapas:

- 65 1. una alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10⁴ células (véase la Figura 1 para líneas celulares y tipo de tumor) en medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 384 pocillos.
2. Se prepararon pocillos de control que contienen medio y sin células.

3. El compuesto se añadió a los pocillos experimentales y se incubó durante 3-5 días.
4. Las placas equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen de Reactivo de CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. La placa se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró y se informó en gráficos como RLU = unidades relativas de luminiscencia.

Como alternativa, las células se sembraron a una densidad óptima en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 4 días en presencia de compuesto de ensayo. Posteriormente se añadió Azul de Alamar™ al medio de ensayo, y las células se incubaron durante 6 h antes de la lectura a una excitación de 544 nm, una emisión de 590 nm. Los valores de la CE₅₀ se calcularon usando un ajuste de curva de dosis respuesta sigmoidea.

Ejemplo 3 Xenoinjerto de Tumor *In Vivo*

Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener en fuentes comerciales convencionales. Grupos de ratones beige CB-17 SCID hembra (Charles River Laboratory) se implantaron con 3 millones de células de cáncer de mama KPL-4 (que sobreexpresa Her2) con Matrigel en la almohadilla de grasa mamaria. Grupos de ratones desnudos atímicos hembra (Charles River Laboratory o Harlan) se implantaron con fragmentos de 2 x 2 mm³ de tumores de mama transgénicos de MMTV-Her2 Fo5 en la almohadilla de grasa mamaria. Los xenoinjertos de ratón se dosificaron en el día 0 con fármaco, combinación de fármacos, o vehículo de acuerdo con el programa especificado para cada modelo de tumor. 5-FU, gemcitabina, carboplatino y B20-4,1 se administraron por vía intraperitoneal, el pertuzumab se administró por vía intravenosa o intraperitoneal según se indique, trastuzumab-MCC-DM 1 y docetaxel se administraron por vía intravenosa, lapatinib, GDC-0941 y ABT-869 se administraron por vía perioral mediante sonda. Los tamaños del tumor se registraron dos veces a la semana durante el transcurso del estudio. Los pesos corporales del ratón también se registraron dos veces a la semana, y los ratones se observaron de forma regular. El volumen del tumor se midió en dos dimensiones (largo y ancho) usando pinzas Ultra Cal IV (Modelo 54-10-111; Fred V. Fowler Co., Inc.; Newton, MA) y se analizaron usando Excel v.11.2 (Microsoft Corporation; Redmond, WA). Los gráficos de inhibición del tumor se representaron usando KaleidaGraph, Versión 3.6 (Synergy Software; Reading, PA). El volumen del tumor se calculó con la fórmula: Tamaño del tumor (mm³) = (medida más larga x medida más corta²) x 0,5.

Los pesos corporales de los animales se midieron usando una escala Adventurera Pro AV812 (Ohaus Corporation; Pina Brook, NJ). Los gráficos se generaron usando la Versión 3.6 de KaleidaGraph. El porcentaje de la variación de peso se calculó usando la fórmula: Variación del porcentaje de peso por un grupo = (1-(peso inicial / nuevo peso)) x 100.

Los ratones cuyo volumen tumoral superaba 2000 mm³ o cuya pérdida de peso corporal era superior a un 20 % de su peso de partida se sacrificaron rápidamente de acuerdo con las directrices reguladoras.

El porcentaje de retraso de crecimiento tumoral (% de TGD) al final del estudio (EOS) se calculó usando la fórmula: % de TGD = 100 x (Tiempo medio hasta el punto final para el grupo de tratamiento – tiempo medio hasta el punto final para el grupo de control)/Tiempo medio hasta el punto final para el grupo de control.

La incidencia del tumor (TI) se determinó basándose en el número de tumores que se podían medir restantes en cada grupo a finales. Una respuesta parcial (PR) se definió como una reducción superior a un 50 % pero inferior a un 100 % en el volumen del tumor, en comparación con el volumen del tumor de partida, observado para tres medidas consecutivas. Una respuesta completa (CR) se definió como una reducción de un 100 % en el volumen del tumor, en comparación con el volumen del tumor inicial, observado para tres medidas consecutivas. Los datos se analizaron y los valores de p se determinaron usando el ensayo de t de Dunnett con el software estadístico de JMP, versión 5.1.2 (SAS Institute; Cary, NC). Los volúmenes del tumor individuales al final del estudio y el volumen tumoral medio ± ETM se calcularon usando el software estadístico de JMP, versión 5.1.2. Se hicieron gráficos de los datos del peso corporal basándose en el porcentaje de cambio medio a partir de los pesos corporales iniciales ± ETM.

Formulación de T-DM1

T-DM1 se puede proporcionar como una formulación liofilizada de un solo uso en un vial de vidrio de 20 ml de Tipo I USP/Farmacopea Europea provisto con un tapón laminado con fluoro resina de 20 mm y sello de aluminio con una tapa de plástico que se saca con el dedo de color gris oscuro. Después de reconstitución con 8,0 ml de Agua Estéril para Inyección (SWFI), el producto resultante contiene 20 mg/ml de T-DM1 en succinato sódico 10 mM, pH 5,0, sacarosa al 6 % (p/v), y polisorbato 20 al 0,02 % (p/v). Cada vial de 20 ml contiene aproximadamente 172 mg de T-DM1 para permitir la administración de 160 mg de T-DM1. El volumen indicado de solución de T-DM1 se retira del vial o viales y se añade a la bolsa IV. El T-DM1 reconstituido se diluye en PVC o en bolsas de poliolefina libre de látex libre de PVC (PO) que contienen Inyección de Cloruro Sódico de un 0,45 % o de un 0,9 % (volumen mínimo de 250 ml). Es preferente el uso de las bolsas de PVC o PO que contienen Cloruro Sódico al 0,45 %. En los casos en los que se usan bolsas de PVC o PO que contienen Cloruro Sódico al 0,9 %, se recomienda el uso de filtros en línea

de 0,22 µm. La bolsa se invierte suavemente para mezclar la solución. La solución de T-DM1 la infusión diluida en bolsas de cloruro de polivinilo (PVC) o de poliolefina (PO) libre de PVC y libre de látex que contienen Inyección de Cloruro Sódico de un 0,9 % o de un 0,45 %, USP, se pueden almacenar a 2 °C-8 °C (36 °F-46 °F) durante un breve periodo de tiempo.

5

Ejemplo 4 Estudio clínico de trastuzumab-MCC-DM 1 (T-DM1) en combinación con GDC-0941

Se diseñó un estudio de etiqueta abierta, en fase Ib de la combinación de T-DM1 administrada por vía intravenosa y GDC-0941 administrado por vía oral a pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2 que han evolucionado en la terapia anterior basada en trastuzumab para caracterizar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, y actividad de la combinación. Los objetivos primarios de este estudio son: evaluar la seguridad y tolerabilidad de GDC-0941 administrado con T-DM1; estimar la MTD de GDC-0941 cuando se administra con T-DM1; identificar una dosis recomendada en Fase II para GDC-0941 administrado en combinación con T-DM1; y caracterizar cualquier actividad anti tumoral observada de GDC-0941 cuando se administra en combinación con T-DM1. Los objetivos farmacocinéticos son: caracterizar la farmacocinética de GDC-0941 en ausencia y presencia de T-DM1; y caracterizar la farmacocinética de T-DM1 en ausencia y presencia relativa de GDC-0941.

10

15

Formulación de GDC-0941

GDC-0941 es un polvo seco destinado a administración PO. El producto farmacológico formulado se proporcionará en cápsulas de gelatina dura de dos dosis (15 y 50 mg) que es en cápsula con cubiertas de tamaño 0 y se diferencian por el color. Los excipientes incluidos en las formulaciones de la cápsula son celulosa microcristalina NF/EP, lauril sulfato sódico NF/DP (solamente en la dosis de 50 mg), ácido cítrico anhidro USP/EP, croscarmelosa sódica NF/EP, dióxido de silicio coloidal NF/EP, y estearato de magnesio (no bovino) NF/EP. Las cápsulas de GDC-0941 se deberían almacenar a temperatura refrigerada entre 36 °F y 46 °F (2 °C y 8 °C). Se proporcionarán instrucciones a los pacientes para almacenar el fármaco del estudio a temperatura refrigerada entre 36 °F y 46 °F (2 °C y 8 °C).

20

25

Medidas de Resultados

30

Se determinarán y se evaluarán medidas de los resultados para seguridad, farmacocinética, farmacodinámica, y eficacia, incluyendo Métodos Estadísticos, tal como en el Ejemplo 4.

Tratamiento del Estudio

35

Los tratamientos del estudio se administrarán en ciclos de 3 semanas. Los pacientes que reciben un beneficio clínico del tratamiento del estudio pueden tener la posibilidad de tratamiento para más ciclos que se pueden producir en un estudio separado, dependiendo del estado de desarrollo, disponibilidad del fármaco, y otros factores.

40

45

En la fase de aumento de dosis del estudio, los pacientes inscritos recibirán una sola dosis de GDC-0941 en el Día 1 del Ciclo 1 con el estómago vacío, para permitir una recogida de muestras PK de GDC-0941 antes y después de la dosis y para observar la variabilidad intrapaciente. La dosis de partida de GDC-0941 será de 60 mg qd, que es una dosis que se ha determinado que es segura como un solo agente sin ninguna toxicidad limitante de la dosis en un estudio en fase I. En el Día 2 del Ciclo 1, se administrará una dosis completa de T-DM1 a 3,6 mg/kg IV durante 90 minutos sin una dosis de carga. Esto irá seguido de una dosis de GDC-0941. Los pacientes se controlarán durante 90 minutos después de la primera infusión de T-DM1. A continuación se administrará GDC-0941 una vez al día, para un total de 14 dosis seguido de 1 semana de reposo para el primer ciclo.

50

55

El aumento de la dosis de GDC-0941 en pacientes posteriores continuará hasta evolución o intolerancia. Los ciclos de tratamiento del estudio posterior serán durante un periodo de 3 semanas, con 3,6 mg/kg de T-DM1 IV administrados durante 30 minutos primero en el Día 1 de cada ciclo y GDC-0941 administrado después de la infusión de T-DM1, y continuando durante un total de 2 semanas con el mismo y 1 semana de descanso. La dosificación continuará hasta evolución o intolerancia. T-DM1 se administrará como una infusión IV de 30 a 90 minutos (± 10), dependiendo de cómo se tolere T-DM1 en el estudio precursor. Si la infusión de 90 minutos se tolera bien, se administrarán fusiones posteriores durante 30 (± 10) minutos.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de cáncer que expresa ErbB2, en donde el método comprende la administración de una combinación terapéutica como una formulación combinada o de forma alterna a un mamífero, en donde la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre GDC-0941 y GNE-390.
2. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 1, en la que el agente quimioterapéutico es GNE-390.
3. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 1, en la que el agente quimioterapéutico es GDC-0941.
4. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad terapéuticamente eficaz de del agente quimioterapéutico se administran como una formulación combinada.
5. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico se administran de forma alternante.
6. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 5, en donde al mamífero se le administra el agente quimioterapéutico y a continuación se le administra trastuzumab-MCC-DM1.
7. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la combinación terapéutica se administra en intervalos de tres semanas a un ser humano con el trastorno hiperproliferativo.
8. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el trastuzumab-MCC-DM1 se administra a intervalos de una semana a tres semanas a un ser humano con el trastorno hiperproliferativo.
9. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastuzumab-MCC-DM1 se administra por vía intravenosa con una frecuencia no superior a cada 3 semanas a una dosis de 2,4, 3,0 o 3,6 mg/kg.
10. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad de trastuzumab-MCC-DM y la cantidad de agente quimioterapéutico son cada una de 1 mg a 1000 mg y la cantidad de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad de agente quimioterapéutico están en una proporción de 1:10 a 10:1 en peso.
11. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el mamífero es un paciente positivo para HER2.
12. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente positivo para HER2 ha recibido terapia con trastuzumab o lapatinib.
13. Una composición farmacéutica que comprende trastuzumab-MCC-DM1, un agente quimioterapéutico seleccionado entre GDC-0941 y GNE-390; y uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 que comprende una sustancia de deslizamiento farmacéuticamente aceptable seleccionada entre dióxido de silicio, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, estearatos metálicos, aluminosilicato sódico, benzoato sódico, carbonato cálcico, silicato cálcico, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco libre de asbestos, Stearowet C, almidón, almidón 1500, lauril sulfato de magnesio, óxido de magnesio y combinaciones de los mismos.
15. Uso de una combinación terapéutica en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama que expresa ErbB2, en donde la combinación terapéutica se administra a un mamífero como una formulación combinada o de forma alterna, y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico seleccionado entre GDC-0941 y GNE-390.

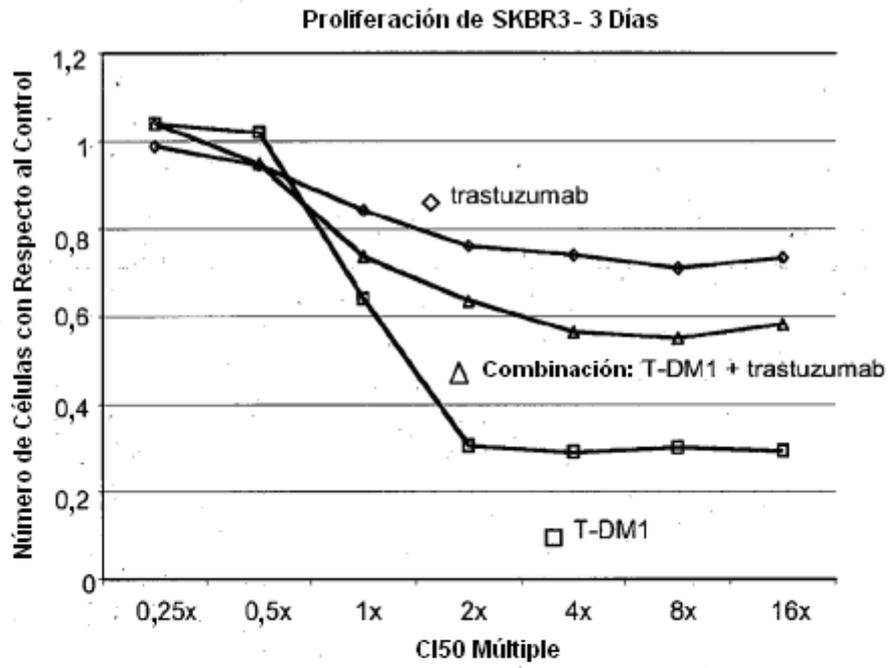


Figura 1

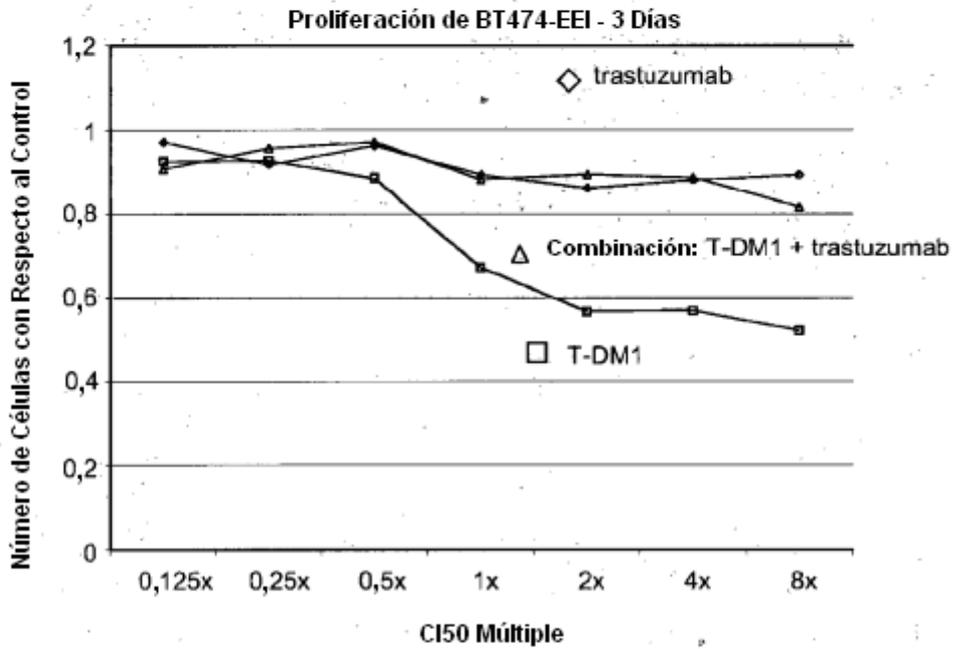


Figura 2

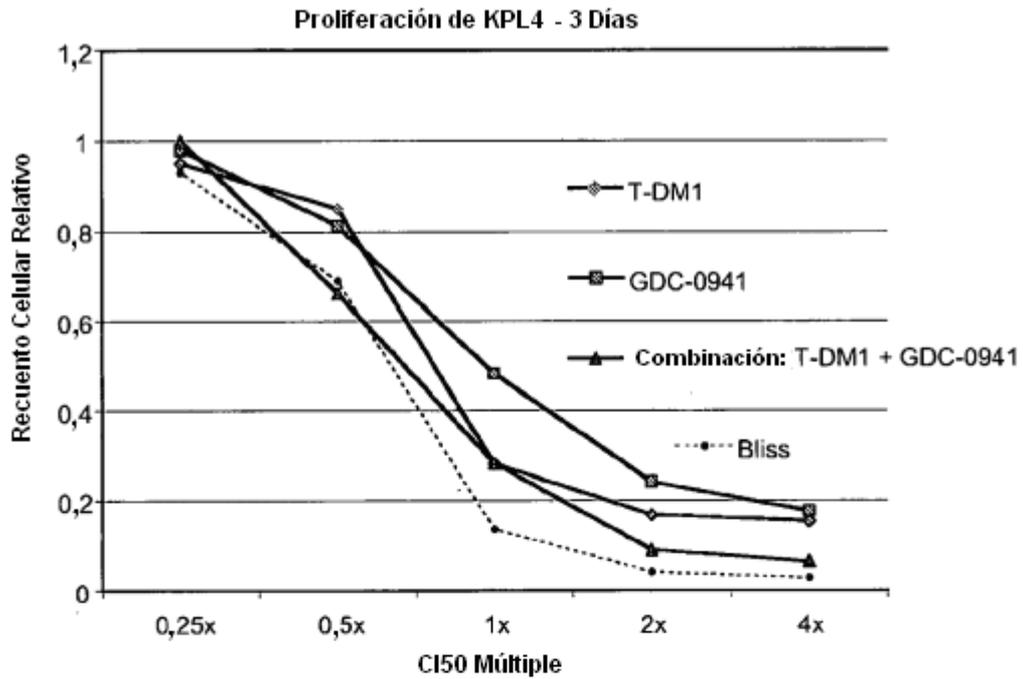


Figura 3

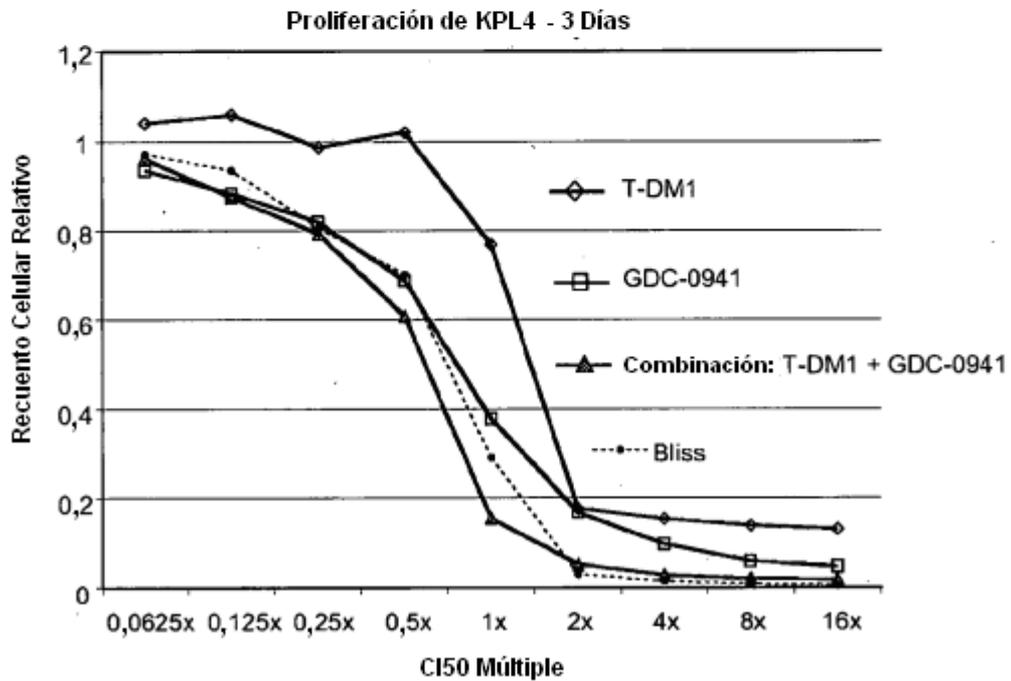


Figura 4

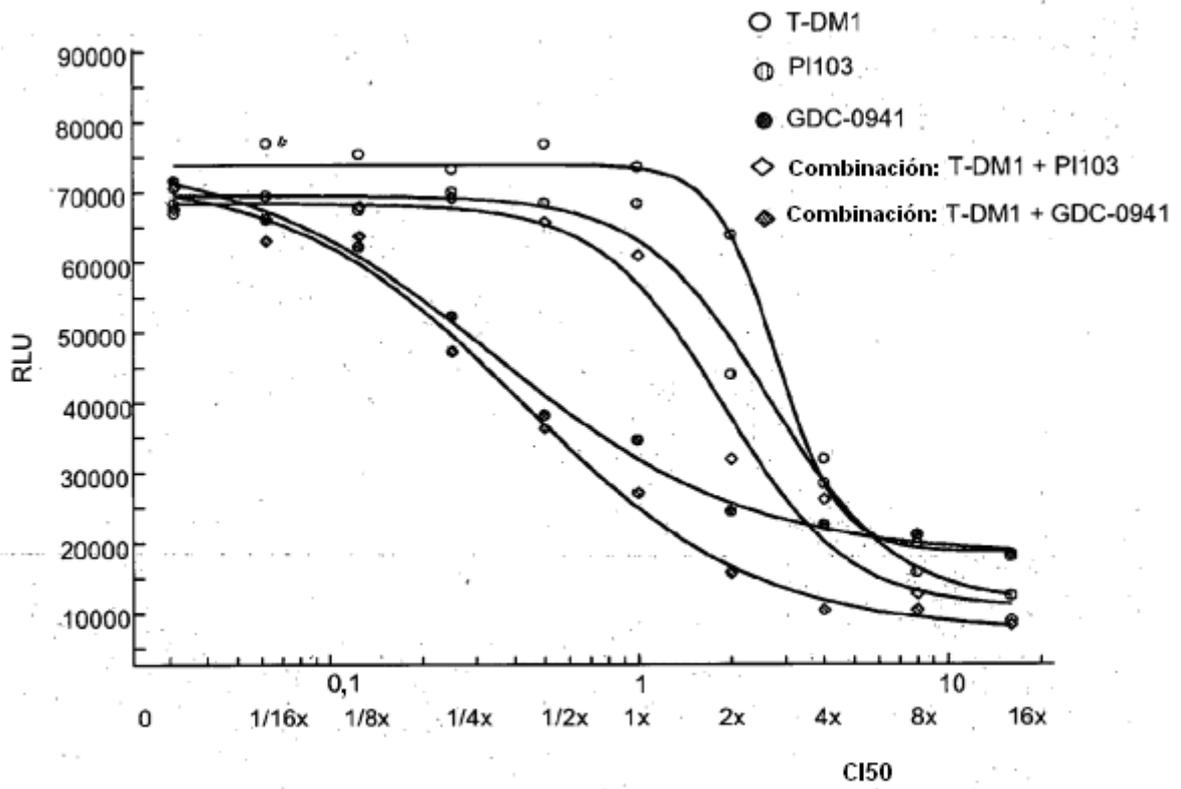


Figura 5

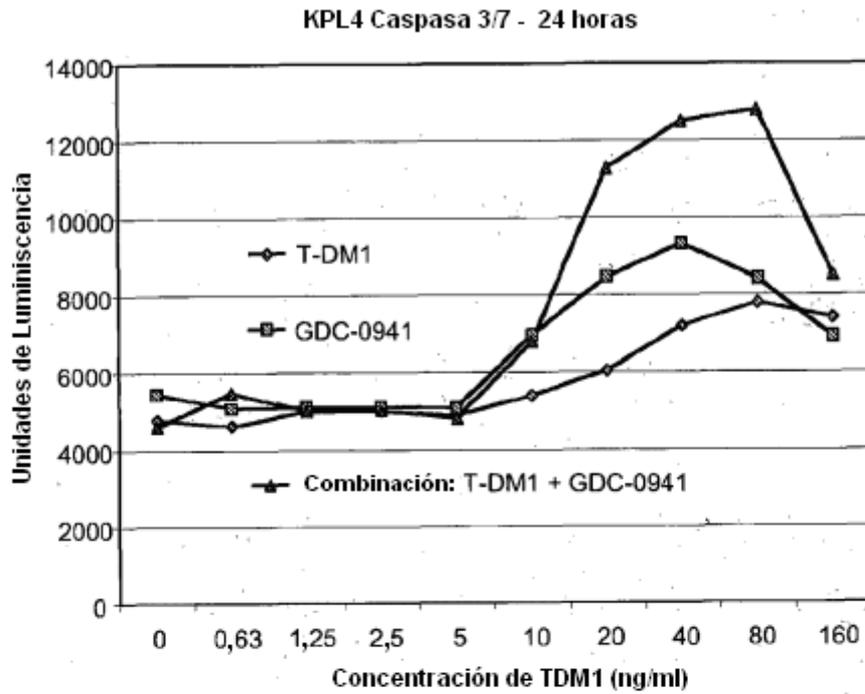


Figura 6

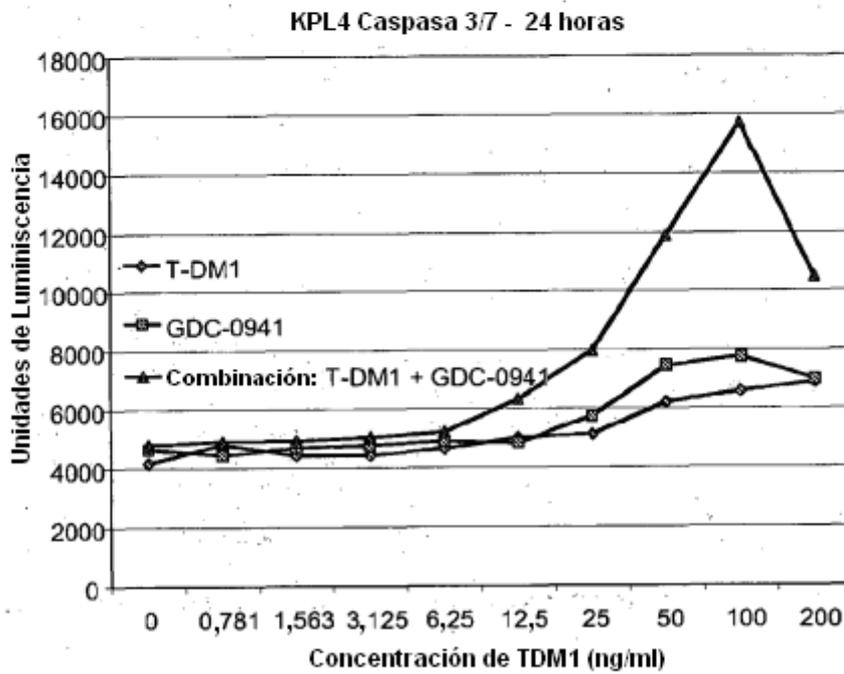


Figura 7

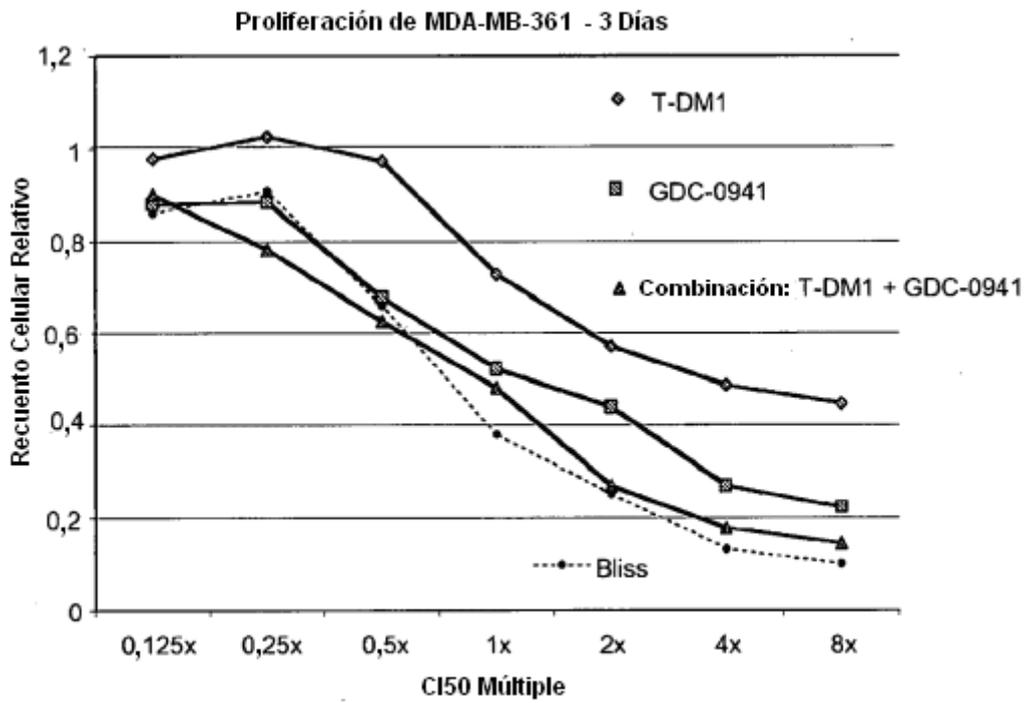


Figura 8

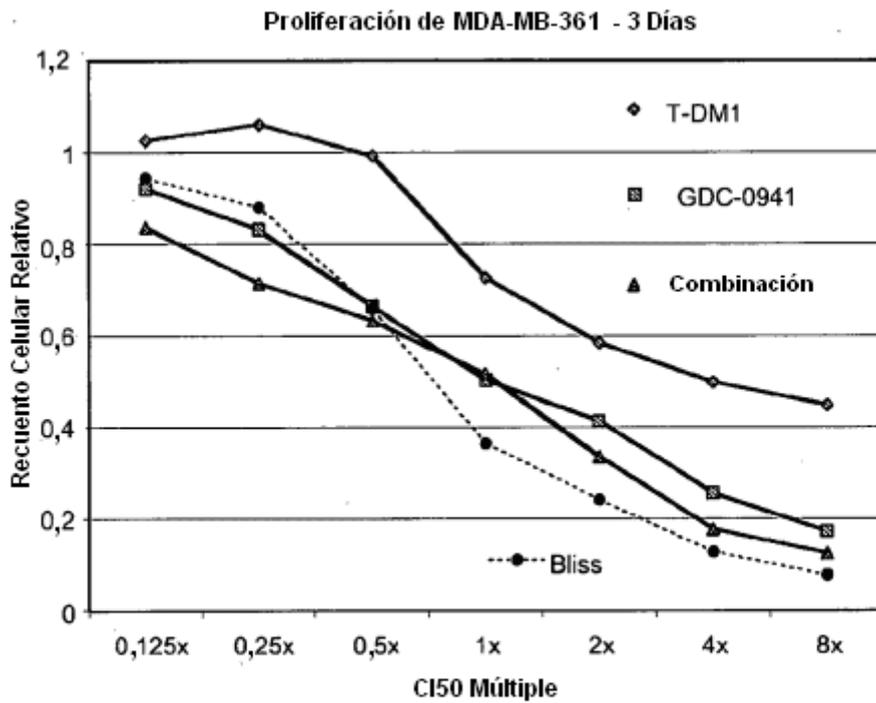


Figura 9

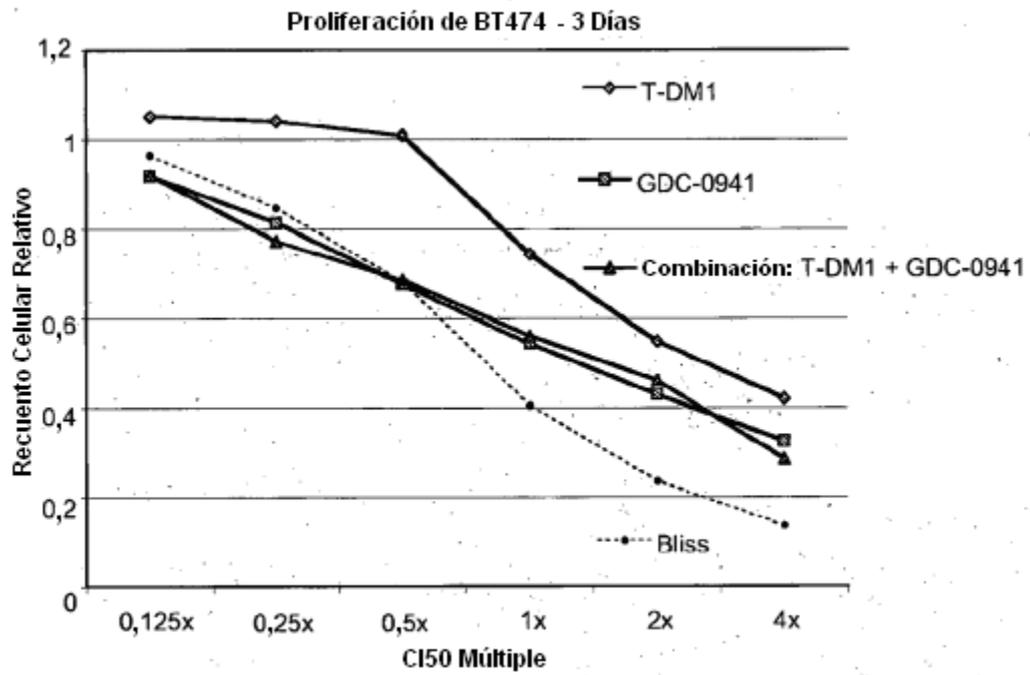


Figura 10

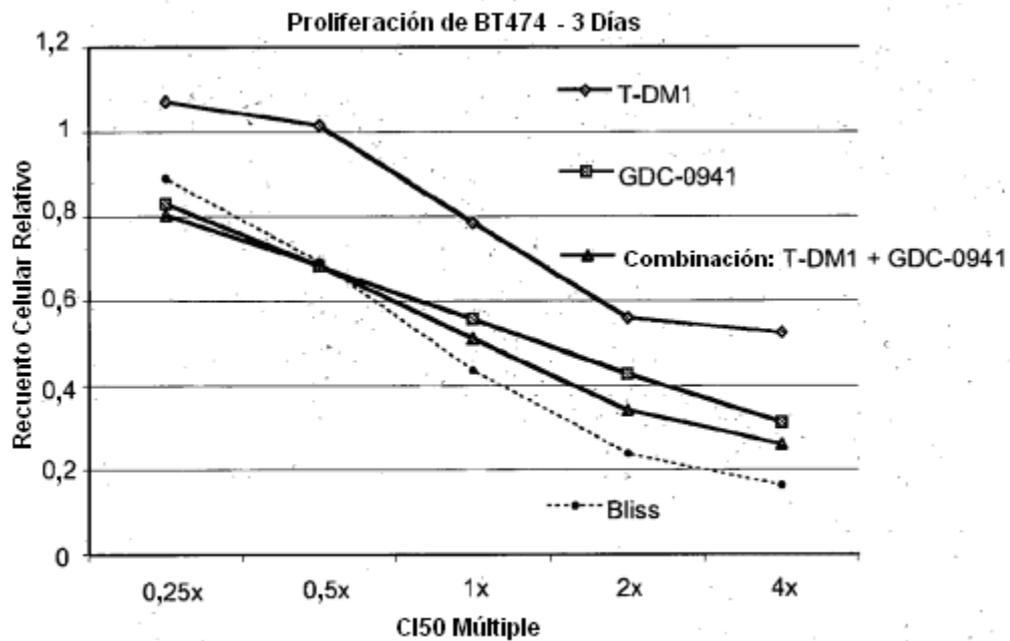


Figura 11

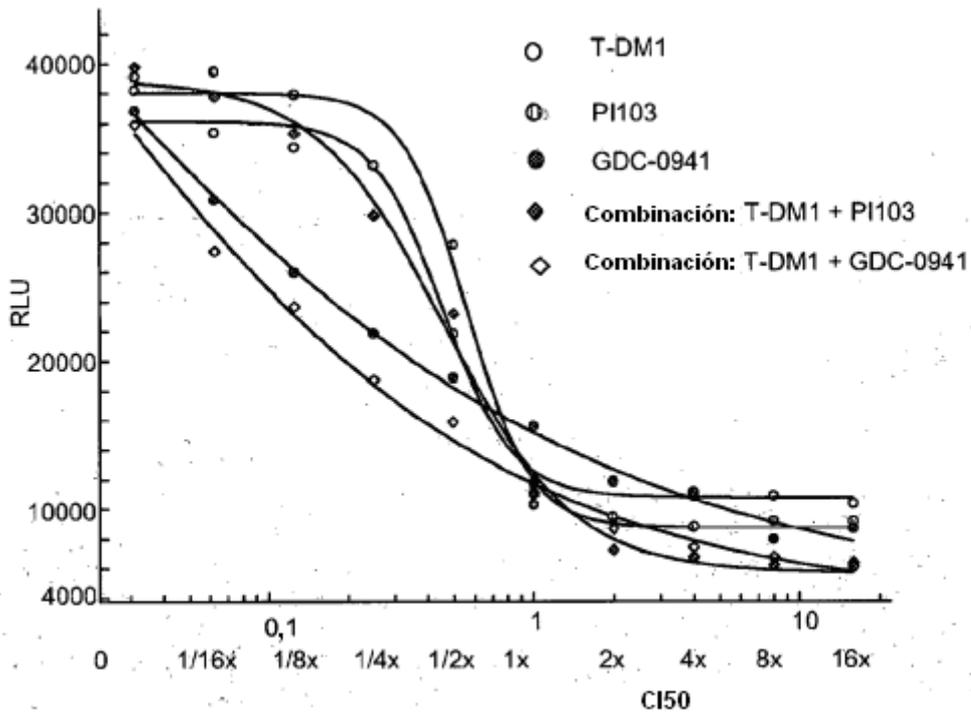


Figura 12

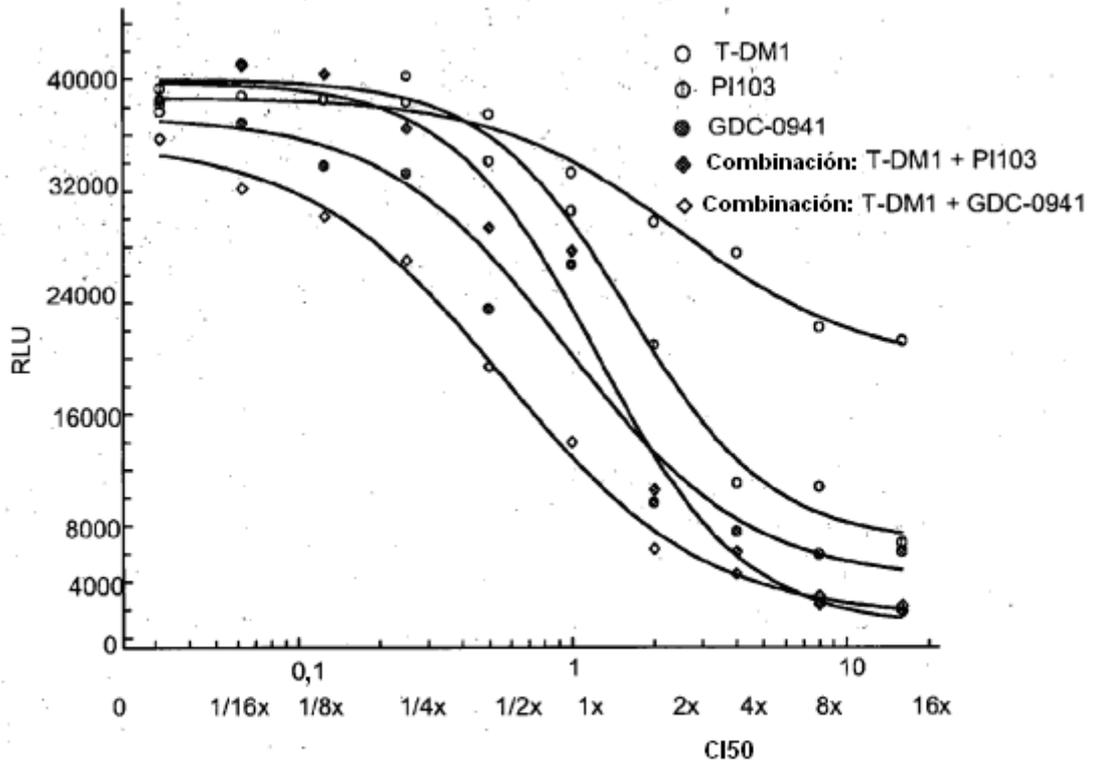


Figura 13

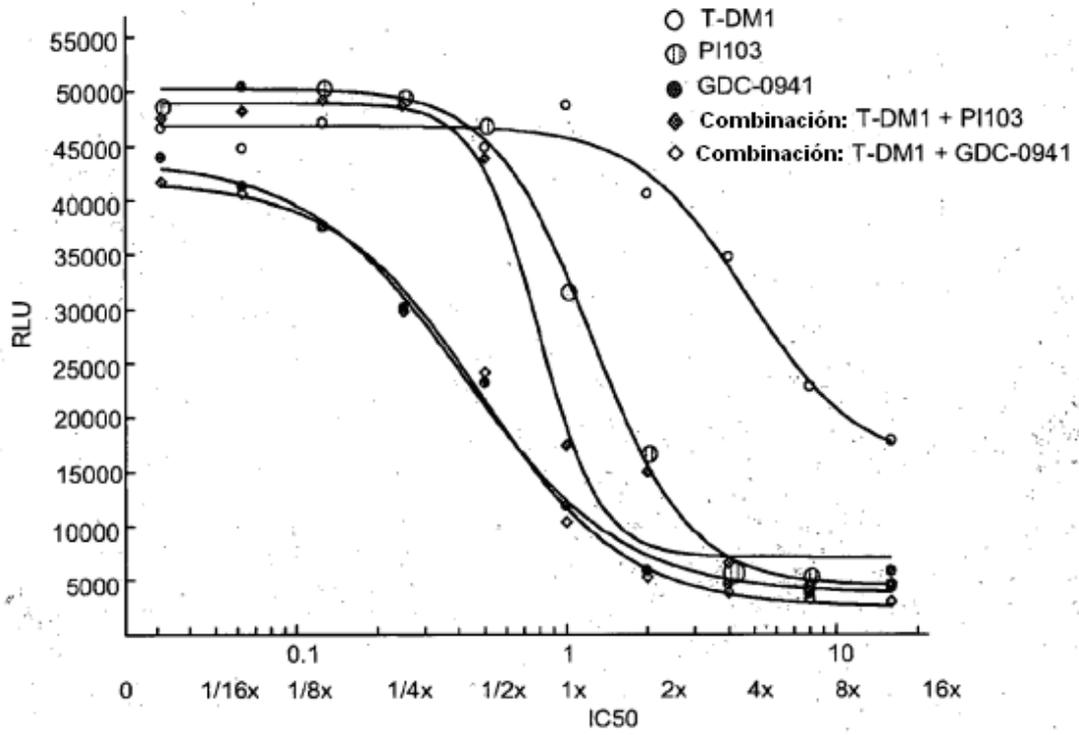


Figura 14

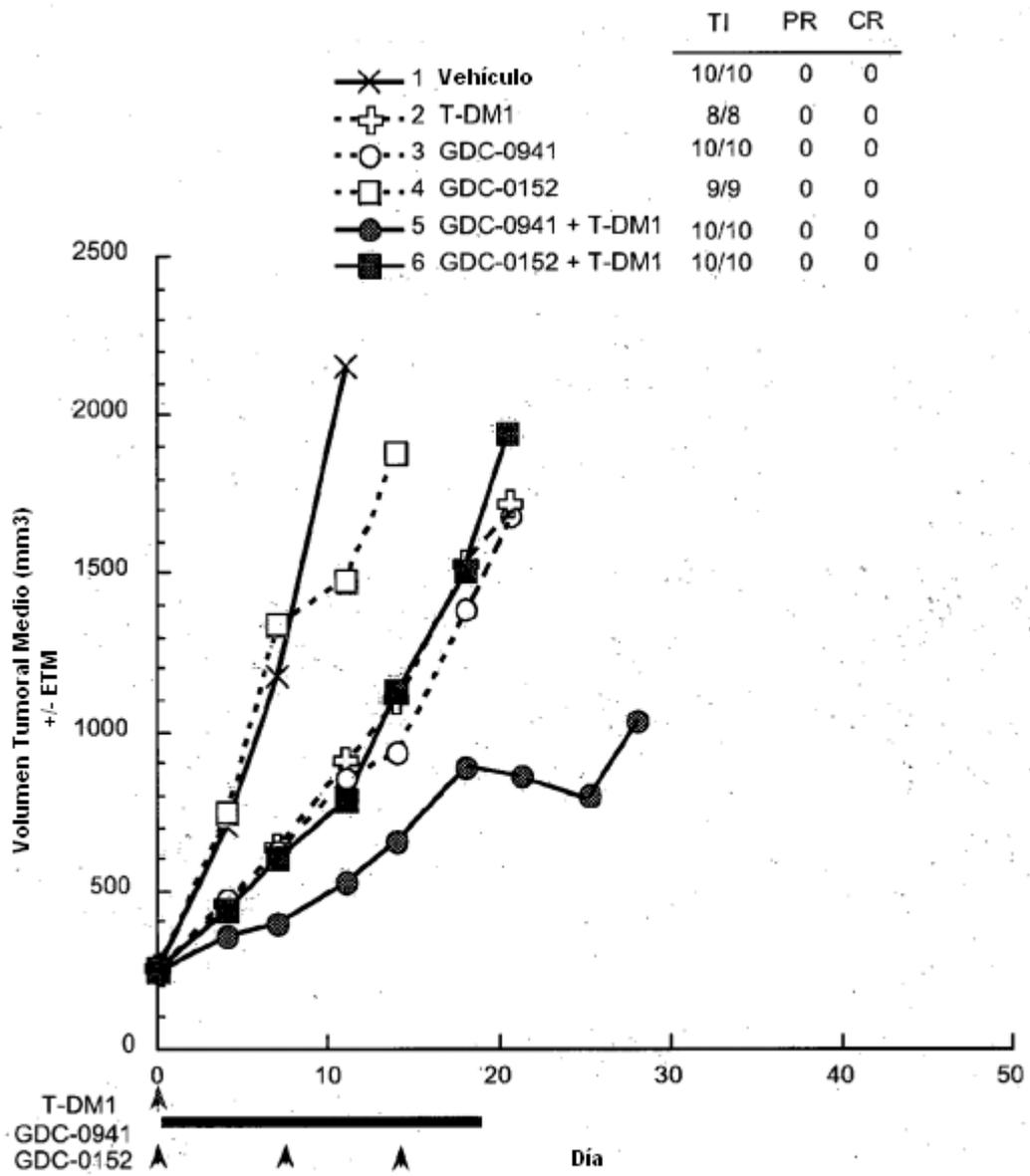


Figura 15

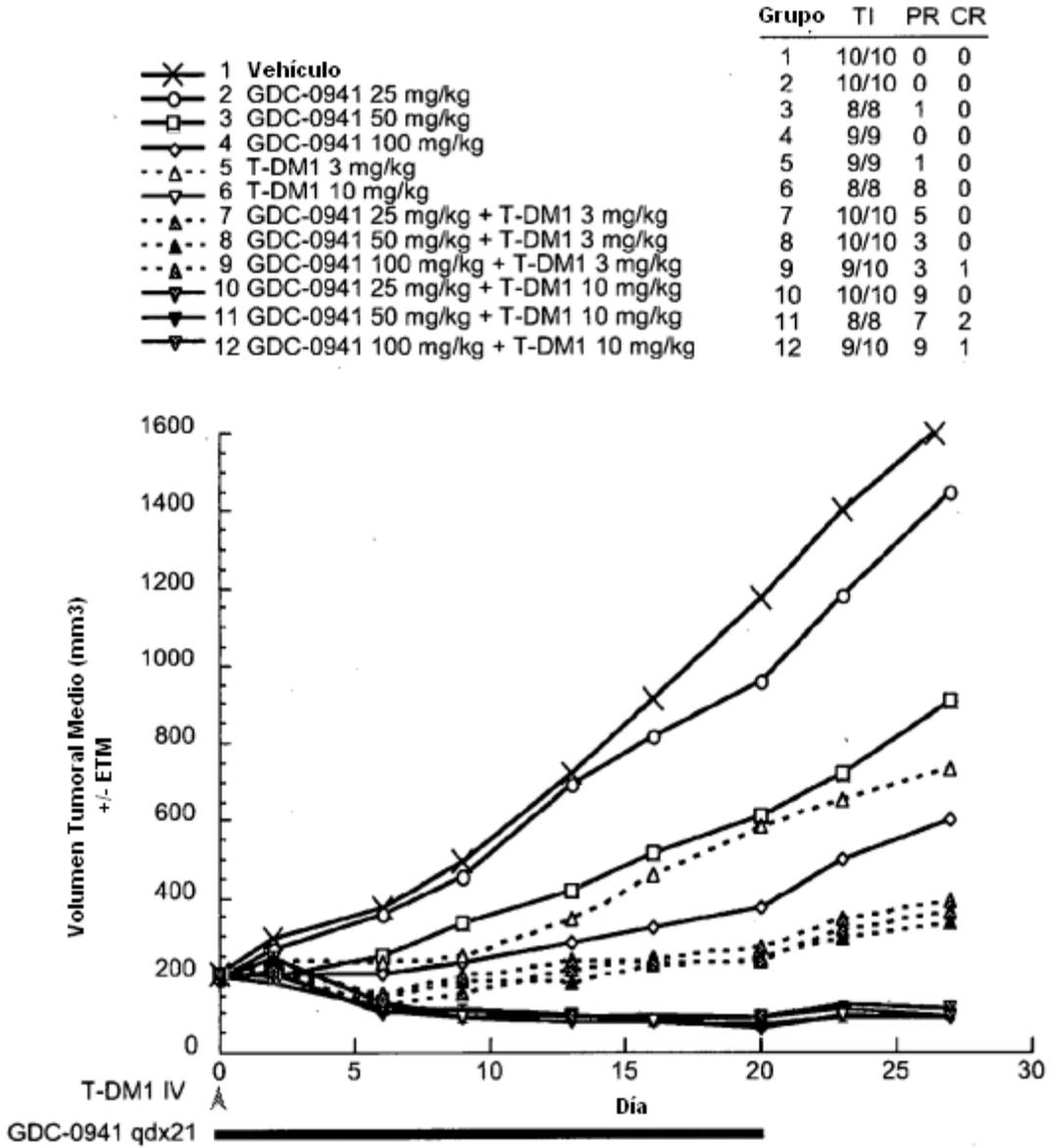


Figura 16

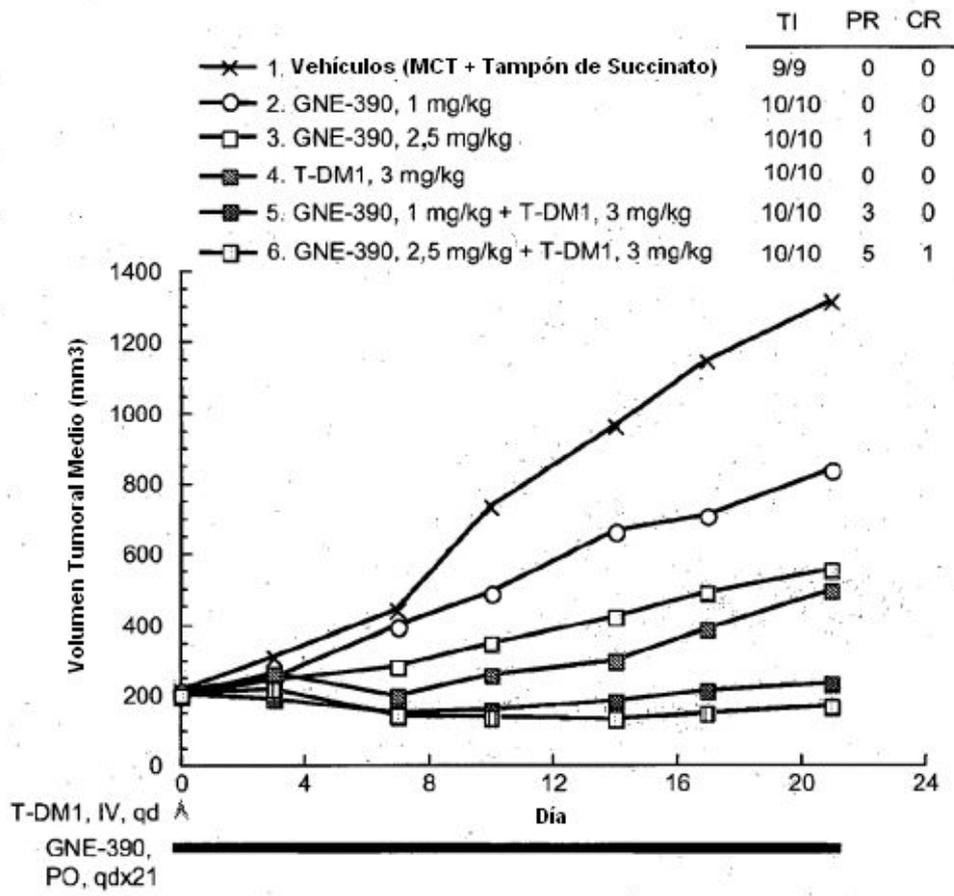


Figura 17