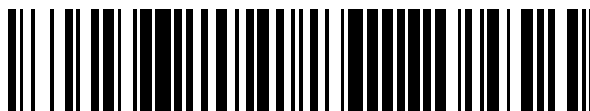


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 067**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 47/50** (2007.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 13158391 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2644204**

54 Título: **Combinaciones de un conjugado de anticuerpo anti-HER2-fármaco y pertuzumab**

30 Prioridad:

**18.03.2008 US 37410 P**

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

**07.08.2017**

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**

ES 2 629 067 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 anti-HER2-fármaco y pertuzumab

## 5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud no provisional presentada según 37 CFR § 1.53 (b), reivindica el beneficio según 35 USC §119 (e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º de Serie 61/037.410 presentada el 18 de marzo de 2008.

## 10 Campo de la invención

La invención se refiere por lo general a combinaciones farmacéuticas de compuestos con actividad frente al cáncer que expresan ErbB2.

## 15 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).

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.º 5677171; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5821337; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6054297; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6165464; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6339142; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6407213; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6639055; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6719971; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6800738; documento de Patente de Estados Unidos N.º 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).

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®.

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 antimitótico 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 maitansinoide unido al anticuerpo de cáncer de mama murino anti-HER2, TA.1, a través del conector de MCC, era 5 200 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 10 cuya enfermedad es resistente a las terapias dirigidas a HER2 (Beeram *et al.*, (2007) "A phase I study of trastuzumab-MCC-DM1 (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, Póster 2118, 23-27 de septiembre de 2007, Barcelona; documento de Patente de Estados Unidos N.º 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993).

15 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 20 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).

30 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.

35 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 40 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

45 La invención se refiere en general al conjugado de anticuerpo anti-HER2-fármaco, trastuzumab-MCC-DM1, administrado en combinación con pertuzumab para inhibir el crecimiento de células cancerígenas reprimiendo ErbB2. La combinación de trastuzumab-MCC-DM1 y pertuzumab muestra efectos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. Las combinaciones de la invención pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer que expresa ErbB2. Las combinaciones pueden inhibir el crecimiento tumoral en mamíferos y 50 pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer.

En un aspecto, la invención incluye una combinación terapéutica como una formulación combinada o de forma alternante a un mamífero, en la que la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab para su uso en un método para el 55 tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2.

La cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab pueden administrarse como una formulación combinada o de forma alterna.

60 La invención también se refiere a una combinación como se define en las reivindicaciones, en la que la administración de la combinación terapéutica da como resultado un efecto sinérgico.

Otro aspecto de la invención son composiciones farmacéuticas que comprenden trastuzumab-MCC-DM1, pertuzumab y uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes o excipientes farmacéuticamente 65 aceptables.

Otro aspecto de la invención proporciona combinaciones para el tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2, que comprende administrar a un mamífero que necesite tal tratamiento cantidades eficaces de trastuzumab-MCC-DM1 y pertuzumab. Trastuzumab-MCC-DM1 y pertuzumab pueden coformularse para la administración en una combinación como una formulación farmacéutica o pueden administrarse de forma separada de forma alterna (dosificaciones alternas, secuenciales) como una combinación terapéutica.

La presente divulgación también proporciona métodos para predecir combinaciones eficaces de fármacos para la eficacia *in vivo*, en donde las combinaciones incluyen trastuzumab-MCC-DM1 y un agente quimioterapéutico antineoplásico de referencia. Los datos de eficacia procedentes de la proliferación celular *in vitro* y los experimentos de xenoinjerto de tumor *in vivo* se analizan de forma cualitativa y de forma cuantitativa. Los métodos de análisis cuantitativos pueden basarse en el efecto mediana de Chou y Talalay e isobogramas, que generan un valor de índice de combinación (IC) para indicar sinergia, antagonismo o actividad, o en la desviación del gráfico de cintas de Independencia de Bliss.

Otro aspecto de la invención es una combinación terapéutica de la invención para su uso para tratar una enfermedad o afección tal como el cáncer, que incluyendo una modulada por HER2 en un mamífero.

Otro aspecto de la invención es el uso de una combinación terapéutica de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección tal como el cáncer, incluyendo una modulada por HER2 en un mamífero.

Otro aspecto de la invención incluye artículos de preparación o kits que comprenden trastuzumab-MCC-DM1, pertuzumab, un recipiente y de forma opcional un prospecto o etiqueta que indique un tratamiento.

Otro aspecto de la divulgación incluye un método para la determinación de compuestos a utilizar en combinación para el tratamiento del cáncer que comprende: a) administrar una combinación terapéutica de trastuzumab-MCC-DM1 y de un agente quimioterapéutico seleccionado de un anticuerpo inhibidor de la dimerización de HER2, un anticuerpo anti-VEGF, 5-FU, carboplatino, lapatinib, ABT-869, docetaxel, GDC-0941 y GNE-390, a una línea celular tumoral *in vitro* y b) medir un efecto sinérgico o no sinérgico.

### 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 CI50 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 EEI *in vitro* a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI50 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 de MDA-MB-175 *in vitro* a los 5 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de pertuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y la combinación de pertuzumab y T-DM1.

La Figura 3a muestra una representación de la viabilidad celular de MDA-MB-175 *in vitro* a los 5 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de pertuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y la combinación de pertuzumab y T-DM1.

La Figura 4 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 *in vitro* a los 5 días frente a diversas dosis fijas de pertuzumab, en combinación con la respuesta a la dosis de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y diversas dosis de T-DM1 solo.

La Figura 5 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 *in vitro* a los 5 días frente a diversas dosis fijas de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), en combinación con la respuesta a la dosis de pertuzumab y diversas dosis de pertuzumab solo.

La Figura 6 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 *in vitro* a los 5 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de pertuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y la combinación de pertuzumab y T-DM1.

La Figura 7 muestra una representación de la viabilidad celular de SK-BR-3 *in vitro* a los 3 días frente a dosis variables de T-DM1 en combinación con dosis fijas de lapatinib (4,5 nM, 14 nM, 41 nM, 123 nM) y dosis variables de T-DM1 solo (0-1000 ng/ml).

La Figura 7a muestra una representación de la viabilidad celular de SK-BR-3 *in vitro* a los 3 días frente a T-DM1, lapatinib y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y lapatinib.

La Figura 8a muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 *in vitro* a los 3 días frente a T-DM1, lapatinib y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y lapatinib.

La Figura 8 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 *in vitro* a los 3 días frente a dosis variables de T-DM1 en combinación con dosis fijas de lapatinib (1,5 nM, 4,5 nM, 14 nM, 41 nM, 123 nM) y dosis variables de T-DM1 solo (0-1000 ng/ml).

La Figura 9 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474-EEI *in vitro* a los 3 días frente a dosis variables de T-DM1 en combinación con dosis fijas de lapatinib (14 nM, 41 nM, 123 nM, 370 nM, 1111 nM) y dosis variables de T-DM1 solo (0-1000 ng/ml).

La Figura 10 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores KPL-4 inoculados en la almohadilla de grasa mamaria de ratones beige SCID (3 millones de células en matrigel por ratón) después de la dosificación con: (1) tampón ADC, (2) pertuzumab 15 mg/kg, (3) T-DM1 0,3 mg/kg, (4) T-DM1 1 mg/kg, (5) T-DM1 3 mg/kg, (6) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 0,3 mg, (7) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 1 mg/kg, (8) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg. El tampón ADC y T-DM1 se dosificaron una vez en el día 0. Pertuzumab se dosificó en los días 0, 7 y 14.

La Figura 11 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores KPL-4 inoculados en la almohadilla de grasa mamaria de ratones beige SCID (3 millones de células en matrigel por ratón) después de la dosificación con: (1) tampón ADC, (2) 5-FU 100 mg/kg, (3) pertuzumab 40 mg/kg, la primera dosis de pertuzumab (grupos 5, 7 y 9) fue una dosis de carga 2x, (4) B20-4.1, 5 mg/kg, (5) T-DM1, 5 mg/kg, (6) 5-FU, 100 mg/kg + T-DM1, 5 mg, (7) pertuzumab 40 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, (8) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, (9) B20-4.1, 5 mg/kg + pertuzumab, 40 mg/kg. El tampón ADC y T-DM1 se dosificaron una vez en el día 0 mediante una única inyección iv. Pertuzumab se dosificó en los días 0, 7, 14, 21 (qwk x 4. 5-FU se dosificó en los días 0, 7 y 14 (qwk x3). B20-4.1 se dosificó en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24 (2X/sem. x8 en total).

La Figura 12 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores de mama transgénicos de MMTV-Her2 Fo5 inoculados en la almohadilla de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón ADC), (2) B20-4.1, 5 mg/kg, (3) T-DM1, 3 mg/kg, (4) T-DM1, 5 mg/kg, (5) T-DM1, 10 mg/kg, (6) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg, (7) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1 5 mg/kg, (8) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1, 10 mg/kg. El tampón ADC y T-DM1 se dosificaron en el día 0 y 21. B20-4.1 se dosificó en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24 (2X/sem. x4 para un total de 8).

La Figura 13 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores de mama transgénicos de MMTV-Her2 Fo5 inoculados en la almohadilla de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón ADC), (2) T-DM1 10 mg/kg, (3) 5-FU 100 mg/kg, (4) gemcitabina 120 mg/kg, (5) carboplatino 100 mg/kg, (6) 5-FU 100 mg/kg + T-DM1 10 mg/kg, (7) gemcitabina 120 mg/kg + T-DM1 10 mg/kg (8) carboplatino 100 mg/kg + T-DM1 10 mg/kg. El tampón ADC, T-DM1 y el carboplatino se dosificaron en el día 0; inyección única. 5-FU se dosificó en el día 0, 7 y 14 (qwk x3). La gemcitabina se dosificó en los días 0, 3, 6 y 9 (q3d x4).

La Figura 14 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores de mama transgénicos de MMTV-Her2 Fo5 inoculados en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan dosificados con: (1) vehículo (tampón PBS) iv, qwk x4, (2) lapatinib 101 mg/kg, po, bid x21, (3) pertuzumab 40 mg/kg, iv, qwk x4, (4) B20-4.1 5 mg/kg, ip, 2x/sem. x4, (5) T-DM1 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final, (6) lapatinib 101 mg/kg, po, bid x21 + T-DM1 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final, (7) pertuzumab 40 mg/kg, iv, qwk x4 + T-DM1 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final, (8) B20-4.1 5 mg/kg, ip, 2x/semana x4 + T-DM1 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final.

La Figura 15 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor de mama transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón PBS), po, bid x21, (2) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, qd x1 (3) T-DM1, 15 mg/kg, iv, qd x1 (4) ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (5) ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (6) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (7) T-DM1 7,5 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 15 mg/kg, po, bid x21 (8) T-DM1, 15 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (9) T-DM1, 15 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 15 mg/kg, po, bid x21.

La Figura 16 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor de mama transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo, iv, qwk x3 (2) T-DM1, 7 mg/kg, iv, q3wk x2 (3) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 (4) docetaxel, 30 mg/kg, iv, qwk x3 (5) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2 + docetaxel, 30 mg/kg, iv, qwk x3 (6) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 + docetaxel 30 mg/kg, iv, qwk x3.

La Figura 17 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor de mama transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2, (3) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 (4) lapatinib, 100 mg/kg, po, bid x21, (5) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2 + lapatinib, 100 mg/kg, po, bid x21, (6) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 + lapatinib, 100 mg/kg, po, bid x21.

La Figura 18 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de 5-FU, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de 5-FU y T-DM1.

La Figura 19 muestra una representación de la viabilidad celular de BT-474 *in vitro* a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de 5-FU, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de 5-FU y T-DM1.

La Figura 20 muestra una representación de la viabilidad celular de SK-BR-3 *in vitro* a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de gemcitabina, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de gemcitabina y T-DM1.

La Figura 21 muestra una representación de la viabilidad celular de MDA-MD-361 *in vitro* a los 3 días frente a concentraciones múltiples de CI50 de gemcitabina, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de gemcitabina y T-DM1.

La Figura 22 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  $\mu$ 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 23 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  $\mu$ 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 24 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 25 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 26 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 27 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  $\mu$ M) a concentraciones múltiples de  $CI_{50}$  de 0,125x la 8x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos.

La Figura 28 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  $\mu$ 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 29 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  $\mu$ 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 30 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  $\mu$ 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 31 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  $CI_{50}$  de 0 a 16x.

La Figura 32 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 33 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 34 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor mamario transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (3) 5-FU, 100 mg/kg, po, qwk x2, (4) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk + 5-FU, 100 mg/kg, po, qwk x2.

La Figura 35 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mamá transgénico de 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 36 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 37 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.

### Descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo

5 A continuación se hará referencia en detalle a determinadas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían utilizarse en la práctica de la presente invención.

### 10 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.

15 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objetivo 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.

20 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).

40 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.

45 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.

55 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 antimitótica, 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.º 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS N.º 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS N.º 15663-27-1), carboplatino (CAS N.º 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.º 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, AstraZeneca), 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 (CAMPTOSAR®, CUT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas con ingeniería de albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schuamburg, 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, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida 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), aclacinomisininas, 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, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como dnopterina, 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, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; agentes reforzadores del ácido fólico tales como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; 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 aromatasas, 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 troxacetabina (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 lipídica; (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®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de la topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) 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), tositumomab (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, bivatuzumab 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, pecfusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, 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.

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 hidroxiaácido, 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).

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.

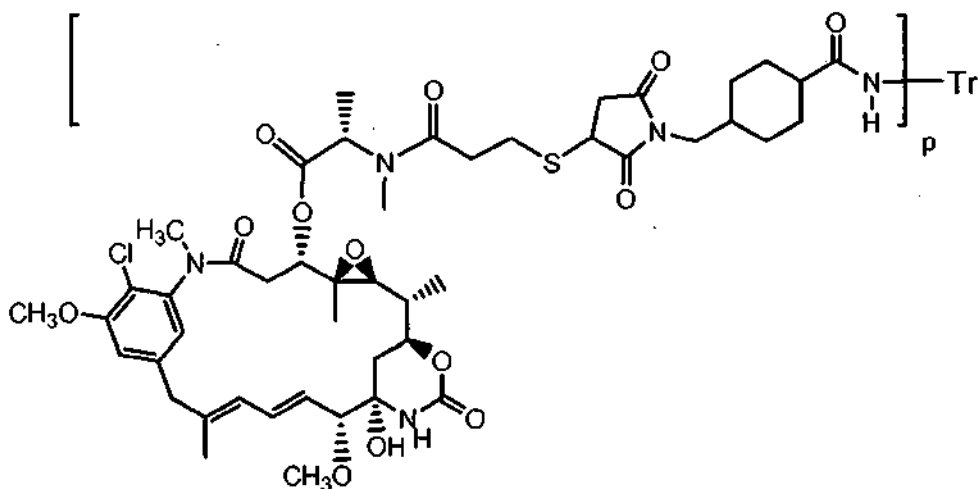
La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser químicamente y/o toxicológicamente compatible, con los otros ingredientes que comprenden una formulación, y/o el mamífero que se está tratando con los mismos.

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.

#### 50 TRASTUZUMAB-MCC-DM1

La presente invención incluye combinaciones terapéuticas que comprenden trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), un conjugado de anticuerpo-fármaco (N.º de Reg. CAS 139504-50-0), que tiene la estructura:



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.º 5208020; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6441163).

- 5 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.º 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 membrana 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.º 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  $\geq 2$  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

Determinados 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 incluyen un anticuerpo inhibidor de la dimerización de HER2, un anticuerpo anti-VEGF, 5-FU, carboplatino, lapatinib, ABT-869, docetaxel, GDC-0941 y GNE-390. Obsérvese que la materia objeto que no está abarcada en el ámbito de las reivindicaciones no forma parte de la invención ahora reivindicada.

45 Pertuzumab (N.º de Reg. CAS 380610-27-5, OMNITARG®, 2C4, Genentech) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que inhibe la dimerización de HER2 (documentos US 6054297; US 6407213; US 6800738; US 6627196; US 6949245; US 7041292). Pertuzumab y trastuzumab se dirigen a distintas regiones extracelulares del receptor tirosina quinasa HER-2 (Nahta *et al.* (2004) Cancer Res. 64: 2343-2346). La línea celular de hibridoma que expresa 2C4 (pertuzumab) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, sigla del inglés *American Type Culture Collection*), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209, EE.UU.

como ATCC HB-12697 el 8 de abril de 1999. Pertuzumab bloquea la capacidad del receptor HER2 para colaborar con otros miembros de la familia de receptores HER, es decir, HER1/EGFR, HER3 y HER4 (Agus *et al.* (2002) *Cancer Cell* 2: 127-37; Jackson *et al.* (2004) *Cancer Res* 64: 2601-9; Takai *et al.* (2005) *Cancer* 104: 2701-8; documento US 6949245). En células cancerígenas, la interferencia con la capacidad de HER2 para colaborar con otros receptores de la familia HER bloquea la señalización celular y puede, finalmente, conducir a la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas o a la muerte de las células cancerígenas. Los IHD, debido a su singular modo de acción, tienen el potencial de funcionar en una amplia diversidad de tumores, incluyendo los que no tienen expresión aumentada de HER2 (Mullen *et al.* (2007) *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 93-100).

Pertuzumab está basado en las secuencias armazón de IgG1 (K) de ser humano. Consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Al igual que trastuzumab, pertuzumab está dirigido frente al dominio extracelular de HER2. Sin embargo, difiere de trastuzumab en las regiones de unión al epítipo de la cadena ligera y la cadena pesada. Como resultado, pertuzumab se une a un epítipo dentro de lo que se conoce como subdominio 2 de HER2, mientras que el epítipo de trastuzumab se emplaza en el subdominio 4 (Cho *et al.*, 2003; Franklin *et al.*, 2004). Pertuzumab actúa bloqueando la asociación de HER2 con otros miembros de la familia HER, incluyendo HER1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGFR), HER3 y HER4. Esta asociación se necesita para la señalización en presencia de ligando a través de MAP-quinasa y PI3-quinasa. Como resultado, pertuzumab inhibe la señalización intracelular iniciada por ligando. La inhibición de estas rutas de señalización puede dar como resultado una detención del crecimiento y la apoptosis, respectivamente (Hanahan y Weinberg 2000). Debido a que pertuzumab y trastuzumab se unen a distintos epítopos en el receptor HER2, la señalización aguas abajo activada por ligando se bloquea mediante pertuzumab pero no mediante trastuzumab. Por lo tanto, pertuzumab puede no necesitar la expresión aumentada de HER2 para ejercer su actividad como un agente antitumoral. Además, debido a sus modos de acción complementarios, la combinación de pertuzumab y de T-DM1 puede tener un posible papel en las enfermedades con expresión aumentada de HER2.

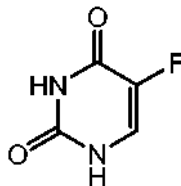
Pertuzumab se ha evaluado como único agente en cinco estudios de Fase II realizados en diversos tipos de cáncer, incluyendo CMM que expresa bajos niveles de HER2, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de próstata resistente a hormonas y cáncer de ovario. Un ensayo de Fase II evaluó pertuzumab como único agente en el tratamiento de segunda y tercera línea de pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) con expresión normal de HER2 (Cortes *et al.* (2005) *J. Clin Oncol* 23: 3068). Se ha evaluado a pertuzumab en dos estudios de Fase II en combinación con trastuzumab (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; Gelmon *et al.* (2008) *J. Clin. Oncol.* 26: 1026). En el primer estudio participaron 11 pacientes con CMM positivo para HER2 que habían recibido anteriormente hasta tres tratamientos previos que contenían trastuzumab (Portera *et al.*, 2007).

Bevacizumab (N.º de Reg. CAS 216974-75-3, AVASTIN®, Genentech) es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF frente al factor de crecimiento endotelial vascular (documentos US 7227004; US 6884879; US 7060269; US 7169901; US 7297334) utilizado en el tratamiento del cáncer, donde inhibe el crecimiento tumoral bloqueando la formación de nuevos vasos sanguíneos. Bevacizumab fue el primer inhibidor de la angiogénesis clínicamente disponible en los Estados Unidos, aprobado por la FDA en 2004 para su uso en combinación con quimioterapia convencional en el tratamiento del cáncer de colon metastásico y la mayoría de las formas del cáncer de pulmón no microcítico metastásico. Se están llevando a cabo varios estudios clínicos de última fase para determinar su seguridad y eficacia para pacientes con: cáncer de colon adyuvante/no metastásico, cáncer de mama metastásico, carcinoma de células renales metastásico, glioblastoma multiforme metastásico, cáncer de ovario metastásico, cáncer de próstata resistente a hormonas metastásico y cáncer de páncreas metastásico o no extirpable localmente avanzado.

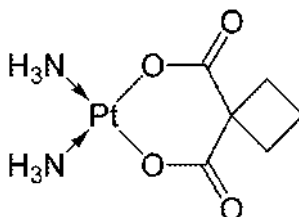
Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. Los anticuerpos anti-VEGF preferente incluyen un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599, que incluye, pero sin limitación, a bevacizumab. Bevacizumab incluye regiones marco conservadas de IgG1 de ser humano mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión al antígeno procedentes del anticuerpo monoclonal murino anti-hVEGF A.4.6.1, que bloquea la unión de VEGF humano a su receptor. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones marco conservadas, se obtienen de la IgG1 de ser humano y aproximadamente el 7 % de la secuencia se obtiene del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glucosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen adicionalmente en el documento US 6884879. Los anticuerpos anti-VEGF adicionales incluyen los anticuerpos de la serie G6 o B20 (por ejemplo, G6-31, B20-4.1), como se describe en una cualquiera de las Figuras 27-29 del documento WO2005/012359. En una realización, el anticuerpo de la serie B20 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104.

Las líneas celulares de hibridoma que expresan los anti-VEGF A 4.6.1 (ATCC HB 10709) y B 2.6.2 (ATCC HB 10710) se han depositado y mantenido en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 EE.UU.. El clon que expresa el polipéptido VEGF-E (documento US 6391311), que codifica el inserto de secuencia nucleotídica del depósito de la ATCC identificado como DNA29101-1276, se depositó el 5 de marzo de 1998 y se mantuvo como ATCC 209653 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU.

5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, n.º de Reg. CAS 51-21-8) es un inhibidor de la timidilato sintasa y se ha utilizado durante décadas en el tratamiento del cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal y de páncreas (documento US 2802005, documento US 2885396, Barton *et al.* (1972) Jour. Org. Chem. 37: 329, Hansen, RM (1991) Cancer Invest 9: 637-642). 5-FU se denomina como 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona, y tiene la estructura:

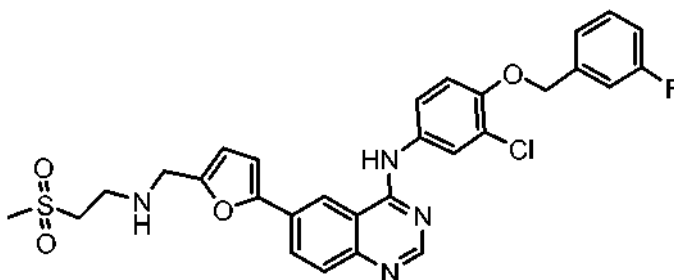


15 El carboplatino (n.º de Reg. CAS 41575-94-4) es un fármaco quimioterapéutico utilizado frente al carcinoma de ovario, los cánceres de pulmón y de cabeza y cuello (documento US 4140707). El carboplatino se denomina como azanida; ácido ciclobutano-1,1-dicarboxílico platino y tiene la estructura:

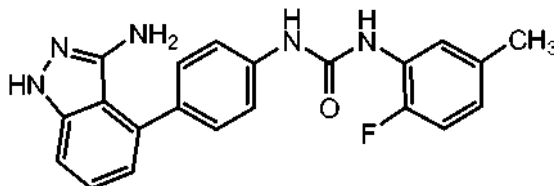


20 Lapatinib (n.º de Reg. CAS 388082-78-8, TYKERB®, GW572016, Glaxo SmithKline) se ha aprobado para su uso en combinación con capecitabina (XELODA®, Roche) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico cuyos tumores tienen expresión aumentada de HER2 (ErbB2) y que han recibido terapia previa que incluye una antraciclina, un taxano y trastuzumab. Lapatinib es un inhibidor doble de las tirosina quinasas factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER2/neu (ErbB-2) competitivo con ATP (documentos US 6727256; US 6713485; US 7109333; US 6933299; US 7084147; US 7157466; US 7141576), que inhibe la autofosforilación del receptor y la activación mediante la unión al bolsillo de unión a ATP del dominio proteína quinasa de EGFR/HER2. Lapatinib se denomina N-(3-cloro-4-(3-fluorobenciloxi)fenil)-6-(5-((2-(metilsulfonyl)etilamino)metil)furan-2-il)quinazolin-4-amina, y tiene la estructura:

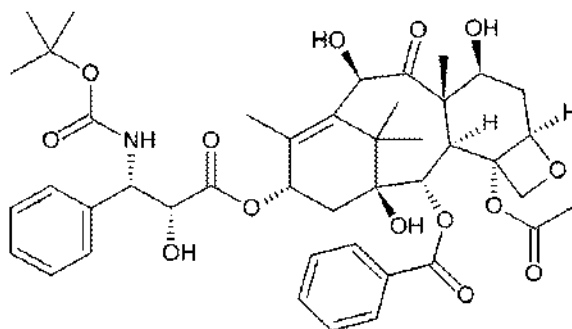
30



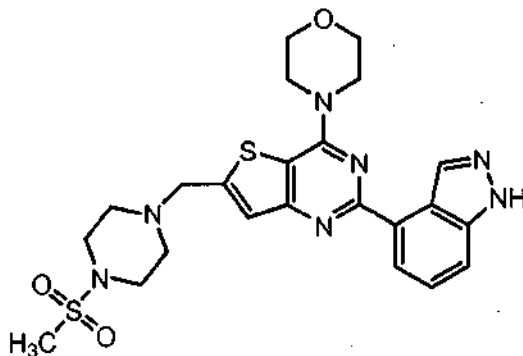
35 ABT-869 (Abbott y Genentech) es un inhibidor dirigido de forma múltiple de las familias de receptores de tirosina quinasas VEGF y PDGF, para el posible tratamiento oral del cáncer (documentos US 7297709; US 2004/235892; US 2007/104780). Se han iniciado ensayos clínicos tratando el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), el carcinoma hepatocelular ("HCC") y el carcinoma de células renales ("RCC"). ABT-869 se denomina como 1-(4-(3-amino-1H-indazol-4-il)fenil)-3-(2-fluoro-5-metilfenil)urea (n.º CAS 796967-16-3) y tiene la estructura:



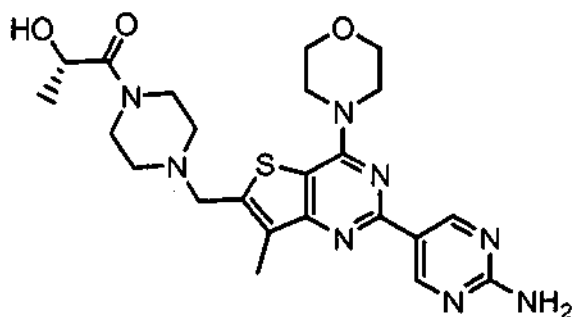
Docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis) se utiliza para tratar los cánceres de mama, de ovario y el NSCLC (documentos US 4814470; US 5438072; US 5698582; US 5714512; US 5750561). Docetaxel se denomina como *N*-*tert*-butil éster de (2*R*,3*S*)-*N*-carboxi-3-fenilisoerina, 2-benzoato de 13-éster con 5,20-epoxi-1,2,4,7,10,13-hexahidroxitax-11-en-9-ona 4-acetato, trihidrato (documento US 4814470; documento EP 253738; n.º de Reg. CAS 114977-28-5) y tiene la estructura:



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 US 2008/0076768; 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.º 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-(1*H*-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)metil)tieno[3,2-*d*]pirimidin-4-il)morfolina (N.º de Reg. CAS 957054-30-7), y tiene la estructura:



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.º 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:



## EVALUACIÓN BIOLÓGICA

- 5 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. Para combinaciones con agentes quimioterapéuticos, T-DM1 combinado con docetaxel o 5-FU dio como resultado una actividad antiproliferativa aditiva o sinérgica, mientras que las combinaciones con ya sea gemcitabina o carboplatino no tenían efecto o fueron antagonistas con T-DM1. Los estudios de xenoinjerto en ratón mostraron resultados similares, en donde T-DM1 combinado con docetaxel o 5-FU dio como resultado una eficacia antitumoral enormemente potenciada en comparación con el tratamiento con agentes individuales. T-DM1 combinado con carboplatino dio como resultado una eficacia potenciada en comparación con cualquier fármaco solo, mientras que la combinación de T-DM1 con gemcitabina no fue más eficaz que T-DM1 solo. T-DM1 combinado con ya sea pertuzumab, lapatinib o GDC-0941 dio como resultado una actividad antiproliferativa aditiva o sinérgica en experimentos de cultivos celulares y una eficacia antitumoral enormemente potenciada *in vivo* en comparación con el tratamiento con agentes individuales. Por el contrario, trastuzumab no conjugado antagonizó la actividad de T-DM1 debido a la unión al mismo epítipo en HER2. Los estudios *in vivo* utilizando combinaciones de T-DM1 con agentes antiangiogénicos tales como el anticuerpo B20-4.1 o el inhibidor de molécula pequeña ABT-869 dieron como resultado una eficacia antitumoral potenciada con todas las combinaciones analizadas, con la excepción de la dosis más alta de T-DM1 (10 o 15 mg/kg) proporcionada con B20-4.1.
- 10
- 15
- 20
- 25 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 pequeña.
- 30
- 35 La combinación del anticuerpo anti-VEGF murino B20-4.1 (Liang *et al.* (2006) Jour. Biol. Chem. 281: 951-961), un sustituto de bevacizumab, y trastuzumab-MCC-DM1 en modelos de xenoinjerto en ratón de cáncer de mama dio como resultado una mayor actividad antitumoral que B20-4.1 solo. Los resultados de estos estudios proporcionan la base predictiva de los efectos sinérgicos y un fundamento para la futura evaluación clínica de los regímenes de tratamiento que incluyan trastuzumab-MCC-DM1 en combinación con distintas terapias antitumorales en el cáncer de mama positivo para HER2.
- 40
- Con combinaciones de agentes dirigidos a HER2, tales como trastuzumab-DM1 más lapatinib, o trastuzumab-DM1 combinado con el anticuerpo frente a HER2 pertuzumab (un inhibidor de la dimerización de HER2), se observaron efectos farmacológicos sinérgicos.
- Trastuzumab-MCC-DM1 combinado con carboplatino o 5-FU mostró una actividad potenciada en comparación con el tratamiento con agentes individuales solo, mientras que el tratamiento de combinación con gemcitabina no dio como resultado una actividad antitumoral aumentada.
- 45
- 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.
- 50
- T-DM1 combinado con el inhibidor GDC-0941 de PI3K potenciaba 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 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 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.

## 10 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<sup>®</sup>, disponible en el mercado en Promega Corp., Madison, WI. Este método de ensayo homogéneo se basa en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5583024; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5674713; documento de Patente de Estados Unidos N.º 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.º 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo<sup>®</sup> se realizó en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible a identificación sistemática de alto rendimiento automatizada (HTS) (Cree *et al.*, (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición de un solo reactivo (Reactivo CellTiter-Glo<sup>®</sup>) 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.

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<sup>®</sup> 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 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 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<sup>®</sup> (Ejemplo 2) frente a las líneas de células tumorales en las Figuras 1-9 y 18-33.

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.

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<sub>50</sub> (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<sub>50</sub>. El índice de combinación (IC) de CI<sub>10</sub> a CI<sub>90</sub> 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 <sub>50</sub>	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



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 CI50 (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 CI50. El índice de combinación (IC) de CI<sub>10</sub> a CI<sub>90</sub> para cada combinación es mayor que 2, lo que indica antagonismo.

5

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

múltiplo de CI50	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

10 La Figura 3 muestra el efecto sinérgico de pertuzumab en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) a diversas concentraciones en múltiplos de los valores individuales de CI50 (Tabla 3) en células MDA-MB-175. El número de células se representa con respecto a los valores de múltiplos de CI50. El índice de combinación (IC) de CI<sub>10</sub> hasta CI<sub>90</sub> para cada combinación está debajo de 1, con el IC promedio = 0,387, lo que indica sinergia (Tabla 3).

15

Tabla 3 Proliferación de MDA-MB-175 - 5 días

múltiplo de CI50	pertuzumab ng/ml	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,0625 X	39,06	31,25	21,1	0,2
0,125 X	78,13	62,5	33,3	0,107
0,25 X	156,3	125	21,9	,766
0,5 X	312,5	250	33,6	0,597
1 X	625	500	50,7	0,391
2 X	1250	1000	67,7	0,259

La Figura 3a muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de MDA-MB-175 a los 5 días frente a concentraciones en múltiplos de CI50 de pertuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y la combinación de pertuzumab y T-DM1. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplos de CI50. El índice de combinación (IC) de CI<sub>10</sub> a CI<sub>90</sub> para cada combinación está debajo de 1, con el IC promedio = 0,096, lo que indica sinergia (Tabla 3a).

20

Tabla 3a Proliferación de MDA-MB-175 - 5 días

25

múltiplo de CI50	Efecto (%)	IC
0,0625x	21,3	0,093
0,125x	37,5	0,037
0,25x	40,1	0,060
0,5x	50,3	0,052
1x	53,9	0,078
2x	57,0	0,120
4x	65,5	0,117
8x	66,8	0,208

La Figura 4 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 5 días frente a diversas dosis fijas de pertuzumab en combinación con la respuesta a la dosis de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y diversas dosis de T-DM1 solo. La Figura 4 muestra los efectos de dosis fijas de T-DM1 en combinación con diversas dosificaciones de pertuzumab. La adición de pertuzumab a T-DM1 da como resultado una actividad antiproliferativa ligeramente mayor que T-DM1 solo.

La Figura 5 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 5 días frente a diversas dosis fijas de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) en combinación con la respuesta a la dosis de pertuzumab y diversas dosis de pertuzumab solo. La Figura 5 muestra los efectos de dosis fijas de pertuzumab en combinación con diversas dosificaciones de T-DM1 sobre la proliferación celular de BT-474. La adición de T-DM1 a pertuzumab potencia el efecto de pertuzumab solo.

La Figura 6 muestra el efecto sinérgico de pertuzumab en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) a diversas concentraciones en múltiplos de los valores individuales de CI50 (Tabla 4) en células BT-474. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplos de la CI50. Los valores del índice de combinación (IC) de CI<sub>10</sub> a CI<sub>90</sub> varían de 0,198 y 1,328. El IC promedio para este intervalo = 0,658, lo que indica sinergia.

Tabla 4 Proliferación de BT-474 - 5 días

múltiplo de CI50	pertuzumab ng/ml	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25 X	34,29	11,43	3,9	>2
0,5 X	102,88	34,29	2,0	>2
1 X	308,64	102,88	58,9	0,198
2 X	925,93	308,64	64,6	0,449
4 X	2777	926	64,9	1,328

La Figura 7 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días frente a dosis variables de T-DM1 en combinación con dosis fijas de lapatinib (4,5 nM, 14 nM, 41 nM, 123 nM) y dosis variables de T-DM1 solo (0-1000 ng/ml). La adición de lapatinib a T-DM1 da como resultado una actividad antiproliferativa ligeramente mayor que T-DM1 solo.

La Figura 7a muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días frente a T-DM1, lapatinib y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y lapatinib, como se muestra en la Tabla 7a. El valor de IC promedio entre la CI10 y la CI90 es = 0,793, lo que indica aditividad.

Tabla 7a Proliferación de SK-BR-3 - 3 días

múltiplo de CI50	lapatinib nM	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25x	4,57	1,52	3,5	>2
0,5x	13,72	4,57	22,0	1,384
1x	41,15	13,72	52,5	0,596
2x	123,44	41,15	75,9	0,406
4x	370,33	123,44	81,1	0,787
8x	1111	370,33	80,1	>2

La Figura 8a muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 3 días frente a T-DM1, lapatinib y combinaciones de proporción de dosis fija de T-DM1 y lapatinib, como se muestra en la Tabla 8a. El valor de CI promedio entre la CI10 y la CI90 es = 0,403, lo que indica sinergia.

Tabla 8a Proliferación de BT-474 - 3 días

múltiplo de CI50	lapatinib nM	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,125x	0,51	1,52	1,4	>2

0,25x	1,52	4,57	1,2	>2
0,5x	4,57	13,72	26,8	0,493
1x	13,72	41,15	62,2	0,201
2x	41,15	123,44	73,9	0,293
4x	123,44	370,33	84,1	0,390
8x	370,33	1111	89,3	0,638

5 La Figura 8 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 3 días frente a dosis variables de T-DM1 en combinación con dosis fijas de lapatinib (1,5 nM, 4,5 nM, 14 nM, 41 nM, 123 nM), y dosis variables de T-DM1 solo (0-1000 ng/ml). La adición de lapatinib a T-DM1 da como resultado una mayor actividad antiproliferativa en comparación con cualquier fármaco solo.

10 La Figura 9 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474-EEI a los 3 días frente a dosis variables de T-DM1 en combinación con dosis fijas de lapatinib (14 nM, 41 nM, 123 nM, 370 nM, 1111 nM) y dosis variables de T-DM1 solo (0-1000 ng/ml). La adición de lapatinib a T-DM1 da como resultado una mayor actividad antiproliferativa en comparación con cualquier fármaco solo.

15 La Figura 18 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días frente a concentraciones múltiplo de la CI50 de 5-FU, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de 5-FU y T-DM1 (Tabla 18). La combinación de 5-FU y T-DM1 es aditiva en células SK-BR-3, con el IC promedio entre la CI10 y la CI90 = 0,952.

Tabla 18 5-FU + T-DM 1: proliferación de SK-BR-3 - 3 días

múltiplo de CI50	Lapatinib (µM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,5x	62,5	1,95	38,9	1,035
1x	125	3,91	60,3	0,647
2x	250	7,81	69,2	0,835
4x	500	15,625	74,3	1,292

20 La Figura 19 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 3 días frente a concentraciones múltiplo de la CI50 de 5-FU, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de 5-FU y T-DM1 (Tabla 19). La combinación de 5-FU y T-DM1 es sinérgica en células BT-474, con el valor de IC promedio = 0,623.

25 Tabla 19 5-FU + T-DM1: proliferación de BT-474 - 3 días

Múltiplos de CI50	5-FU (µM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,25x	0,488	3,90	17,1	0,508
0,5x	0,976	7,81	26,8	0,494
1x	1,95	15,62	38,2	0,513
2x	3,91	31,25	46,8	0,661
4x	7,81	62,5	53,6	0,941

30 La Figura 20 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días frente a concentraciones múltiplo de la CI50 de gemcitabina, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de gemcitabina y T-DM1 (Tabla 20). Gemcitabina combinada con T-DM1 da como resultado una interacción de fármacos antagonista, con valores de IC > 1,3 a todas las combinaciones probadas.

Tabla 20 gemcitabina (GEM) + T-DM1: proliferación de SK-BR-3 - 3 días

Múltiplo de CI50	GEM (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,5x	3,12	6,25	28,7	1,308
1x	6,25	12,5	61,4	1,500
2x	12,5	25	69,9	2,588
4x	25	50	72,2	4,957

5 La Figura 21 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de MDA-MD-361 a los 3 días frente a concentraciones múltiplo de CI50 de gemcitabina, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) y combinaciones de proporción de dosis fija de gemcitabina y T-DM1 (Tabla 21). La combinación de fármacos proporciona un efecto antagonista, con el IC promedio = 1,706

10 Tabla 21 gemcitabina (GEM) + T-DM1: proliferación de MDA-MD-361 - 3 días

Múltiplos de CI50	GEM (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,125x	0,39	3,12	4,5	1,420
0,25x	0,78	6,25	10,3	1,584
0,5x	1,56	12,5	30,7	1,336
1x	3,12	25	59,2	1,280
2x	6,25	50	76,3	1,581
4x	12,5	100	80,3	2,747

15 La Figura 22 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 µM) a concentraciones múltiplos de CI<sub>50</sub> de 0,25x a 4x. La Tabla 22 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 22. La representación de independendencia de Bliss muestra la respuesta de la aditividad calculada de la combinación de dos compuestos individuales.

20 Tabla 22 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: KPL4 - 3 días

múltiplo de CI <sub>50</sub>	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

25 La Figura 23 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 µM) a concentraciones múltiplos de CI<sub>50</sub> 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 23 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: KPL4 - 3 días

múltiplo de CI <sub>50</sub>	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

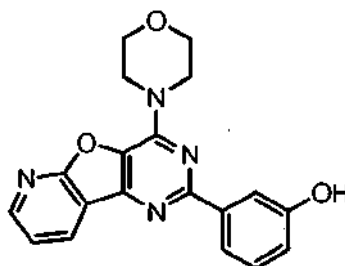
1x	250	10	84,5	0,452
2x	500	20	94,9	0,350
4x	1000	40	97,1	0,440
8x	2000	80	97,9	0,668

La Figura 24 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 24 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 24 Combinaciones: Proliferación de KPL4

IC a:	T-DM1 + GDC-0941	T-DM1 + PI103
DE <sub>50</sub>	0,74303	1,04069
DE <sub>75</sub>	0,63448	0,9721
DE <sub>90</sub>	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.º 6608053), y tiene la estructura:



La Figura 25 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 26 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 27 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  $\mu$ 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 27 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.

Tabla 27 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: MDA-MB-361 - 3 días

múltiplo de $CI_{50}$	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
----	------	----	------	-------

La Figura 28 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  $\mu$ 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 28 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.

Tabla 28 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: MDA-MB-361 - 3 días

múltiplo de $CI_{50}$	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

La Figura 29 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  $\mu$ 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 Tabla 29 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.

Tabla 29 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: BT-474 - 3 días

múltiplo de $CI_{50}$	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

La Figura 30 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  $\mu$ 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 Tabla 30 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 30 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 31 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  $CI_{50}$  de 0 a 16x. La Tabla 31 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 31 Combinaciones: Proliferación de AU565

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

La Figura 32 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  $CI_{50}$  de 0 a 16x. La Tabla 32 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 32 Combinaciones: Proliferación de EFM192A

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

La Figura 33 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  $CI_{50}$  de 0 a 16x. La Tabla 33 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 33 Combinaciones: Proliferación de HCC1954

IC a:	T-DM1 + GDC-0941	T-DM1 + PI103
DE <sub>50</sub>	1,15864	0,78902
DE <sub>75</sub>	0,92365	0,78684
DE <sub>90</sub>	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 10-17 y 34-37 muestran la eficacia de trastuzumab-MCC-DM1 en combinaciones con agentes quimioterapéuticos mediante la inhibición de tumor con xenoinjerto en ratones.

La Figura 10 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores KPL-4 inoculados en la almohadilla de grasa mamaria de ratones beige SCID tras la dosificación con: (1) tampón ADC, (2) pertuzumab 15 mg/kg, (3) T-DM1 0,3 mg/kg, (4) T-DM1 1 mg/kg, (5) T-DM1 3 mg/kg, (6) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 0,3 mg, (7) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 1 mg/kg, (8) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg. Los animales dosificados con tampón ADC (1) proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con pertuzumab (2) a 15 mg/kg proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con T-DM1 a 0,3 mg/kg (3) solo, proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con T-DM1 a 1 mg/kg (4) solo, proporcionaron 1 PR y 0 CR.

Los animales dosificados con T-DM1 a 3 mg/kg (5) solo, proporcionaron 7 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de pertuzumab a 15 mg/kg y T-DM1 a 0,3 mg/kg (6) proporcionaron 5 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de pertuzumab a 15 mg/kg y T-DM1 a 1 mg/kg (7) proporcionaron 8 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de pertuzumab a 15 mg/kg y T-DM1 a 3 mg/kg (8) proporcionaron 8 PR y 0 CR. La combinación de pertuzumab y T-DM1 dio como resultado una mayor actividad antitumoral en xenoinjertos de KPL4 que cualquier agente solo.

La Figura 11 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores KPL-4 inoculados la almohadilla de grasa mamaria de ratones beige SCID tras la dosificación con: (1) tampón ADC, (2) 5-FU 100 mg/kg, (3) pertuzumab, 40 mg/kg, (4) B20-4.1, 5 mg/kg, (5) T-DM1, 5 mg/kg, (6) 5-FU, 100 mg/kg + T-DM1, 5 mg, (7) pertuzumab, 40 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, (8), -4.1 5 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, (9) B20-4.1, 5 mg/kg + pertuzumab, 40 mg/kg. Al final del estudio, se evaluaron histológicamente todos los tumores restantes de menos de 50 mm<sup>3</sup> de volumen y se determinó que 8 muestras con el único agente (5) T-DM1, 5 mg/kg, 5 muestras en el grupo de combinación (6) 5-FU, 100 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg y 8 muestras en el grupo de combinación (7) pertuzumab, 40 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, no tenían evidencia de células tumorales viables.

La Figura 12 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor mamario transgénico de MMTV-HER2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón ADC), (2) B20-4.1, 5 mg/kg, (3) T-DM1, 3 mg/kg, (4) T-DM1, 5 mg/kg, (5) T-DM1, 10 mg/kg, (6) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1, 3 mg/kg, (7) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, (8) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1, 10 mg/kg. La combinación de T-DM1 y B20-4.1 dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral potenciada con T-DM1 de 3 a 5 mg/kg, pero no a 10 mg/kg.

La Figura 13 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor mamario transgénico de MMTV-HER2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones CRL nu/nu tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón ADC), (2) T-DM1, 10 mg/kg, (3) 5-FU, 100 mg/kg, (4) gemcitabina, 120 mg/kg, (5) carboplatino, 100 mg/kg, (6) 5-FU, 100 mg/kg + T-DM1, 10 mg/kg, (7) gemcitabina, 120 mg/kg + T-DM1, 10 mg/kg, (8) carboplatino, 100 mg/kg + T-DM1, 10 mg/kg. T-DM1 combinado con ya sea 5-FU, carboplatino o gemcitabina da como resultado una eficacia antitumoral potenciada en comparación con el tratamiento de agente único.

La Figura 14 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en xenoinjertos de tumor mamario transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón PBS) iv, qwk x4, (2) lapatinib, 101 mg/kg, po, bid x21, (3) pertuzumab, 40 mg/kg, iv, qwk x4, (4) B20-4.1, 5 mg/kg, ip, 2x/wk x4, (5) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final, (6) lapatinib, 101 mg/kg, po, bid x21 + T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final (7) pertuzumab, 40 mg/kg, iv, qwk x4 + T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final, (8) B20-4.1, 5 mg/kg, ip, 2x/wk x4 + T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final.

El agente único T-DM1 a una dosis de 15 mg/kg (5) no es significativamente distinto de la combinación de T-DM1 a 15 mg/kg y B20-4.1 a 5 mg/kg (8). Lapatinib y pertuzumab no fueron distintos del vehículo en este estudio. B20-4.1 mostró una tendencia hacia una eficacia aumentada en comparación con el vehículo. T-DM1 fue eficaz como agente único ( $p < 0,01$ ). La combinación de T-DM1 con lapatinib fue significativamente mejor que lapatinib solo ( $p < 0,01$ ), pero no fue distinta de T-DM1. La combinación de T-DM1 con pertuzumab fue significativamente mejor que pertuzumab solo ( $p < 0,01$ ), pero no fue distinta de T-DM1 solo. La combinación de T-DM1 con B20-4.1 fue significativamente mejor que B20-4.1 solo ( $p < 0,01$ ), pero no fue distinta de T-DM1 solo.

La Figura 15 muestra una representación de la eficacia *in vivo* por el cambio de volumen tumoral medio en el tiempo en xenoinjertos de tumor mamario transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo (tampón PBS) po, bid x21 (2) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, qd x1 (3) T-DM1, 15 mg/kg, iv, qd x1 (4) ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (5) ABT-869, 15 mg/kg, po, bid x21 (6) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (7) T-DM1 7,5 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 15 mg/kg, po, bid x21 (8) T-DM1, 15 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 5 mg/kg, po, bid x21 (9) T-DM1, 15 mg/kg, iv, qd x1 + ABT-869, 15 mg/kg, po, bid x21.

La combinación de T-DM1 y ABT-869, 5 mg/kg mostró dos respuestas parciales (8), y no es significativamente más eficaz que el agente único ABT-869, 5 mg/kg (4). La combinación de T-DM1 y ABT-869, 15 mg/kg (9) es ligeramente más eficaz que el agente único ABT-869, 15 mg/kg (5). ABT-869 dosificado a 5 mg/kg fue significativamente mejor que el vehículo en el momento del punto final ( $p < 0,01$ ), pero no fue distinto del vehículo en el momento de duplicación del tumor. ABT-869 dosificado a 15 mg/kg y T-DM1 dosificado ya sea a 7,5 o 15 mg/kg, fueron significativamente mejores que el vehículo tanto en el momento de duplicación del tumor como en el momento de punto final del tumor ( $p < 0,01$ ). La combinación de T-DM1 7,5 mg/kg y ABT-869 5 mg/kg no fue distinta del agente único de T-DM1 7,5 mg/kg. En comparación con el agente único ABT-869 5 mg/kg, la combinación de T-DM1 7,5 mg/kg + ABT-869 5 mg/kg fue significativamente mejor en el momento de la duplicación del tumor ( $p < 0,01$ ), pero no fue distinta en el momento del punto final. La combinación de T-DM1 7,5 mg/kg y ABT-869 15 mg/kg fue significativamente mejor que cualquier agente único ( $p < 0,01$ ). La combinación de T-DM1 15 mg/kg + ABT-869



5 mg/kg no fue distinta del agente único T-DM1 15 mg/kg. En comparación con el agente único ABT-869 5 mg/kg, la combinación de T-DM1 15 mg/kg y ABT-869 5 mg/kg no fue distinta en el momento del punto final, pero fue significativamente distinta en el momento de duplicación del tumor ( $p < 0,01$ ). La combinación de T-DM1 15 mg/kg + ABT-869 15 mg/kg fue significativamente mejor que ABT-869 15 mg/kg solo y fue mejor que T-DM1 15 mg/kg solo, en el momento de duplicación del tumor ( $p < 0,01$ ). El momento del punto final de T-DM1 15 mg/kg y T-DM1 15 mg/kg + ABT-869 15 mg/kg no fue distinto.

La Figura 16 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en xenoinjertos de tumor mamario transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo. iv. qwk x3 (2) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2 (3) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 (4) docetaxel, 30 mg/kg, iv, qwk x3 (5) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2 + docetaxel, 30 mg/kg, iv, qwk x3 (6) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 + docetaxel, 30 mg/kg, iv, qwk x3.

Los animales dosificados con T-DM1 a 15 mg/kg (3) solo, proporcionaron 6 respuestas parciales (PR) y 1 respuesta completa (CR). Los animales dosificados con docetaxel solo a 30 mg/kg (4) proporcionaron 2 PR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 7,5 mg/kg y docetaxel a 30 mg/kg (5) proporcionaron 10 PR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 15 mg/kg y docetaxel a 30 mg/kg (6) mostraron una respuesta a la dosis con 7 PR y 3 CR. Todos los grupos de agente único fueron significativamente distintos al grupo de vehículo ( $p < 0,01$ ). La combinación de T-DM1 7,5 mg/kg + docetaxel fue significativamente mejor que cualquier agente único tanto en el momento de duplicación de tumor como en el momento de punto final ( $p < 0,01$ ). No hubo respuestas objetivas en el grupo de T-DM1 7,5 mg/kg y hubo 2 respuestas parciales (PR) en el grupo de agente único de docetaxel. La combinación de T-DM1 7,5 mg/kg y docetaxel dio como resultado las 9 PR y 1 respuesta completa (CR). La combinación de T-DM1 15 mg/kg + docetaxel fue significativamente mejor que cualquier agente único en el momento de duplicación del tumor y en el momento de punto final ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con agente único T-DM1 15 mg/kg dio como resultado las 5 PR y las 2 CR. La combinación de T-DM1 15 mg/kg + docetaxel aumentó la proporción de respuestas objetivas a las 7 PR y las 3 CR. Todos los ratones en este grupo de combinación tuvieron una respuesta objetiva al tratamiento.

La Figura 17 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en xenoinjertos de tumor mamario transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos atímicos de Harlan tras la dosificación con: (1) vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2, (3) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 (4) lapatinib, 100 mg/kg, po, bid x21, (5) T-DM1, 7,5 mg/kg, iv, q3wk x2 + lapatinib, 100 mg/kg, po, bid x21, (6) T-DM1, 15 mg/kg, iv, q3wk x2 + lapatinib, 100 mg/kg, po, bid x21.

Los animales dosificados con T-DM1 a 15 mg/kg (3) solo, proporcionaron 6 respuestas parciales (PR) y 3 respuestas completas (CR). Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 7,5 mg/kg y lapatinib a 100 mg/kg (5) proporcionaron 4 PR y 5 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 a 15 mg/kg y lapatinib a 100 mg/kg (6) mostraron una respuesta a la dosis con 8 CR. Todos los grupos de agente único fueron significativamente distintos del vehículo ( $p < 0,01$ ) tanto en el momento de duplicación del tumor como en el momento de punto final. T-DM1 dosificado a 7,5 mg/kg en combinación con lapatinib fue significativamente mejor que ya sea lapatinib o T-DM1 a 7,5 mg/kg como agente único ( $p < 0,01$ ). T-DM1 dosificado a 15 mg/kg en combinación con lapatinib fue significativamente mejor que el agente único lapatinib ( $p < 0,01$ ). Esta combinación no fue distinta de T-DM1 15 mg/kg dosificado como agente único.

El tiempo de duplicación del tumor se midió mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier como 2 X Vo. El tiempo de duplicación de tumor y el análisis de la supervivencia se cuantificaron mediante valores p de rangos logarítmicos. El tiempo de progresión se mide como el tiempo transcurrido hasta que el volumen tumoral alcance los 1000 mm<sup>3</sup>, o el tiempo de supervivencia si no se alcanza el volumen tumoral de 1000 mm<sup>3</sup>. T-DM1 combinado con lapatinib dio como resultado una eficacia antitumoral enormemente potenciada en comparación con el tratamiento de agente único.

La Figura 34 muestra una representación del cambio de volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en un tumor mamario transgénico de MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu dosificados con: (1) vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (3) 5-FU, 100 mg/kg, po, qwk x2, (4) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk + 5-FU, 100 mg/kg, po, qwk x2. Los animales dosificados con vehículo proporcionaron 0 respuestas parciales (PR) y 0 respuestas completas (CR). Los animales dosificados con T-DM1 proporcionaron 1 PR y 0 CR. Los animales dosificados con 5-FU proporcionaron 0 PR y 0 CR. Los animales dosificados con la combinación de T-DM1 y 5-FU proporcionaron 3 PR y 0 CR en el punto de tiempo de 42 días. El tratamiento con T-DM1 y 5-FU dio como resultado una actividad antitumoral potenciada en comparación con cualquier agente solo.

La Figura 35 muestra una representación de la viabilidad celular del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico de 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).

5 La Figura 36 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, qdx 21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk.

15 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 37 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 80al 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.

35 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.

#### 45 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

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

50 Trastuzumab-MCC-DM1 y los agentes quimioterapéuticos de la presente 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.

55 Trastuzumab-MCC-DM1 y los agentes quimioterapéuticos 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.

65 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 trastuzumab-MCC-DM1 y un agente quimioterapéutico seleccionado de los listados de los agentes adicionales 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. De forma similar, el método descrito en el presente documento de tratamiento de un paciente mediante la administración de una composición farmacéutica de la presente invención también se pretende que abarque la administración de la composición a granel y de unidades de dosificación individuales.

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  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{123}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ . Ciertos compuestos de la presente invención marcados de forma isotópica (por ejemplo, los marcados con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ ) son útiles ensayos de distribución de compuesto y/o tejido de sustrato. Los isótopos tritados ( $^3\text{H}$ ) y de carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ) son útiles por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio ( $^2\text{H}$ ) 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  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$  y  $^{18}\text{F}$  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 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. 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 de la invención 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 cetosteárico, 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 arábiga, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de óxido de alquileo 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 polioxietileno 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.

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.

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.

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.

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.

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 arábiga o de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

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.

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.

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.

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.

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

5 El trastuzumab-MCC-DM1 se puede usar en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hiperproliferativo, que incluye tumores, cánceres y tejido neoplásico, junto con trastornos premalignos y no neoplásicos o hiperproliferativos no malignos. En ciertas realizaciones, el trastuzumab-MCC-DM1 se combina en una formulación de la combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia  
10 de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anti-hiperproliferativas o que es útil para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo. 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  
15 presente invención comprende trastuzumab-MCC-DM1 en combinación con un agente quimioterapéutico tal como se describe en el presente documento. Los Ejemplos 4 y 5 son protocolos clínicos para T-DM1+ pertuzumab y T-DM1 + GDC-0941 (ejemplo de referencia), respectivamente.

20 Las combinaciones terapéuticas de la invención incluyen una formulación, un régimen de dosificación u otro ciclo de tratamiento, que comprende la administración de trastuzumab-MCC-DM1 y de pertuzumab como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.

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.

30 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 un agente quimioterapéutico, que incluye agentes hormonales o anticuerpos, tal como los descritos 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

40 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  
45 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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  
50 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.

55 Una dosis de trastuzumab-MCC-DM1 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-DM1, 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.  
60 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.

#### TRATAMIENTO

5 Combinaciones terapéuticas de: (1) trastuzumab-MCC-DM1 y (2) los agentes quimioterapéuticos pertuzumab, útiles para el tratamiento de enfermedades, afecciones y/o trastornos del cáncer caracterizados por la activación de la ruta de HER2. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención incluye la combinación para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos que pueden tratarse mediante el direccionamiento a HER2. Las combinaciones terapéuticas de: (1) trastuzumab-MCC-DM1 y (2) pertuzumab pueden emplearse para el tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2.

15 Algunos cánceres que se pueden tratar incluyen de 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.

20 Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica o combinación terapéutica para su uso en el tratamiento de las enfermedades o afecciones descritas en el presente documento en un mamífero, por ejemplo, un ser humano que padece tal enfermedad o afección. También se proporciona el uso de una composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento en un animal de sangre caliente, tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano, que padece tal trastorno.

#### ARTÍCULOS PARA PREPARACIÓN

30 En otra realización de la invención se proporciona un artículo de preparación, o un "kit", que contiene trastuzumab-MCC-DM1 útil para el tratamiento de las enfermedades o trastornos que se han descrito anteriormente. En una realización, el kit comprende 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 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. Tales envases incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, envases 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 (BWFI), 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.

50 El kit puede comprender adicionalmente directrices para la administración de trastuzumab-MCC-DM1 y, si está presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende trastuzumab-MCC-DM1 y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender adicionalmente directrices para la administración simultánea, secuencial o separada de las primera y segunda formulaciones farmacéuticas a un paciente con necesidad de las mismas.

60 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.

65



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 un segundo compuesto con actividad antihiperproliferativa. Como alternativa, o adicionalmente, el kit también puede comprender adicionalmente

- 5 un tercer envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), 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.
- 10 Cuando el kit comprende una composición de trastuzumab-MCC-DM1 y un segundo agente terapéutico, es decir, el agente quimioterapéutico, 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
- 15 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

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

#### Ejemplo 1 Preparación de trastuzumab-MCC-DM1

- 25 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
- 30 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 %.

- 35 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.º 6790954; documento de Patente de Estados Unidos N.º 7432088) y se puede
- 40 derivatizar para conjugación (documento de Patente de Estados Unidos N.º 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
- 45 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.

- 50 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
- 55 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.

- 60 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
- 65

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  
5 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). 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  
10 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 (N.º de cat. 249946)

20 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

Cell Titer-Glo: Promega (N.º de cat. G7572)

#### Procedimiento:

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, CO<sub>2</sub> al 5 %.

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 1,5 µl de otro fármaco a la placa de medio.

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, CO<sub>2</sub> al 5 % en una incubadora que no se abrirá a menudo.

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).

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 CO<sub>2</sub> 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 CE<sub>50</sub> 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 CE<sub>50</sub> de 8X. En los casos en los que la CE<sub>50</sub> 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.

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

1. una alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10<sup>4</sup> 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.

5 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.

10 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  $CE_{50}$  se calcularon usando un ajuste de curva de dosis respuesta sigmoidea.

### Ejemplo 3 Xenoinjerto de Tumor *In Vivo*

20 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 mm<sup>3</sup> 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-DM1 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 (mm<sup>3</sup>) = (medida más larga x medida más corta<sup>2</sup>) x 0,5.

35 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.

40 Los ratones cuyo volumen tumoral superaba 2000 mm<sup>3</sup> 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.

45 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.

50 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.

### Ejemplo 4 Estudio clínico de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) en combinación con pertuzumab

60 Para caracterizar la seguridad y la tolerabilidad de la combinación se diseñó un estudio sin ocultación de Fase 1b/II de la seguridad, tolerabilidad y eficacia de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) en combinación con pertuzumab, administrados por vía intravenosa a pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo para HER2 que han progresado mientras recibían la terapia anterior. La combinación se administra cada 3 semanas a pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo para HER2 que han recibido anteriormente trastuzumab en cualquier línea de terapia, han recibido quimioterapia combinada con terapia dirigida a HER2 para enfermedad avanzada, o han progresado mientras recibían su terapia más reciente. Otro objetivo es

evaluar la farmacocinética de T-DM1 cuando se administra en este programa la combinación de T-DM1 y pertuzumab. Otro objetivo es hacer una evaluación preliminar de la eficacia de la combinación de T-DM1 y pertuzumab administrada en este programa, según se mide por la tasa de respuesta objetiva basada en la evaluación del investigador utilizando los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos modificados (RECIST), Versión 1.0. Los objetivos secundarios de este estudio son como sigue: (1) estimar la progresión sin supervivencia (PSS) de los pacientes que reciben la combinación de T-DM1 y pertuzumab administrada en este programa; (2) evaluar la duración de la respuesta de la combinación de T-DM1 y pertuzumab administrada en este programa; y (3) evaluar el desarrollo de anticuerpos antiterapéuticos frente a T-DM1.

T-DM1 se administrará por infusión intravenosa (IV) en combinación con pertuzumab, también administrado por infusión intravenosa (IV), en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo para HER2 que han recibido anteriormente trastuzumab o han progresado después de o mientras recibían su última terapia. Los pacientes recibirán una combinación de T-DM1 y pertuzumab, en ciclos repetidos, a un intervalo mínimo de 3 semanas.

Se observará la TLD (Toxicidad Limitante de la Dosis) en los pacientes a un dado nivel de dosis durante el período de observación de la TLD (definido como los 21 días a partir del momento de la primera dosis de T-DM1) tras recibir sus primeras dosis de los fármacos del estudio antes del tratamiento de cualquier paciente a un nivel de dosis superior. Si en estos pacientes no se observan TLD durante el período de observación de la TLD, puede proceder el aumento de la dosis al próximo nivel de dosis.

Una TLD se define como cualquiera de las siguientes toxicidades relacionadas con el tratamiento que se producen dentro del período de observación de la TLD: (1) Grado  $\geq 3$ , acontecimiento adverso no hematológico que no se debe a progresión de la enfermedad u otra causa claramente identificable, excepto para la alopecia de cualquier grado; (2) Grado 3, diarrea que responde a la terapia habitual; (3) Grado 3, náuseas o vómitos en ausencia de premedicación que responde a la terapia habitual; (4) Grado  $\geq 3$ , aumento de la bilirrubina sérica, de las transaminasas (ALT o AST) o la fosfatasa alcalina (FA) hepáticas durante 72 horas, con la excepción de los pacientes con transaminasa hepática de Grado 2 o niveles de ALP basales ( $\leq 5$  el límite superior de la normalidad [ULN]) como resultado de metástasis en el hígado o en hueso. Un nivel de transaminasa hepática o ALP  $\geq 10$  ULN se considerará como TLD; (5) Grado  $\geq 4$ , trombocitopenia durante 24 horas; (6) Grado  $\geq 4$ , neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos  $< 500/\text{células}/\text{mm}^3$ ) durante 4 días o acompañado de fiebre (temperatura oral o del tímpano de  $100,4^\circ\text{F}$  o  $38^\circ\text{C}$ ); (7) cualquier toxicidad intolerable de forma subjetiva que el investigador considere que está relacionada con cualquiera de los compuestos de prueba; (8) cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento que prohíba el inicio del segundo ciclo de tratamiento.

Una vez que se ha tomado la decisión para avanzar al siguiente nivel de dosis más alto, también se permitirá un aumento de la dosis intrapaciente; los pacientes que participan en el estudio recibirán inicialmente una dosis reducida de T-DM1 (3,0 mg/kg) junto con la dosis completa de pertuzumab. En estos pacientes se permitirá el aumento de la dosis hasta las dosis completas de ambos fármacos para los ciclos posteriores, una vez que sus cohortes hayan acabado el período de observación de la TLD. Sin embargo, la seguridad del nivel de dosis de 3,6 mg/kg se basará en la evaluación de la TLD. Los pacientes (incluyendo aquellos que participan en el estudio durante la fase de aumento de la dosis del estudio) se considerarán evaluables para la eficacia si permanecen en el estudio hasta la primera evaluación de seguimiento del tumor. El ecocardiograma (ecocardio) o la ventriculografía nuclear (MUGA, siglas del inglés *multigated acquisition*) deben realizarse al final del ciclo 1 y después cada tres ciclos a lo largo de todo el período de tratamiento.

#### 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 0,9 %, se recomienda el uso de filtros en línea de 0,22  $\mu\text{m}$ . 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  $2^\circ\text{C}$ - $8^\circ\text{C}$  ( $36^\circ\text{F}$ - $46^\circ\text{F}$ ) durante un breve periodo de tiempo.

#### Formulación de Pertuzumab

Pertuzumab se proporciona como una formulación de un solo uso que contiene pertuzumab 30 mg/ml formulado en

L-histidina 20 mM (pH 6,0), sacarosa 120 mM y polisorbato 20 al 0,02 %. Cada vial de 20 cc contiene aproximadamente 420 mg de pertuzumab (14,0 ml/vial). El volumen indicado de solución de pertuzumab se extrae de los viales y se añade a una bolsa IV de 250 cc de solución de cloruro de sodio al 0,9 % para inyección. La bolsa se invierte suavemente para mezclar la solución y se inspecciona de forma visual la presencia de partículas o de decoloración antes de la administración. La solución de pertuzumab diluida para la infusión en bolsas de polietileno o de poliolefina sin PVC que contienen solución de cloruro de sodio al 0,9 % puede almacenarse a 2 °C-8 °C (36 °F-46 °F) durante un período corto de tiempo.

#### Medidas de resultados de seguridad

La seguridad y la tolerabilidad de T-DM1 y pertuzumab se evaluarán utilizando las siguientes medidas principales de resultados de seguridad: (1) frecuencia, naturaleza y gravedad de los acontecimientos adversos; (2) acontecimientos adversos o cambios en datos obtenidos en la exploración clínica y en los resultados de laboratorio clínico durante y después de la administración del fármaco de estudio que da como resultado una modificación de la dosis, retraso de la dosis o una interrupción de T-DM1 y/o pertuzumab; y (3) cambio en la función cardíaca (es decir, fracción de expulsión del ventrículo izquierdo [FEVI], anomalías de la pared segmentaria), que incluyen ecocardio o exploraciones MUGA.

#### Mediciones de resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos

Se determinarán los siguientes parámetros farmacocinéticos de T-DM1 y pertuzumab en todos los pacientes que reciben el tratamiento de estudio, utilizando cualquiera de los métodos no compartimentales y/o de población, cuando sea apropiado, según lo permitan los datos: (1) Concentraciones séricas de T-DM1 (conjugado), trastuzumab total (libre y conjugado con DM1); (2) Concentraciones plasmáticas de DM1 libre; (3) Exposición total (área bajo la curva [ABC] concentración-tiempo); (4) Concentración sérica máxima (C<sub>máx</sub>); (5) Concentración mínima (C<sub>mín</sub>); (6) Eliminación; (7) Volumen de distribución; (8) Semivida terminal; (9) Anticuerpos antiterapéuticos contra T-DM1.

#### Medidas de resultados de eficacia

Se evaluará como la medida de resultados de eficacia la tasa de respuestas objetivas usando el RECIST v1.0 modificado. Las medidas secundarias de resultados de eficacia del presente estudio son las siguientes: (1) la SSP, definida como el tiempo desde el inicio del tratamiento de estudio hasta la primera aparición en el estudio de progresión de la enfermedad o el fallecimiento (dentro de los 30 días de la última dosis del tratamiento de estudio) debido a cualquier causa, según lo determinado por el análisis del investigador de las evaluaciones de los tumores utilizando RECIST v1.0 modificado; y (2) la duración de la respuesta, definida como la primera aparición de una respuesta objetiva documentada hasta el momento de progresión de la enfermedad, según lo determinado por el análisis del investigador de las evaluaciones de los tumores utilizando RECIST (v1.0) modificado, o hasta el fallecimiento en el estudio (dentro de los 30 días de la última dosis del tratamiento de estudio) debido a cualquier causa.

#### Tratamiento del estudio

T-DM1 se administrará de forma no más frecuente que cada 3 semanas, a una dosis de 2,4, 3,0 o 3,6 mg/kg IV. Puede reducirse la dosis en cualquier paciente hasta una dosis de T-DM1 tan baja como 2,4 mg/kg. Dependiendo de la toxicidad encontrada en la cohorte de pacientes que inician la terapia a 3,0 mg/kg y si T-DM1 3,0 mg/kg se confirma que es tolerable, en los ciclos posteriores se aumentará la dosis de los pacientes hasta una dosis de 3,6 mg/kg IV cada 3 semanas. Pertuzumab se administrará a una dosis de carga de 840 mg IV en el día 1, ciclo 1, seguido de 420 mg IV cada 3 semanas en ciclos posteriores.

#### Métodos estadísticos

El criterio principal de eficacia del presente estudio es la respuesta objetiva evaluada por el investigador, definida como una respuesta completa o parcial determinada en dos ocasiones consecutivas con  $\geq 4$  semanas de diferencia. Se calculará una estimación de la tasa de respuestas objetivas así como el intervalo de confianza del 95 % correspondiente. Para la respuesta objetiva, los pacientes sin una evaluación del tumor posterior a la medida inicial válida se considerarán como no respondedores. Para la duración de la respuesta y la SSP, los datos de los pacientes que se pierden durante el seguimiento se tratarán como censurados en la última fecha en que se supo que el paciente estaba libre de progresión. Los datos para los pacientes sin evaluación del tumor posterior al tratamiento o fallecidos, se censurarán en la fecha de inicio del tratamiento más 1 día.

#### Ejemplo 5 (ejemplo de referencia)

Estudio clínico de trastuzumab-MCC-DM1 (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 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 Medidas de Resultados

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

#### 25 Tratamiento del Estudio

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.

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.

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 ( $\pm 10$ ), 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 ( $\pm 10$ ) minutos.

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2, en donde el método comprende administrar a un mamífero una combinación terapéutica como una formulación combinada o de forma alternante, en donde la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab, en donde la administración de la combinación terapéutica da como resultado un efecto sinérgico.
2. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab se administran como una formulación combinada.
3. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab se administran de forma alternante.
4. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 3, en donde se administra al mamífero el pertuzumab y posteriormente se le administra trastuzumab-MCC-DM1.
5. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la combinación terapéutica se administra aproximadamente a intervalos de tres semanas a un ser humano con un cáncer que expresa ErbB2.
6. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se administra trastuzumab-MCC-DM1 a intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas a un ser humano con un cáncer que expresa ErbB2.
7. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se administra el trastuzumab-MCC-DM1 con una frecuencia no superior a cada 3 semanas a una dosis de 2,4, 3,0 o 3,6 mg/kg por vía intravenosa.
8. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 7, en donde se administra pertuzumab a una dosis de carga de 840 mg por vía intravenosa en el día 1, ciclo 1, seguido de 420 mg por vía intravenosa cada tres semanas en ciclos posteriores.
9. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad de pertuzumab son cada una de 1 mg a 1000 mg, y la cantidad de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad de pertuzumab están en una proporción de 1:10 a 10:1 en peso.
10. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el mamífero es un paciente positivo para HER2.
11. Una combinación terapéutica para su 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.
12. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la combinación terapéutica es una composición farmacéutica que comprende trastuzumab-MCC-DM1, pertuzumab y uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Una combinación terapéutica para su uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 12, en donde la composición farmacéutica comprende una sustancia de deslizamiento farmacéuticamente aceptable seleccionada de 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.
14. Uso de una combinación terapéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama, en donde la combinación terapéutica se administra a un mamífero como una formulación combinada o de forma alternante, y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab, en donde la administración de la combinación terapéutica da como resultado un efecto sinérgico.

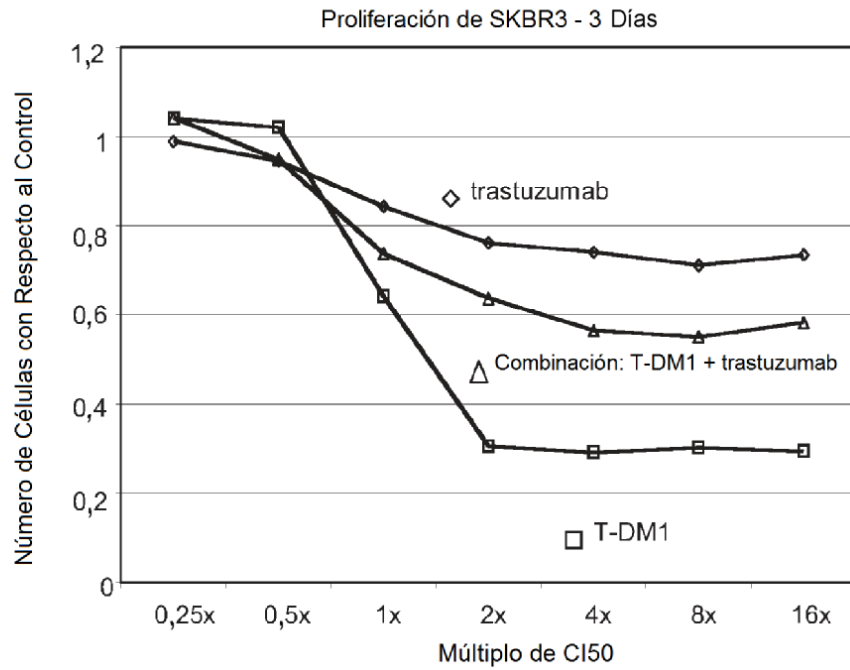


Figura 1

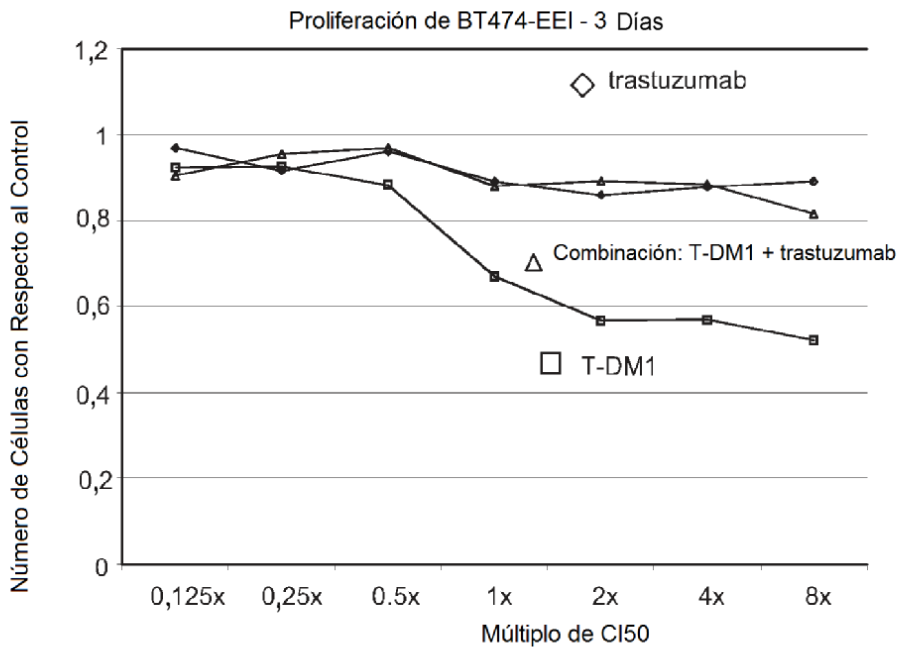


Figura 2



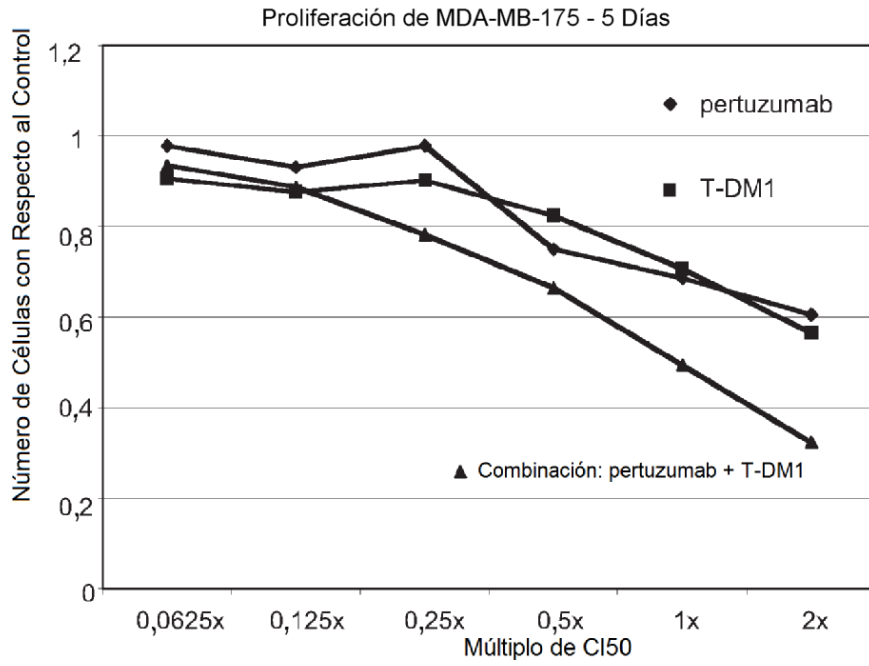


Figura 3

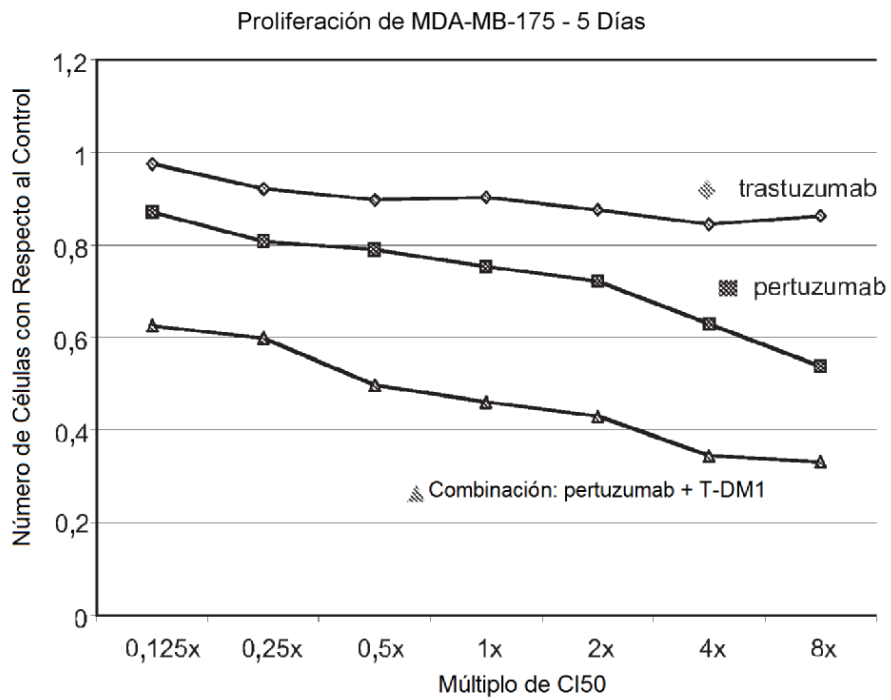


Figura 3a

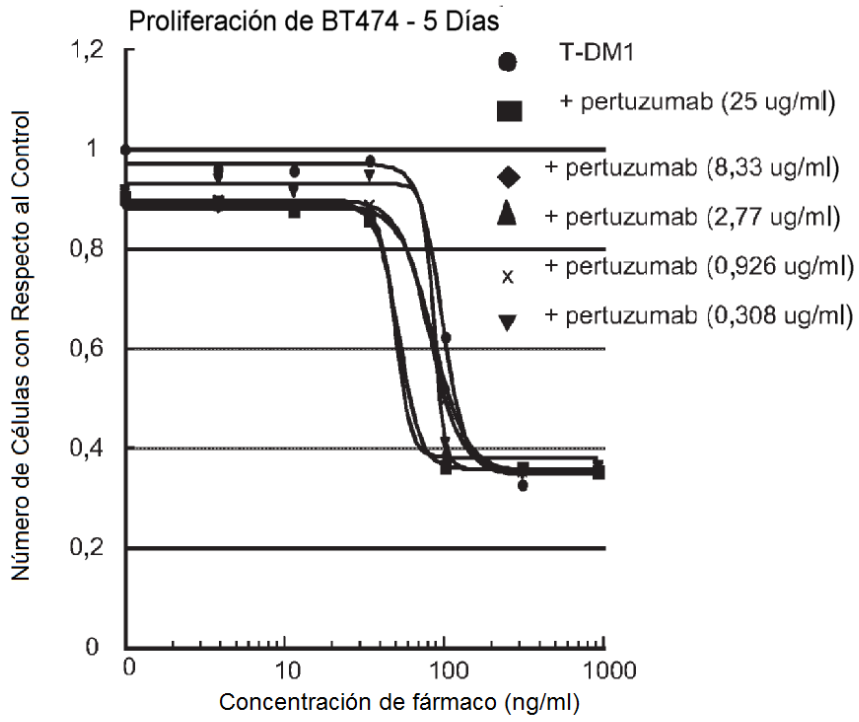


Figura 4

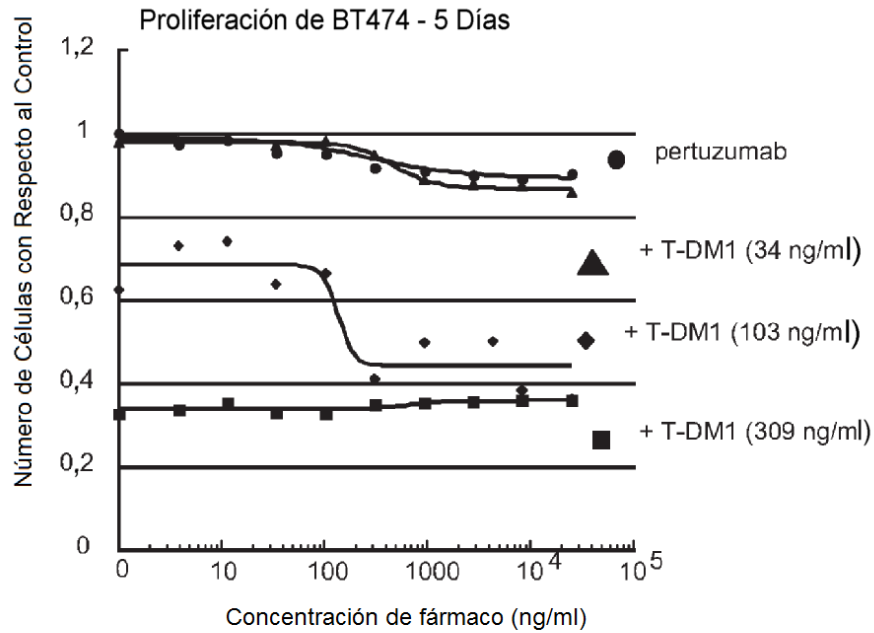


Figura 5

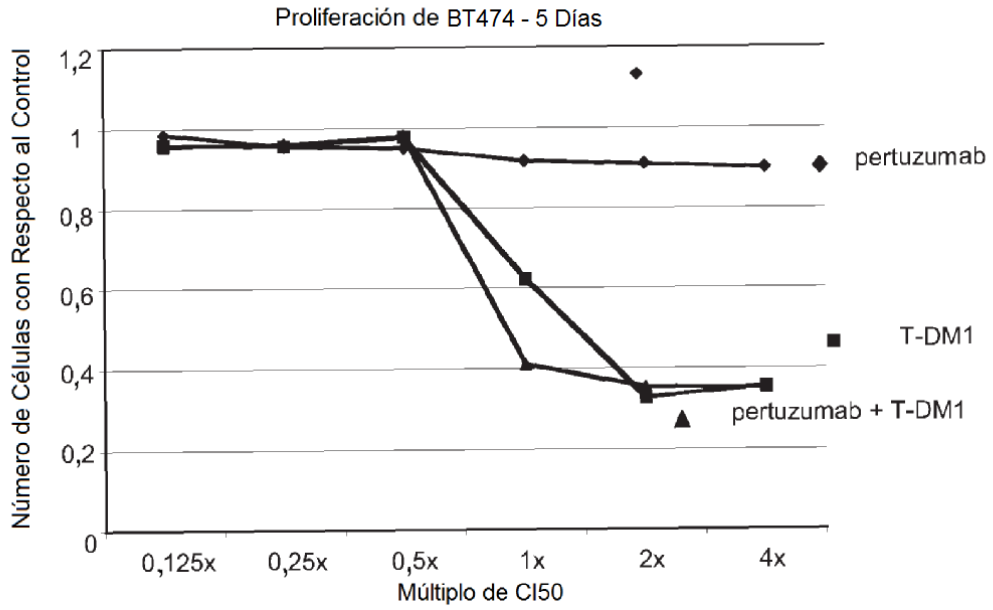


Figura 6

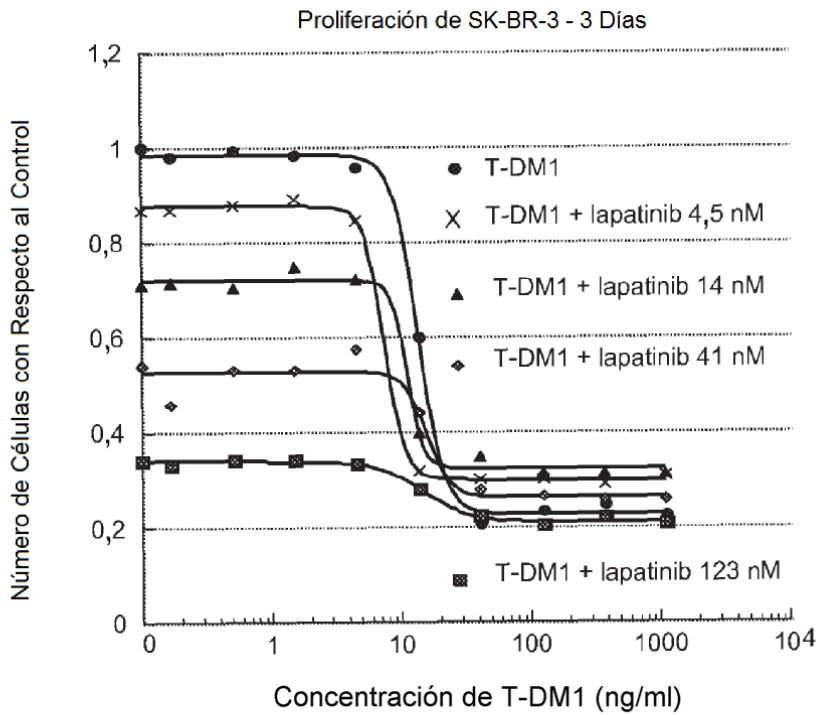


Figura 7

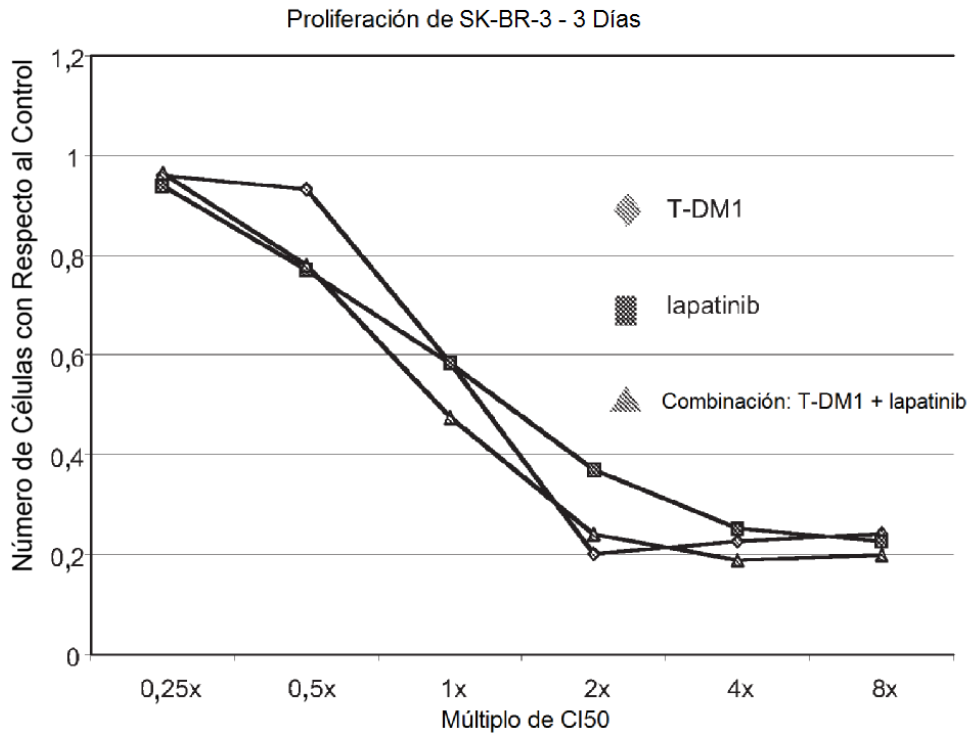


Figura 7a

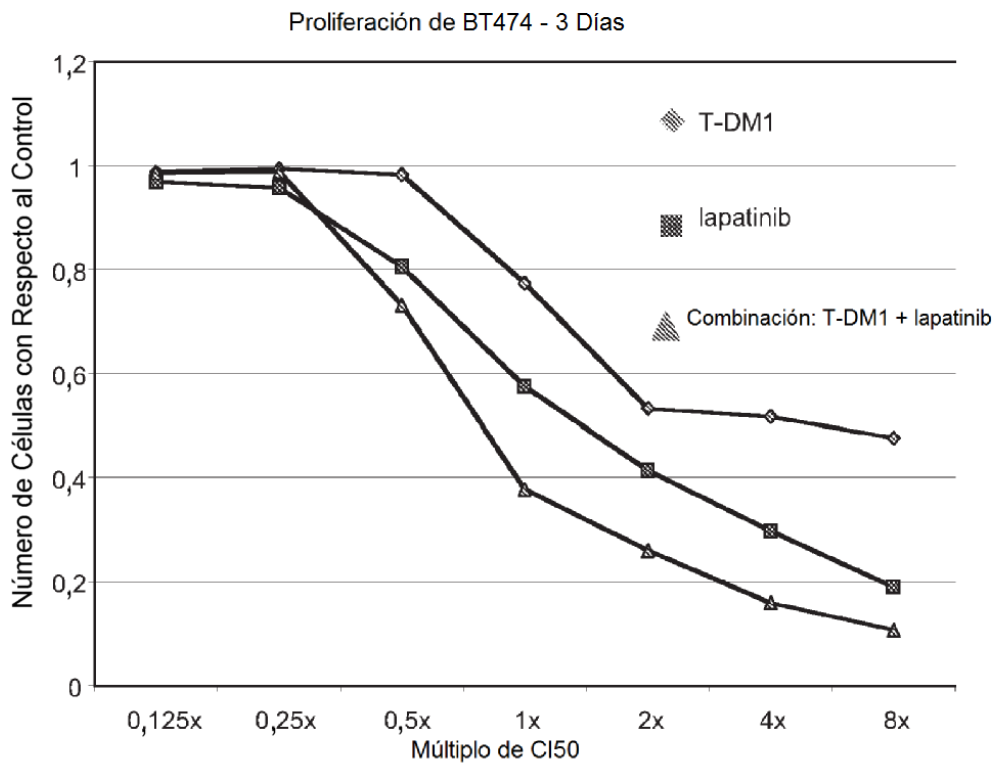


Figura 8a

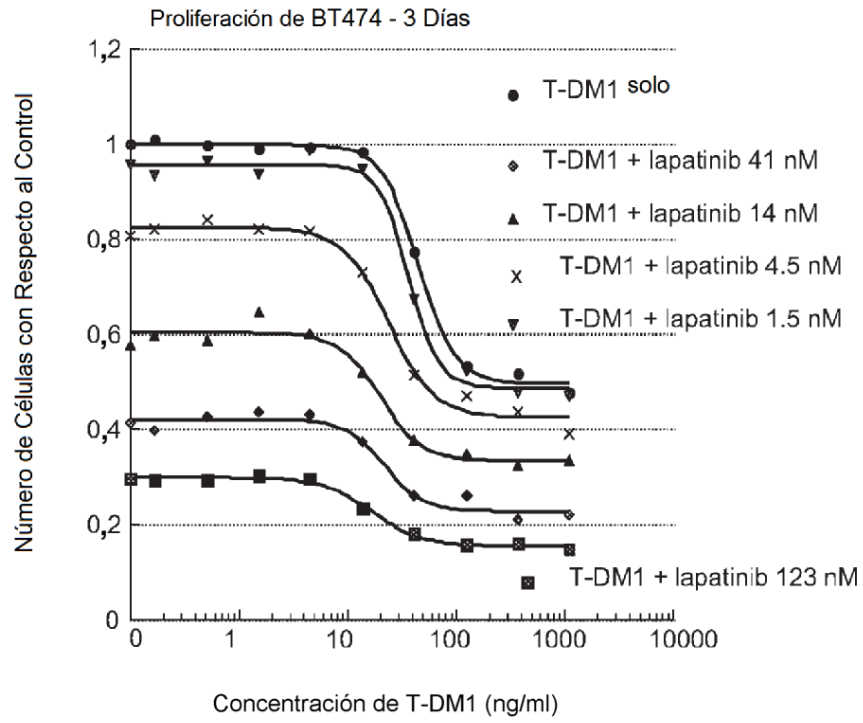


Figura 8

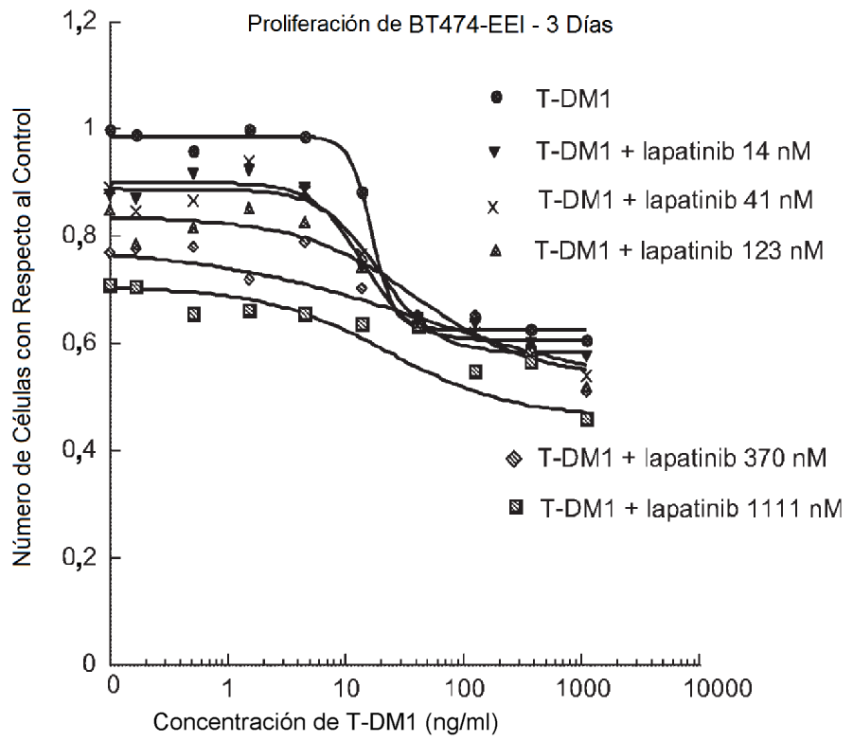


Figura 9

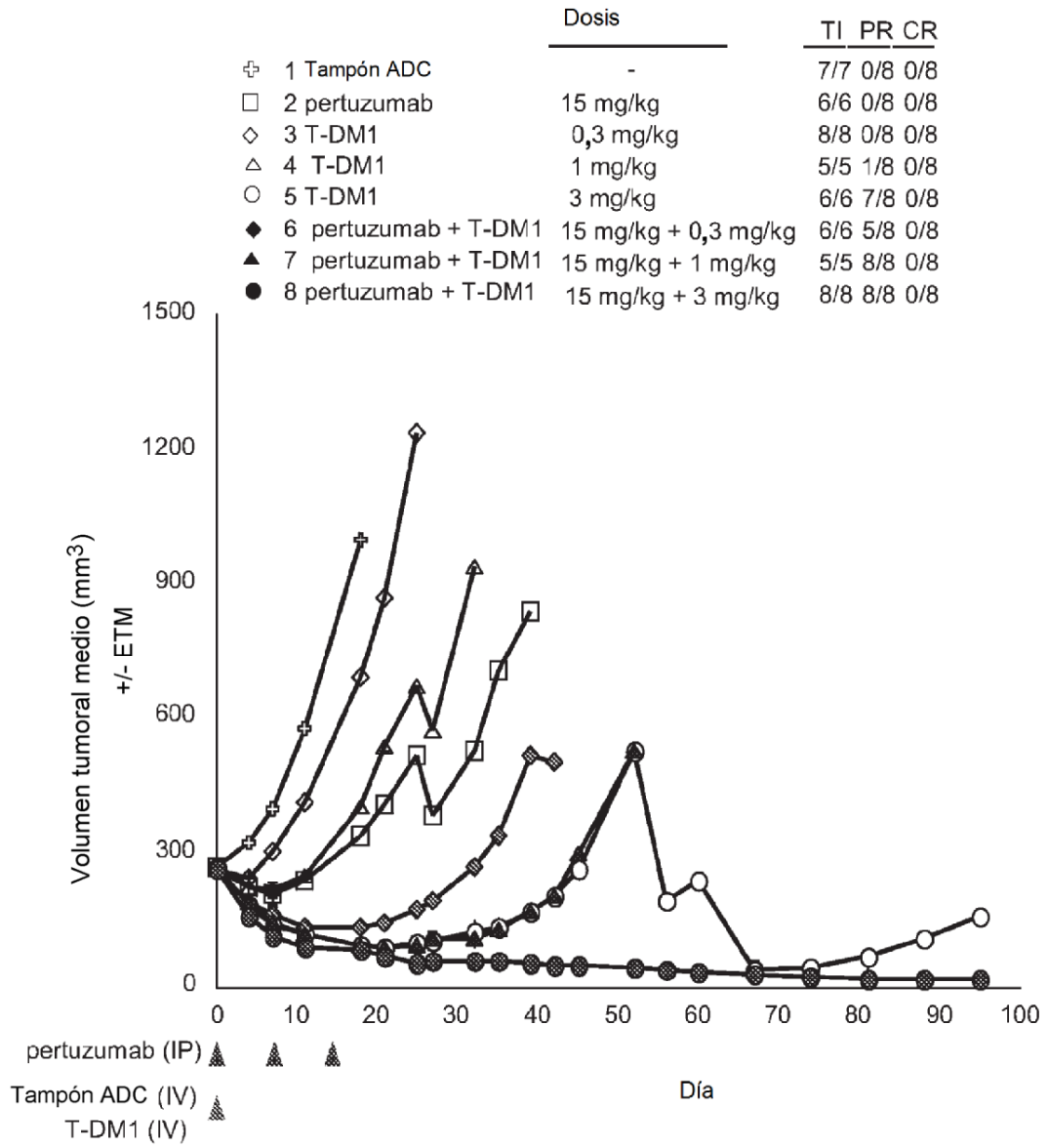


Figura 10

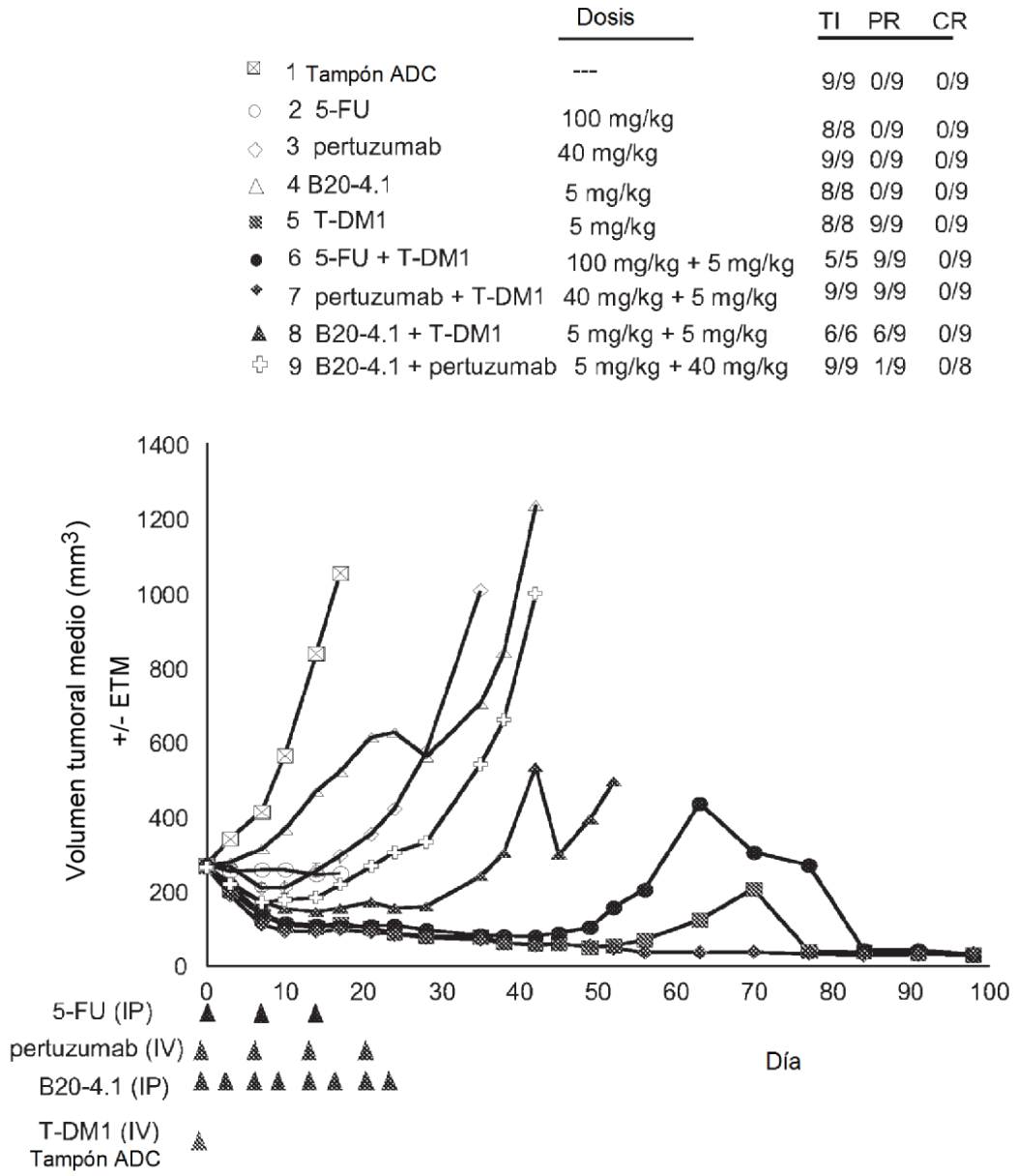


Figura 11

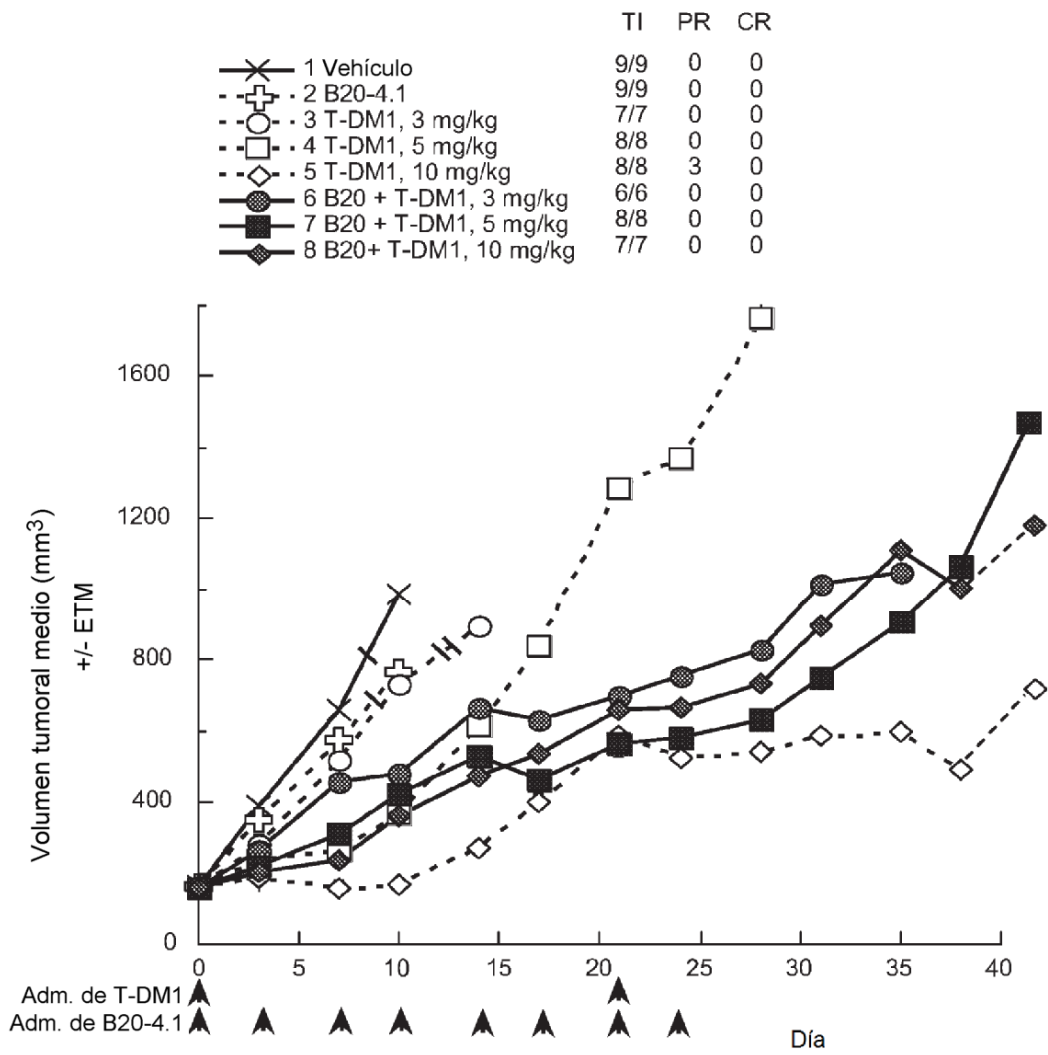


Figura 12



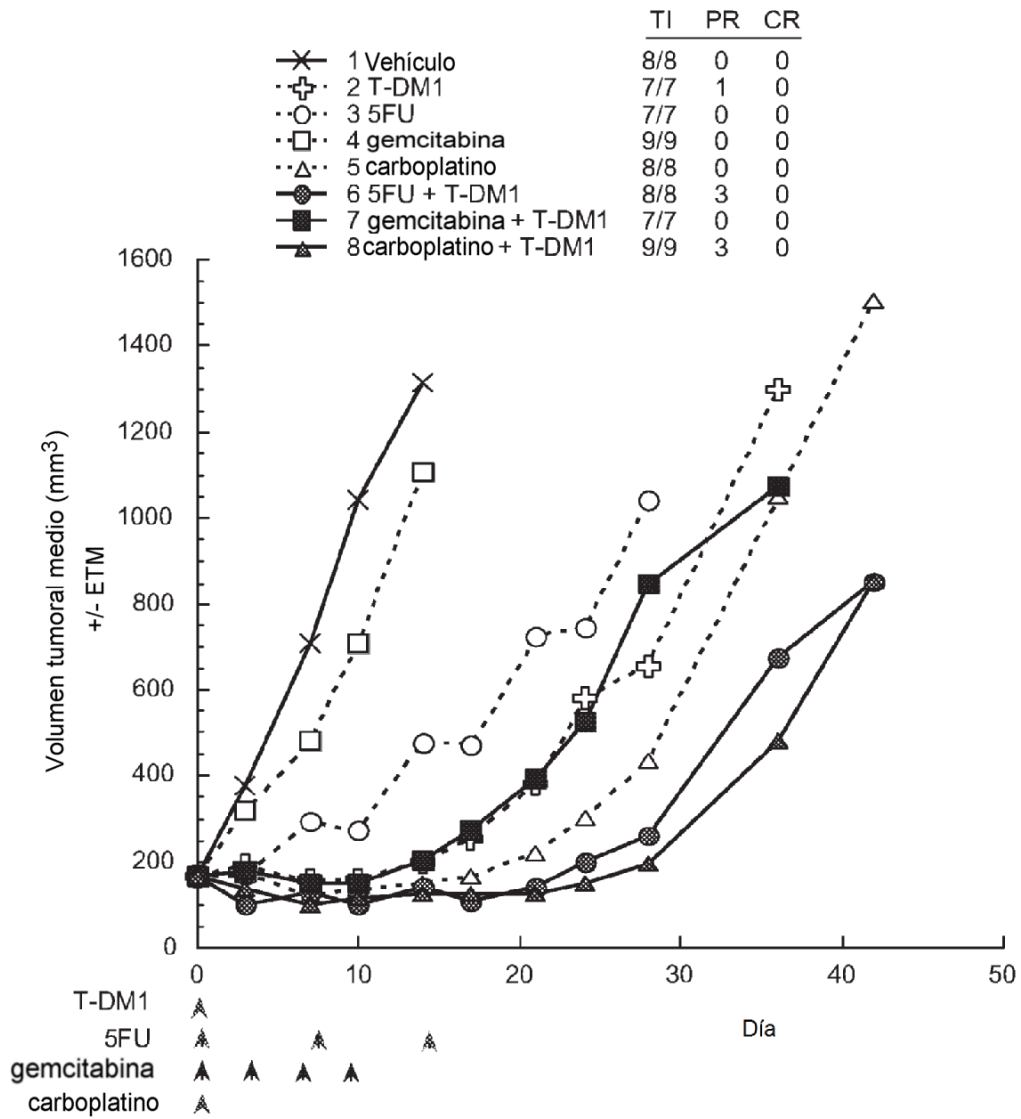


Figura 13

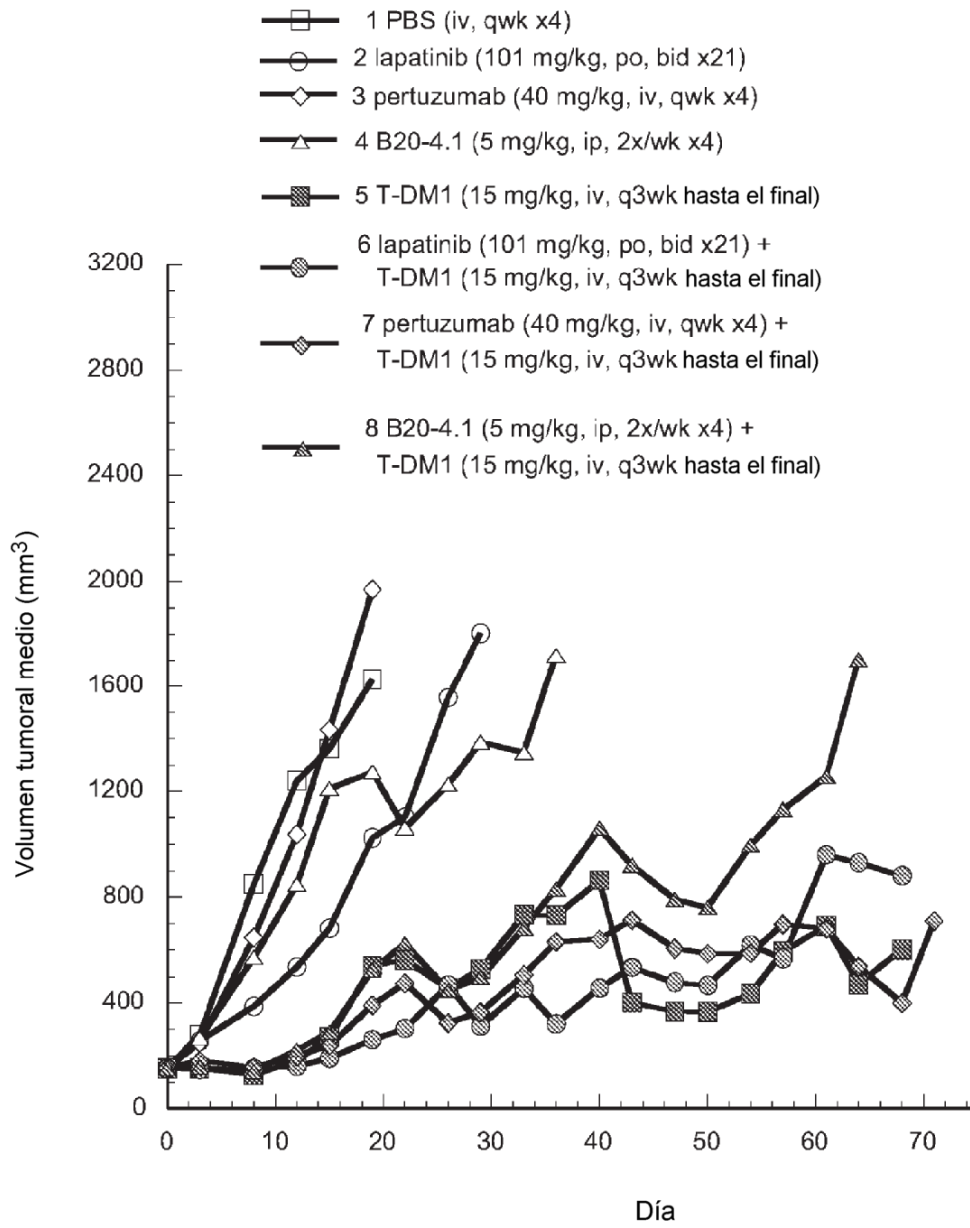


Figura 14

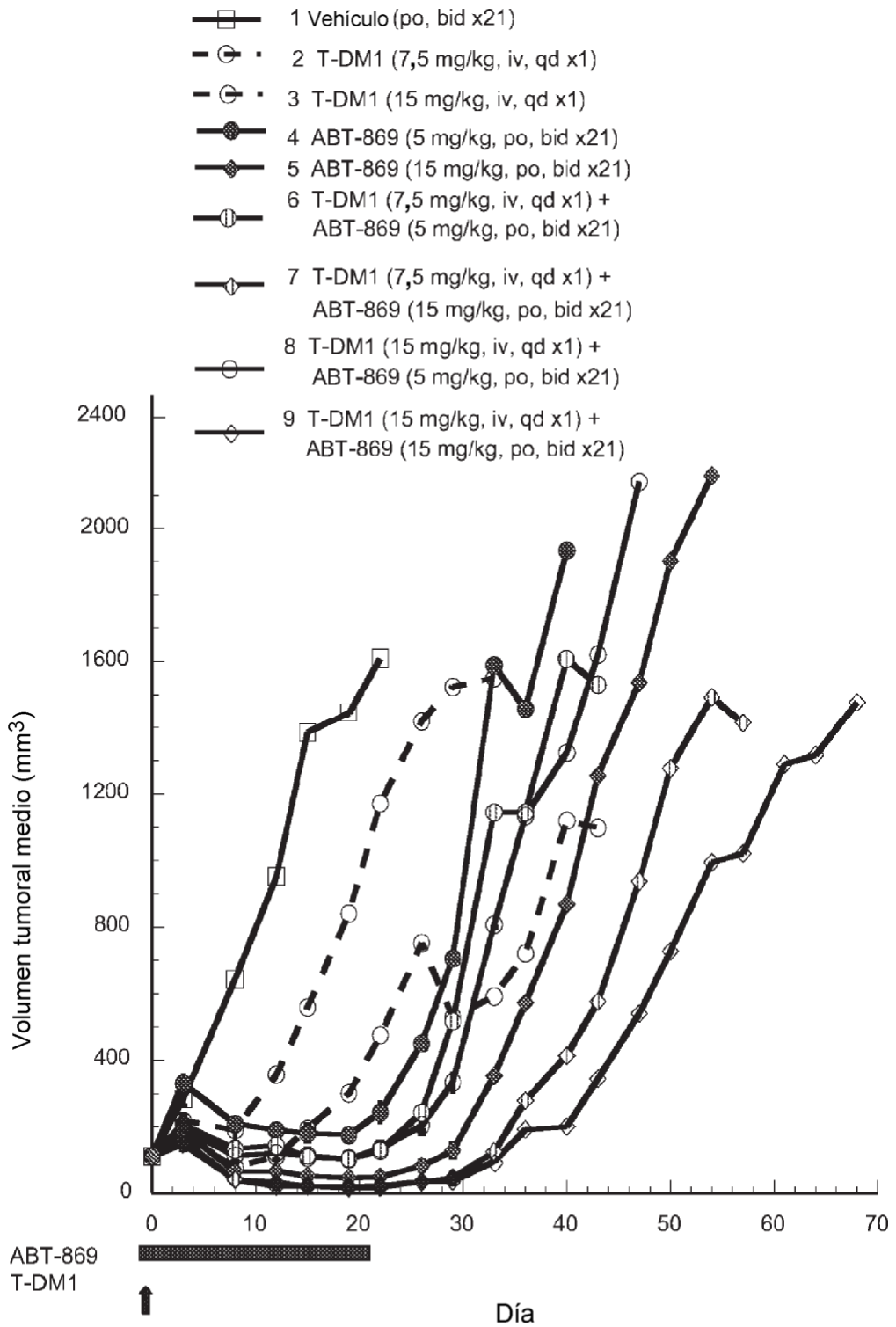


Figura 15

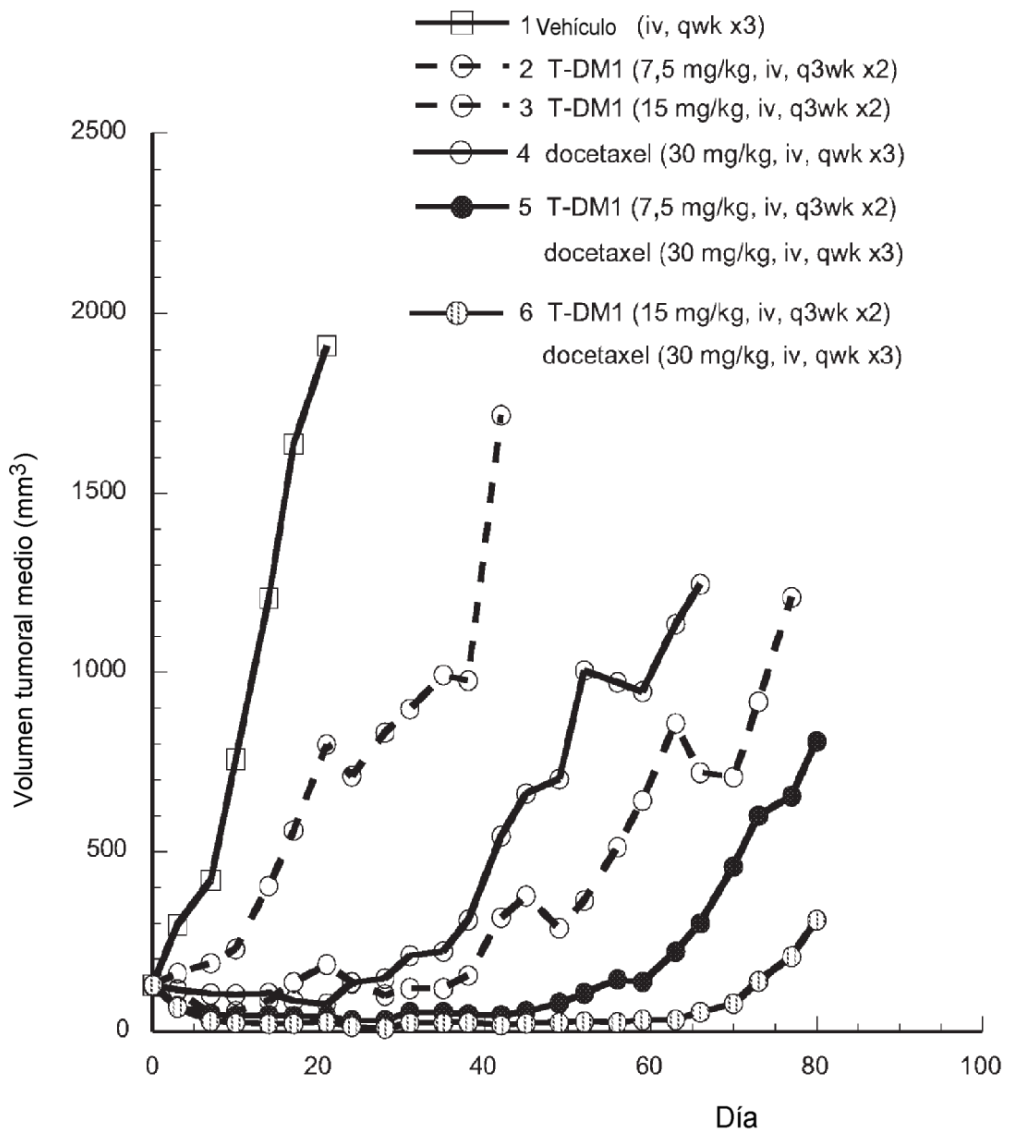


Figura 16

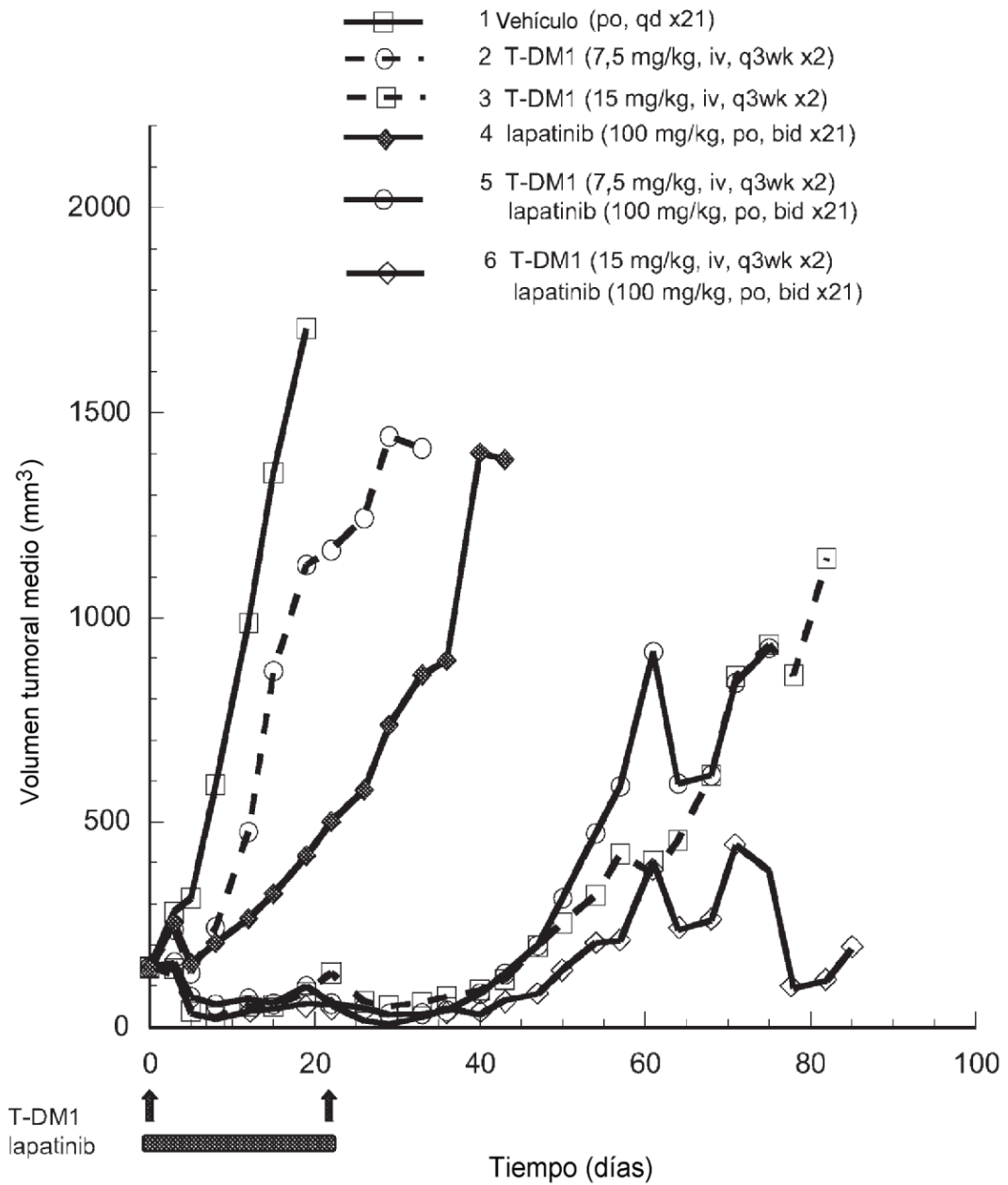


Figura 17

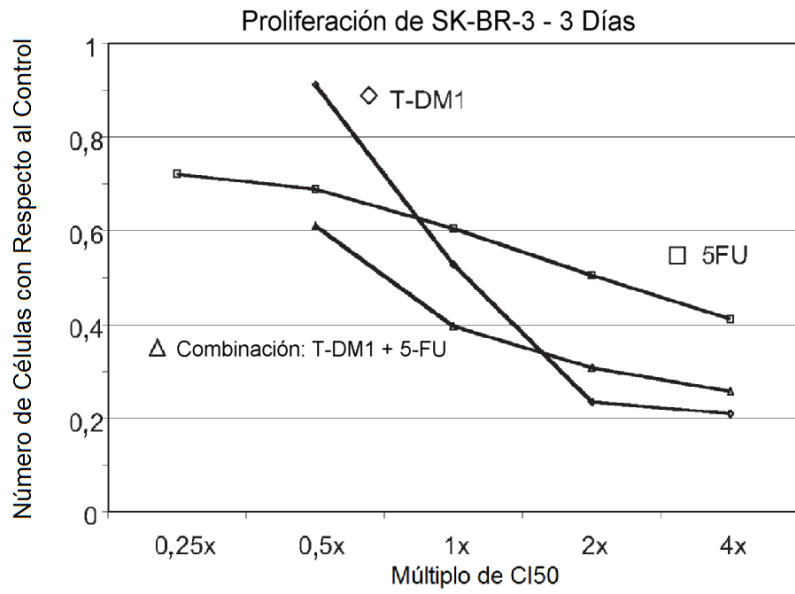


Figura 18

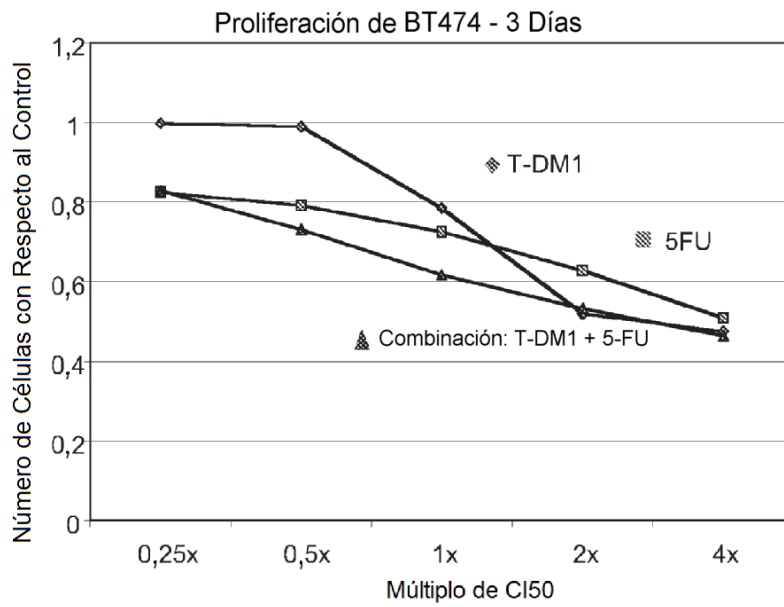
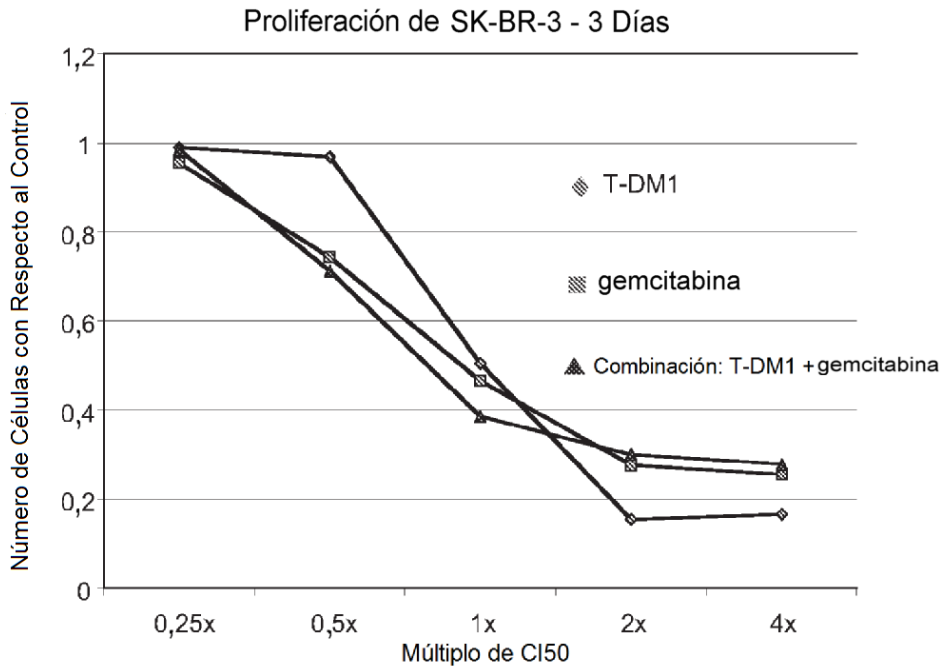
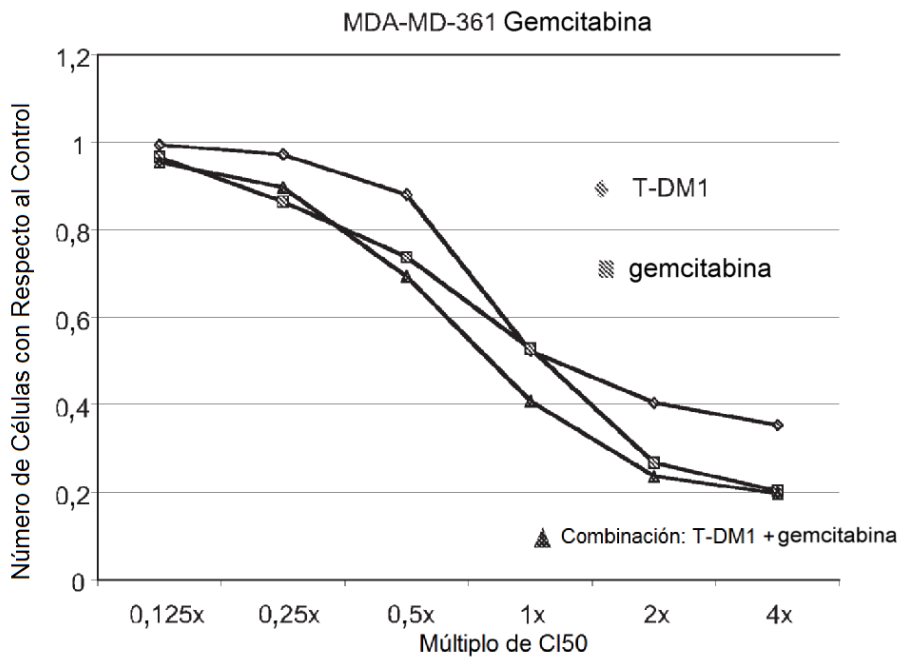


Figura 19



**Figura 20**



**Figura 21**

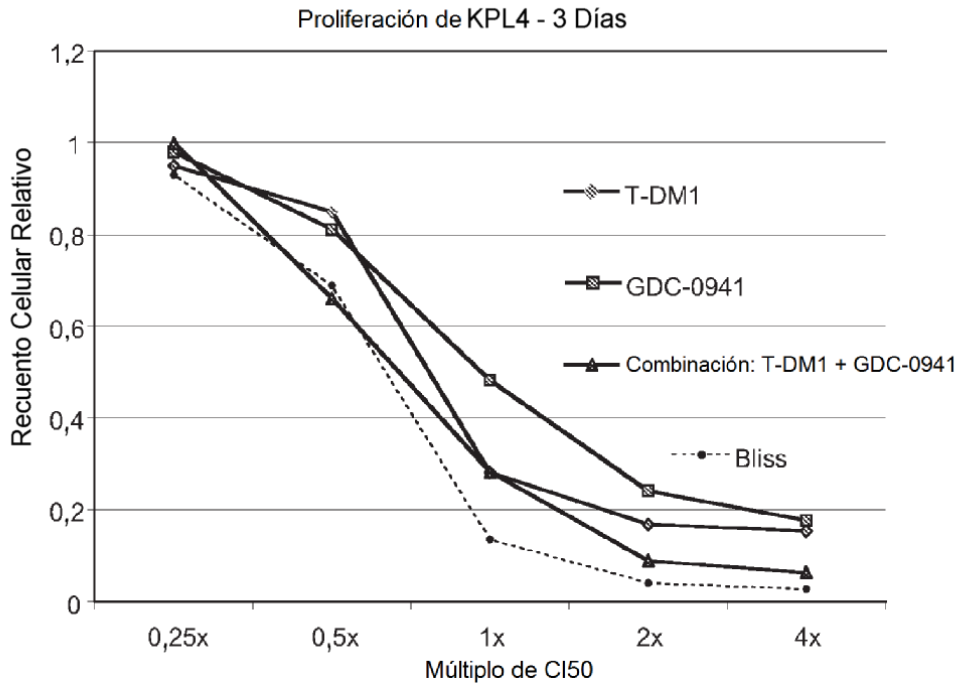


Figura 22

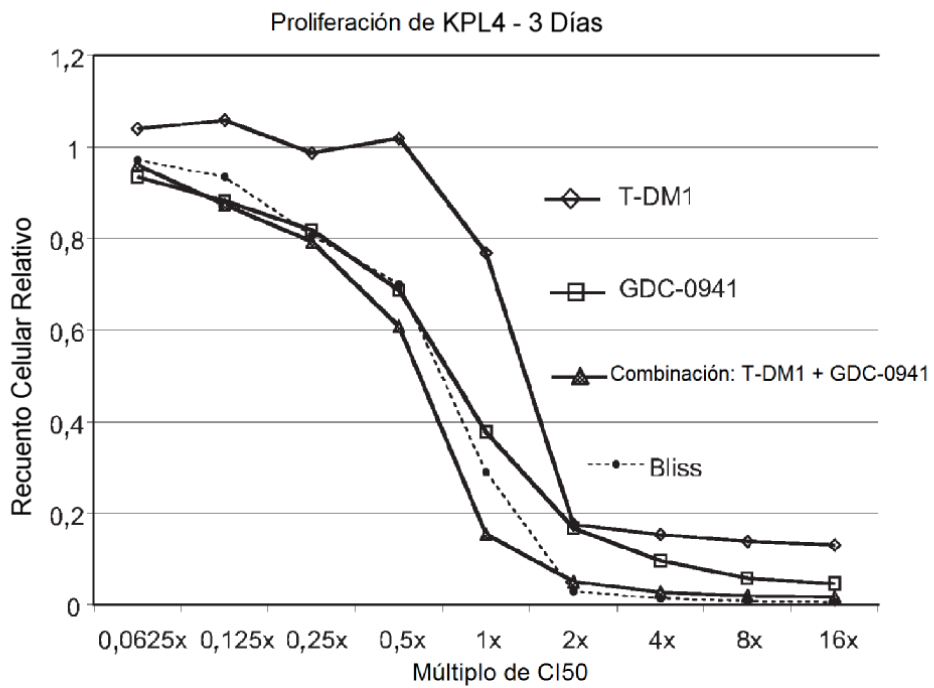


Figura 23



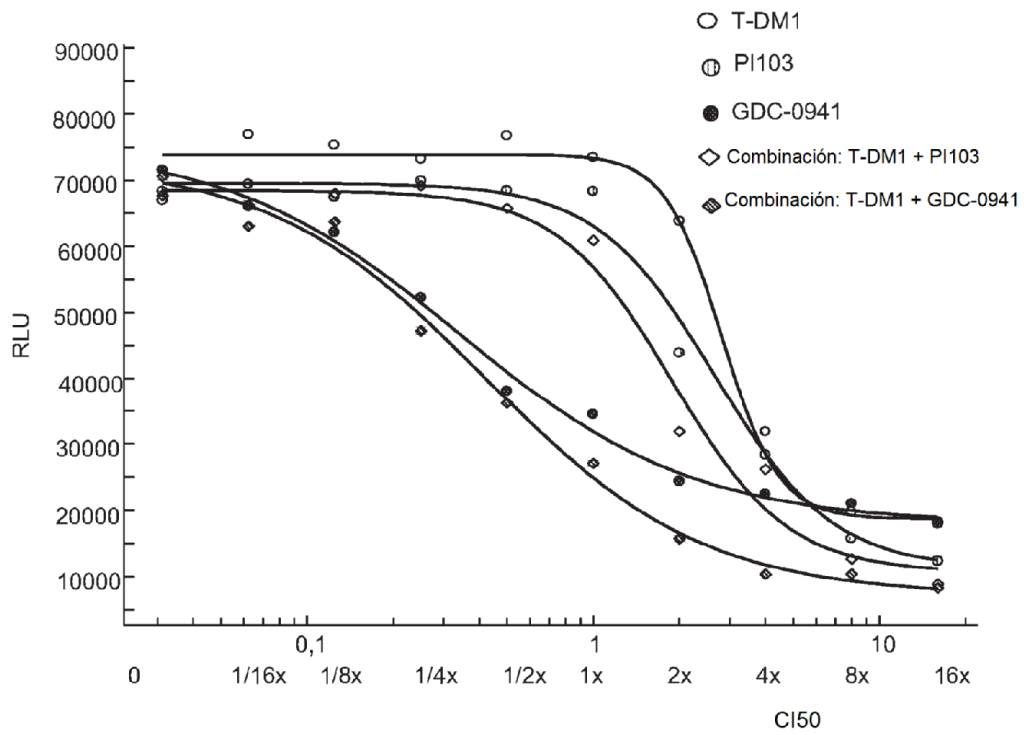


Figura 24

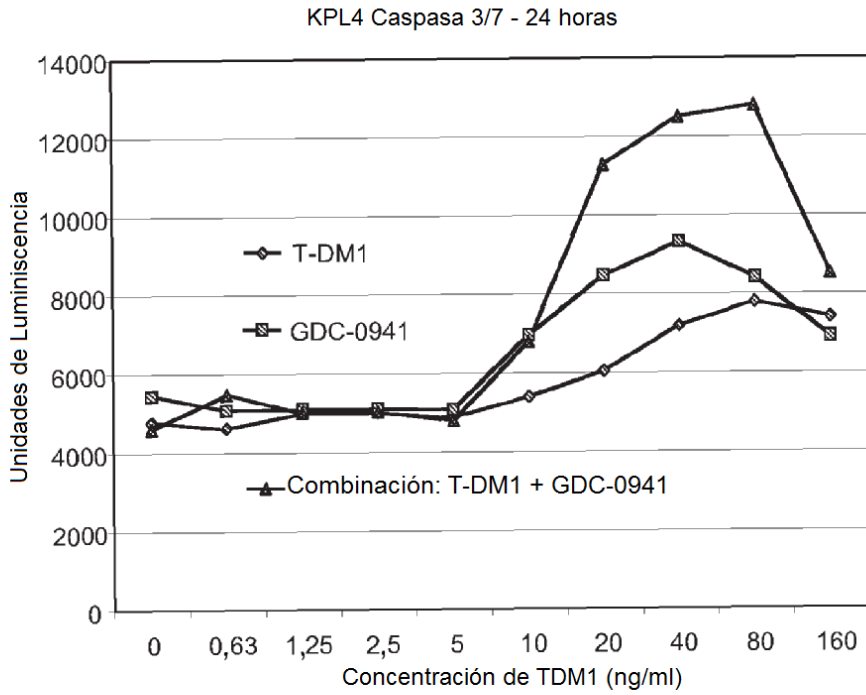


Figura 25

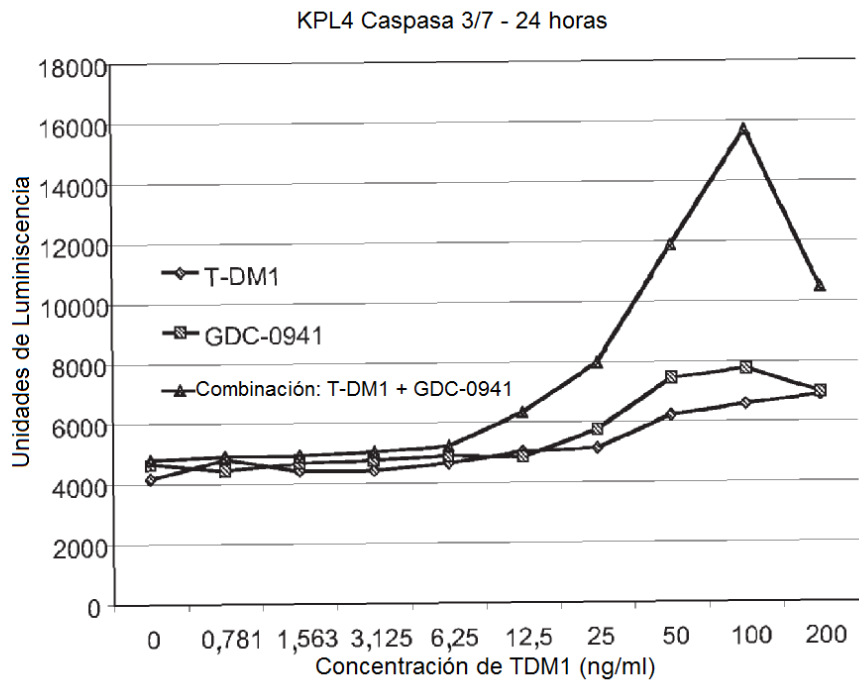


Figura 26

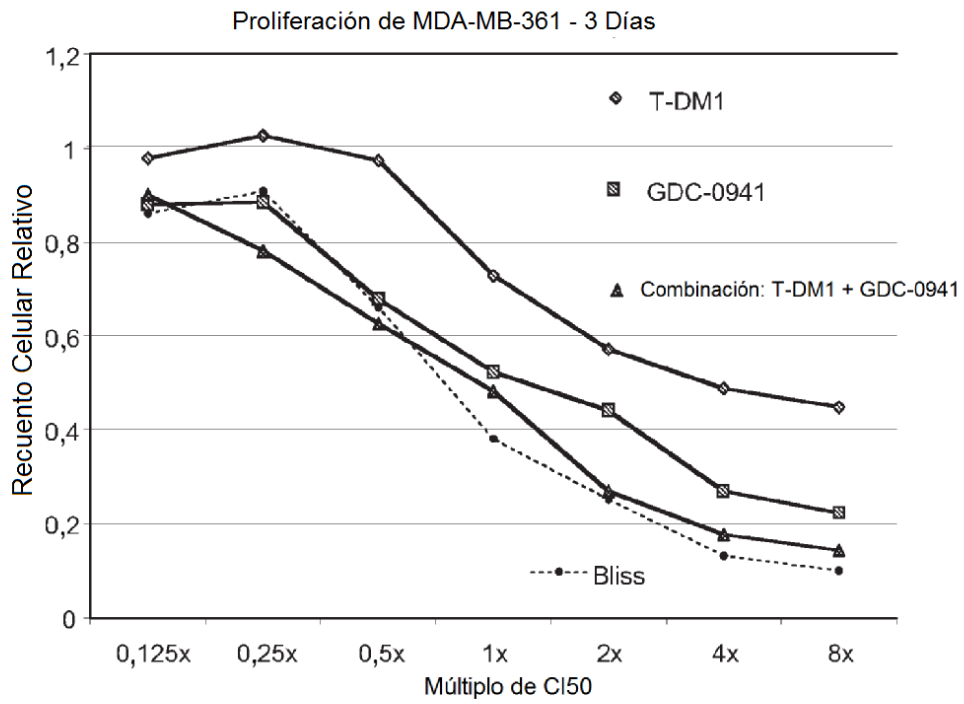


Figura 27

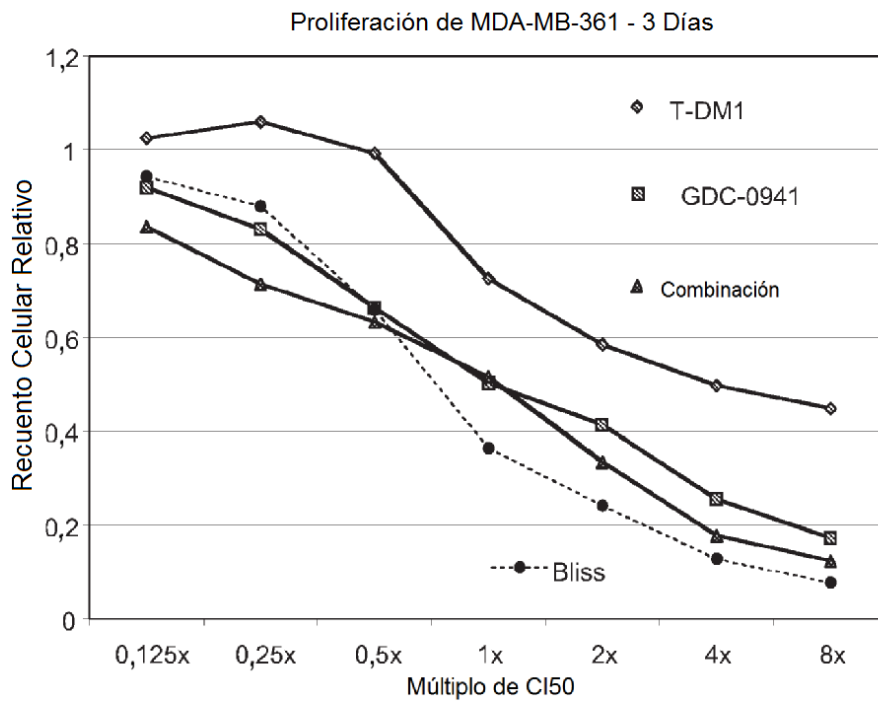


Figura 28

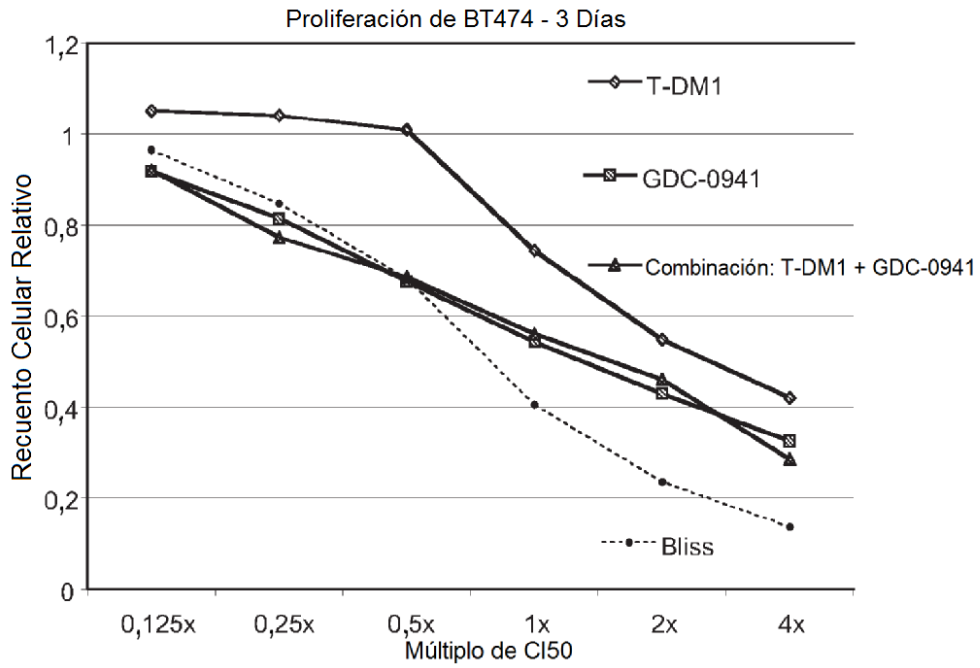


Figura 29

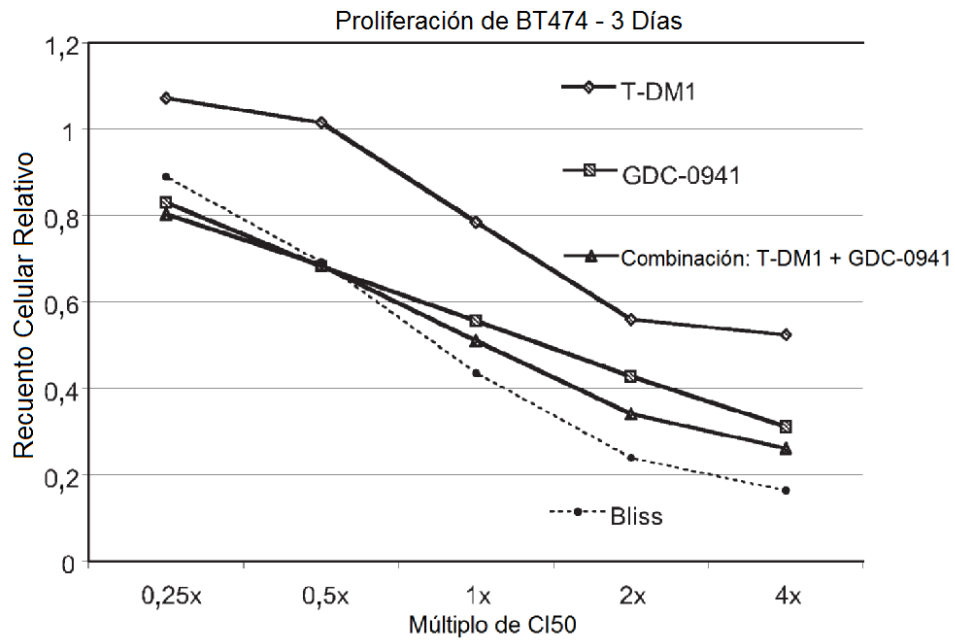


Figura 30

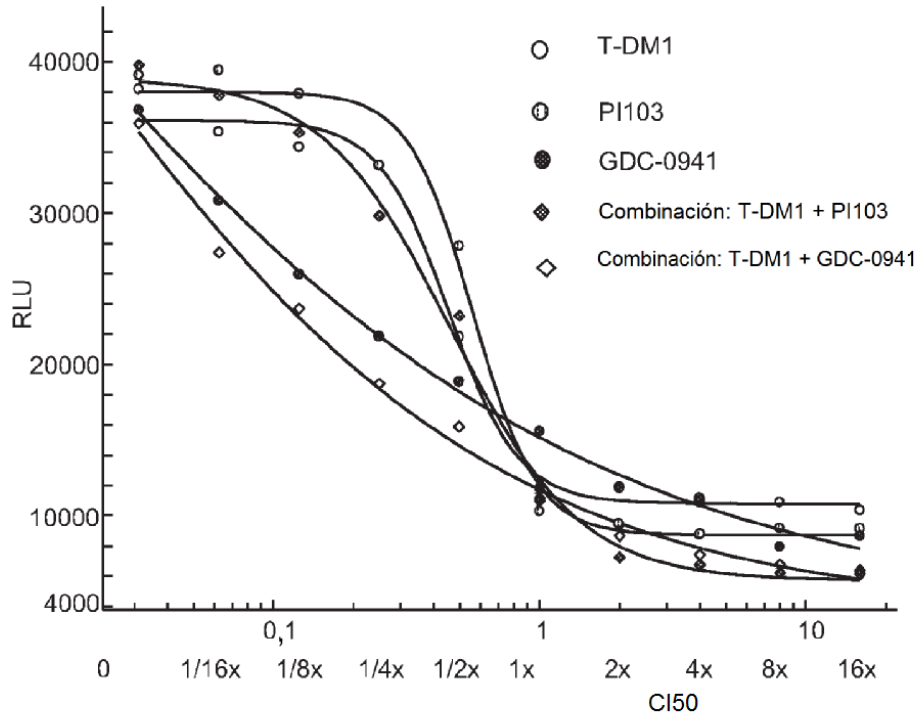


Figura 31

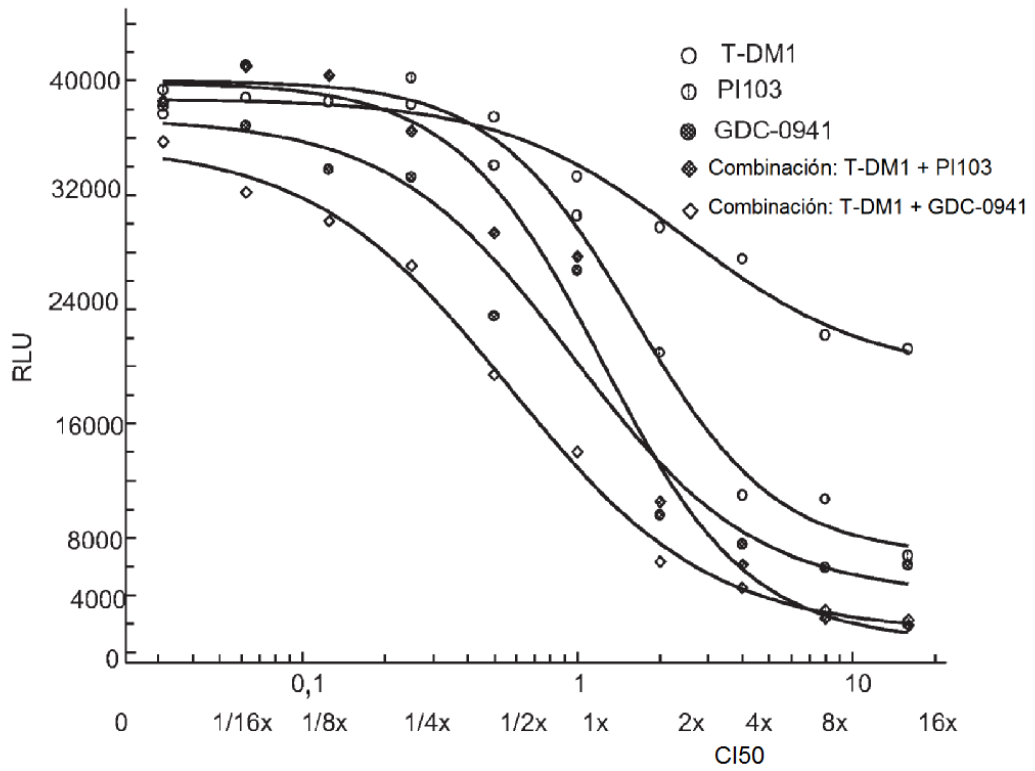


Figura 32

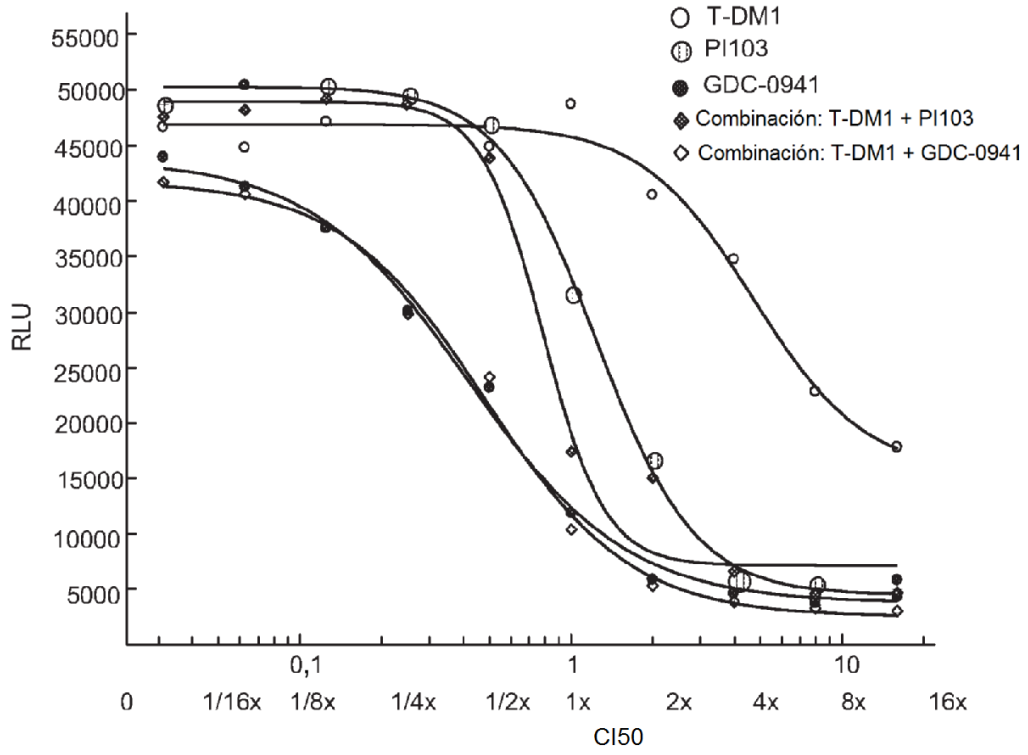


Figura 33

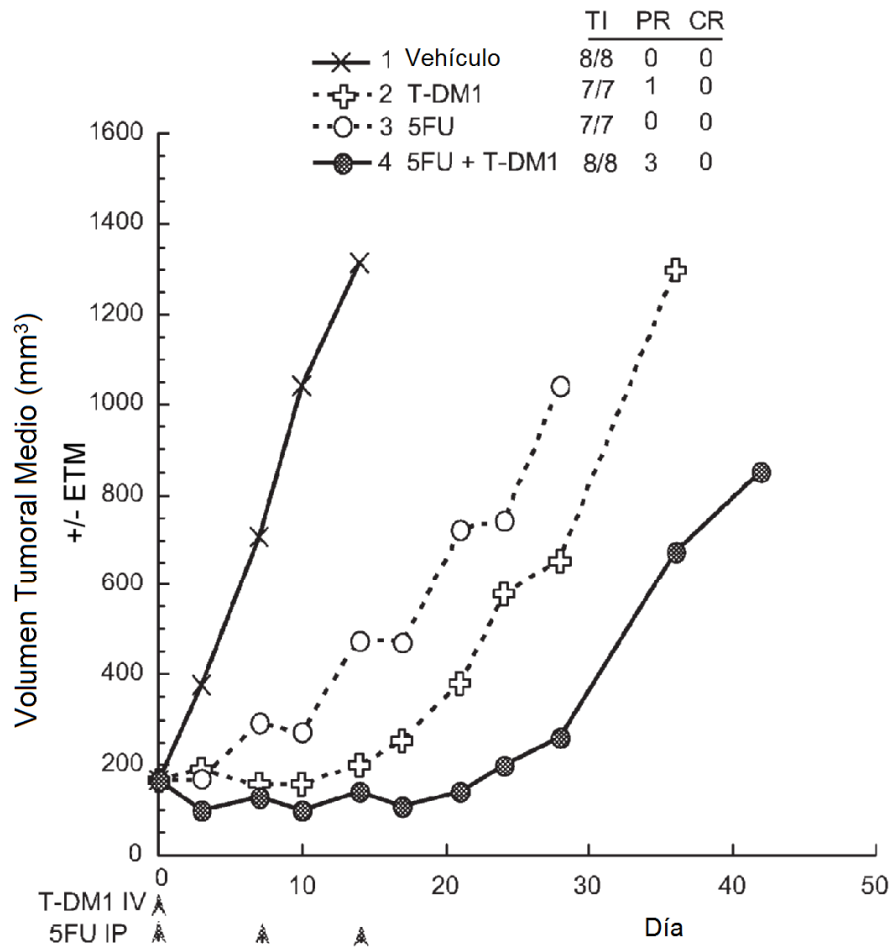


Figura 34

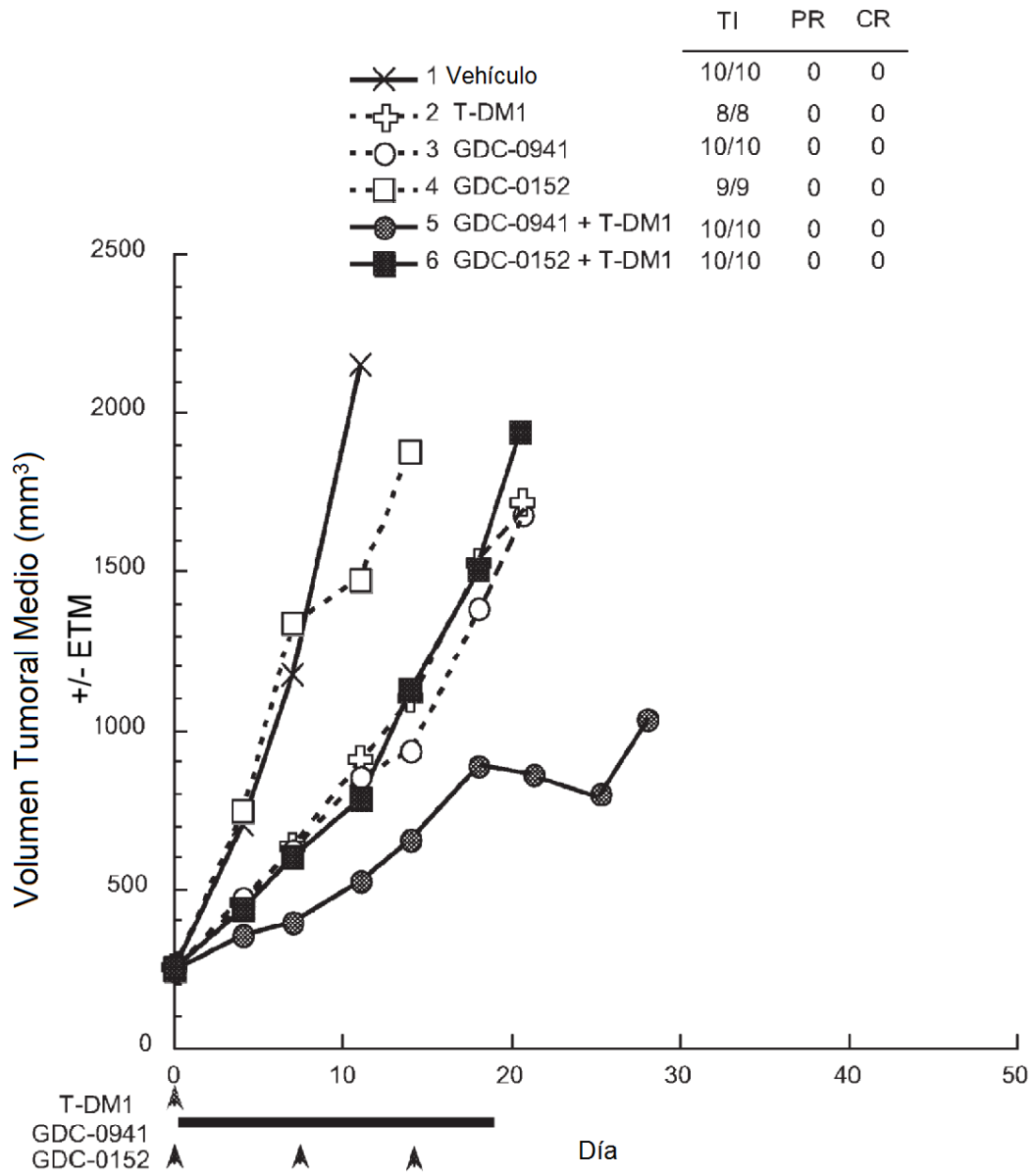


Figura 35



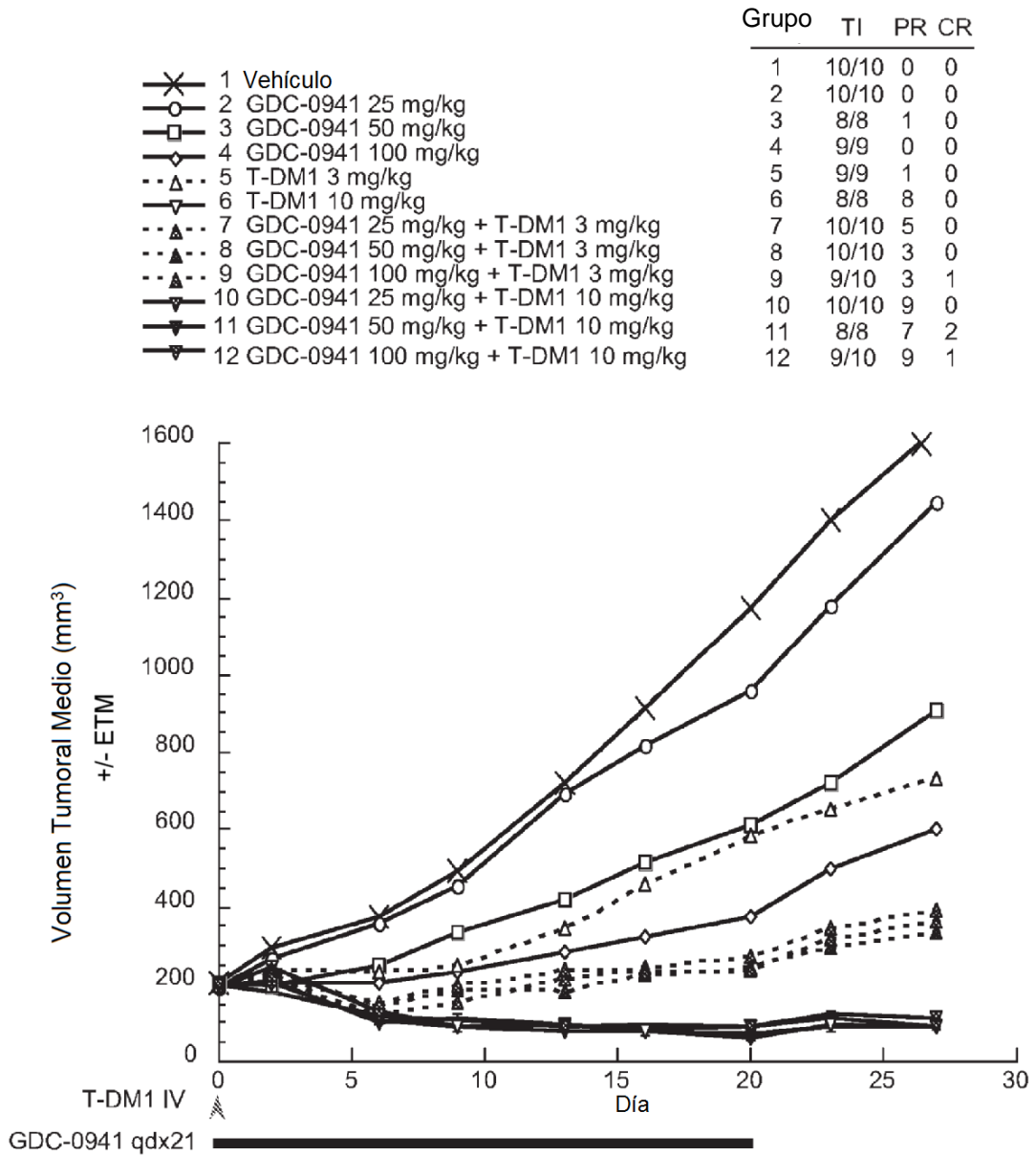


Figura 36

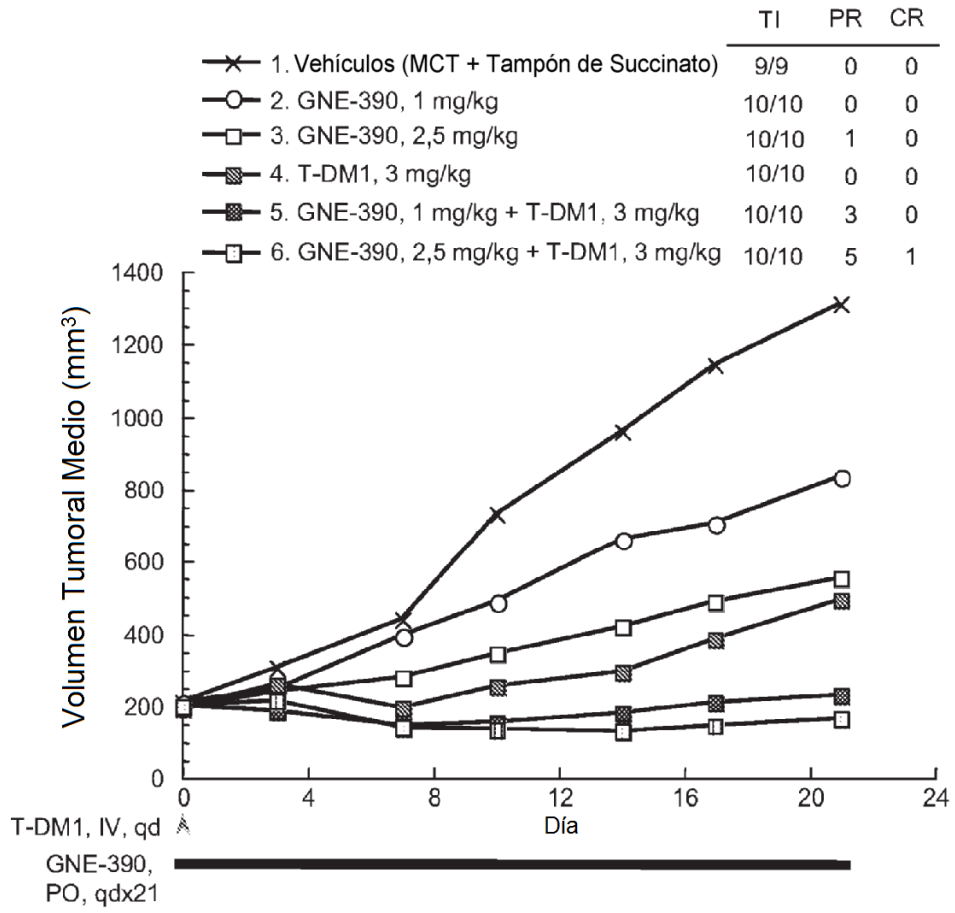


Figura 37