(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 629 405**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/337 (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 13158350 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2644194**

(54) Título: **Combinaciones de un conjugado de fármaco-anticuerpo anti-HER2 y docetaxel**

(30) Prioridad:

18.03.2008 US 37410 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2017

(73) Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco CA 94080-4490, US

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

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 fármaco-anticuerpo anti-HER2 y docetaxel

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

La presente solicitud no provisional presentada a tenor de 37 CFR §1.53(b), reivindica el beneficio a tenor de 35 USC §119(e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos con N.º de Serie 61/037.410 presentada el 18 de marzo de 2008.

Campo de la invención

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

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 Nº 5677171; documento de Patente de Estados Unidos Nº 5821337; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6054297; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6165464; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6339142; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6407213; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6639055; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6719971; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6800738; documento de Patente de Estados Unidos Nº 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, 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 doxorrubicina, 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 maitansinoides unido al anticuerpo de cáncer de mama murino anti-HER2, TA.1, a través del conector de MCC, era 200 veces menos potente que el conjugado correspondiente con un conector de disulfuro (Chari *et al*., (1992) Cancer Res. 127-133). Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) formados por el maitansinoide, DM1, unido al trastuzumab muestran una actividad antitumoral potente en líneas de células tumorales sensibles y resistentes al trastuzumab que sobreexpresan HER2 y modelos de xenoinjerto de cáncer humano. En la actualidad, el trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) está experimentando una evaluación ensayos clínicos en fase II en pacientes cuya enfermedad es resistente a las terapias dirigidas a HER2 (Beeram *et al*., (2007) "A phase I study of trastuzumab-MCC-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, Poster 2118, 23-27 de septiembre de 2007, Barcelona; documento de Patente de Estados Unidos Nº 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993).

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

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

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

Sumario de la invención

La invención se refiere generalmente al conjugado de fármaco-anticuerpo anti-HER2, trastuzumab-MCC-DM1, administrado en combinación con docetaxel para inhibir el crecimiento de células que expresan ErbB2. Ciertas combinaciones de trastuzumab-MCC-DM1 y un agente quimioterapéutico muestran efectos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. Las combinaciones de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de cancer que expresan ErbB2. Las combinaciones pueden inhibir el crecimiento tumoral en mamíferos y pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona incluye una combinación terapéutica como una conformación combinada o mediante alternancia a un mamífero, en la que la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1, y una cantidad terapéuticamente eficaz de docetaxel.

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

La invención también se refiere a combinaciones en las que la combinación terapéutica da como resultado un efecto sinérgico.

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

Otro aspecto de la invención proporciona combinaciones para el tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2, que comprende la administración a un mamífero con necesidad de un tratamiento de este tipo de cantidades eficaces de trastuzumab-MCC-DM1 y docetaxel. Trastuzumab-MCC-DM1 y docetaxel se pueden co-formular para su administración en una combinación como una formulación farmacéutica o se pueden administrar por separado en alternancia (dosificaciones secuenciales, alternas) como una combinación terapéutica. En una realización, el T-DM1 se administró mediante infusión y el agente quimioterapéutico se administra por vía oral.

La presente divulgación también proporciona métodos para predecir las combinaciones de fármacos eficaces para eficacia *in vivo* en los que las combinaciones incluyen trastuzumab-MCC-DM1 y un agente quimioterapéutico, de evolución esperada, anticáncer. Los datos de eficacia de experimentos de proliferación celular *in vitro* y de xenoinjerto de tumor *in vivo* se analizan de forma cuantitativa y de forma cualitativa. Los métodos de análisis cuantitativo se pueden basar en el efecto medio de Chou y Talalay e isobologramas que generan un valor del índice de combinación (IC) para indicar sinergia, antagonismo, o aditividad, o en la desviación del gráfico de bandas de Independencia de Bliss.

Otro aspecto de la invención es una combinación terapéutica de la invención para tratar el cáncer, modulado 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 del cáncer, modulado por HER2 en un mamífero.

Otro aspecto de la invención incluye artículos de fabricación o kits que comprenden trastuzumab-MCC-DM1, docetaxel, un envase, y opcionalmente un prospecto o etiqueta que indica un tratamiento.

La presente divulgación incluye un método para determinar compuestos para su uso en combinación para el tratamiento del cáncer que comprende: a) administrar una combinación terapéutica de trastuzumab-MCC-DM1, y un agente quimioterapéutico seleccionado entre 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 de células tumorales *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 CI_{50} de trastuzumab, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), y la combinación de trastuzumab y T-DM1.

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

La Figura 3 muestra una representación de la viabilidad celular de MDA-MB-175 *in vitro* a los 5 días con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 con respecto a diversas dosis fijas de pertuzumab en combinación con 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 con respecto a diversas dosis fijas de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) en combinación con 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 con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 con respecto 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 con respecto 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 con respecto 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 con respecto 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 con respecto 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 el panículo adiposo mamario de ratones SCID beige (3 millones de células en matrigel por ratón) después de dosificación con: (1) tampón de 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 de ADC y T-DM1 se dosificaron una vez en el día 0. El 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 el panículo adiposo mamario de ratones SCID beige (3 millones de células en matrigel por ratón) después de dosificación con: (1) tampón de 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 de 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 de ADC y T-DM1 se dosificaron una vez en el día 0 mediante una sola inyección iv. El pertuzumab se dosificó en los días 0, 7, 14, 21 (qwk x4. El 5-FU se dosificó en los días 0, 7 y 14 (qwk x3). El B20-4.1 se dosificó en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24 (2X/wk x8 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 el panículo adiposo mamario de ratones CRL nu/un después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 de ADC y T-DM1 se dosificaron en los días 0 y 21. El B20-4.1 se dosificó en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 y 24 (2X/wk x4 para 8 en total).

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 el panículo adiposo mamario de ratones CRL nu/un después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 de ADC, T-DM1 y carboplatino se dosificaron en el día 0; una sola inyección. El 5-FU se dosificó en los días 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 MMTV-Her2 Fo5 inoculados en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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.

La Figura 15 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 Figura 16 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de 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

La Figura 17 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de 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 de SK-BR-3 *in vitro* a los 3 días con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 µM) 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 µM) 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 µM) 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 µM) 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 µM) 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 µM) 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 tumor transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu después de 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 mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu después de la dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (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

A continuación se hará referencia con detalle a ciertas 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 que se describen el presente documento, que se podrían usar en la práctica de la presente invención.

DEFINICIONES

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

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

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

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

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

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Algunas clases de quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: agentes de alquilación, antimetabolitos, alcaloides vegetales con actividad 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 Nº 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS Nº 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS Nº 15663-27-1), carboplatino (CAS Nº 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-pentazabiciclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS Nº 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 doxorrubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, y rapamicina.

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de MEK, Exelixis, documento de patente WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore 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), Ionafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas con ingeniería de albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, 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, carbocuona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida 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; espongistatina; 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 ranimnustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma1I, caliqueamicina omegaI1 (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 enediína), aclacinomisinas, 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), epirrubicina, esorrubicina, 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 denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; agentes reforzadores del ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; 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; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mencionados anteriormente.

En la definición de "agente quimioterapéutico" también se incluyen: (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos y modulador selectivos de receptores de estrógenos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de la proteína quinasa tales como inhibidores MEK (documento de patente WO 2007/044515); (v) inhibidores de quinasa lípida; (vi) oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, por ejemplo, PKC-alfa,

Raf y H-Ras, tal como oblimersén (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas para terapia genética, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; 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 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 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 hidroxiácido, 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.

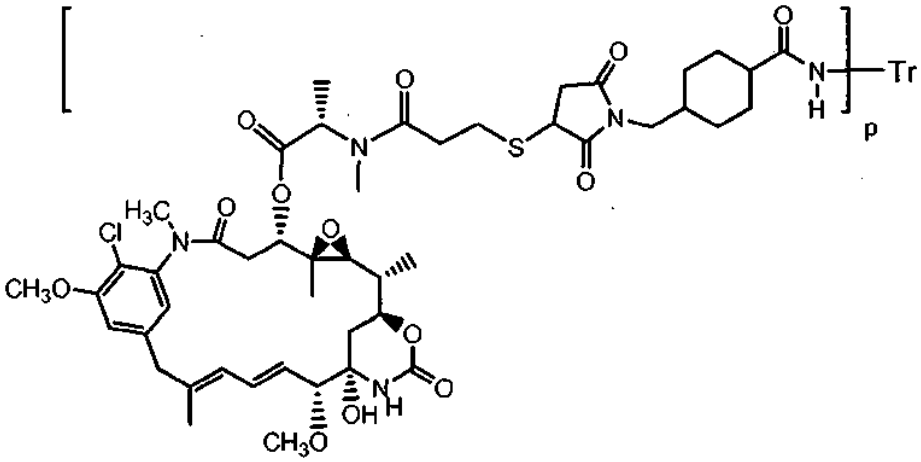
La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser químicamente y/o toxicológicamente compatible, con los otros ingredientes que comprenden una formulación, y/o el mamífero que se está tratando con los mismos.

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

TRASTUZUMAB-MCC-DM1

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



en la que Tr es trastuzumab, unido mediante un resto conector MCC, al resto del fármaco maitansinoide, DM1 (documento de Patente de Estados Unidos Nº 5208020; documento de Patente de Estados Unidos Nº 6441163). La proporción del fármaco a anticuerpo o carga del fármaco se representa mediante p en la estructura de trastuzumab-MCC-DM 1 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 Nº 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993). El trastuzumab-MCC-DM1 se puede preparar de acuerdo con el Ejemplo 1.

El trastuzumab se produce mediante un cultivo en suspensión de células de mamífero (Ovario de Hámster Chino, CHO). El proto-oncogén HER2 (o c-erbB2) codifica una proteína receptora de transmembrana de 185 kDa, que está relacionada de forma estructural con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. La sobreexpresión de la proteína HER2 se observa en un 25 %-30 % de cánceres de mama primarios y se puede determinar usando una evaluación basada en inmunohistoquímica de bloques de tumores fijos (Press MF, *et al*., (1993) Cancer Res 53: 4960-70. El trastuzumab es un anticuerpo que tiene restos de unión a antígeno de, o derivados, del anticuerpo 4D5 murino (CRL 10463 de la ATCC, depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 en el Tratado de Budapest el 24 de mayo de 1990). Algunos anticuerpos 4D5 humanizados a modo de ejemplo incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) tal como en documento de Patente de Estados Unidos Nº 5821337.

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

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

Ciertos agentes quimioterapéuticos han demostrado propiedades sorprendentes e inesperadas en combinación con trastuzumab-MCC-DM1 en la inhibición de la proliferación celular *in vitro* e *in vivo*. Tales agentes quimioterapéuticos 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 incluida en el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada en la actualidad.

El 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 de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 6054297; US 6407213; US 6800738; US 6627196, US 6949245; US 7041292). Pertuzumab y trastuzumab se dirigen a diferentes regiones extracelulares del receptor de tirosina quinasa HER-2 (Nahta *et al* (2004) Cancer Res. 64: 2343-2346). La línea de células de hibridoma que expresa 2C4 (pertuzumab) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA como ATCC HB-12697 el 8 de abril de 1999. El 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 de Patente de Estados Unidos N. US 6949245). En las células cancerosas, la interferencia con la capacidad de HER2 para colaborar con otros receptores de la familia HER bloquea la señalización celular y por último puede conducir a la inhibición del crecimiento de células cancerosas y a la muerte de la célula cancerosa. Los HDI, debido a su modo de acción único, tienen el potencial de trabajar en una amplia diversidad de tumores, incluyendo los que no sobreexpresan HER2 (Mullen *et al* (2007) Molecular Cancer Therapeutics 6: 93-100).

El pertuzumab se basa en las secuencias de armazón de la IgG1 (K) humana. Consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Al igual que el trastuzumab, el pertuzumab se dirige contra el dominio o extracelular de HER2. Sin embargo, se diferencia del trastuzumab en las regiones de unión al epítopo de la cadena ligera y de la cadena pesada. Como resultado, el pertuzumab se une a un epítopo dentro de lo que se conoce como un subdominio 2 de HER2, mientras que el epítopo del trastuzumab se localiza en el subdominio 4 (Cho *et al*. 2003; Franklin *et al*. 2004). El pertuzumab actúa bloqueando la asociación de HER2 con otros miembros de la familia HER, incluyendo a HER1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGFR), HER3, y HER4. Esta asociación se requiere para la señalización en presencia de ligando a través de MAP-quinasa y PI3-quinasa. Como resultado, el pertuzumab inhibe la señalización intracelular iniciada por ligando. La inhibición de estas rutas de señalización puede dar como resultado una parada del crecimiento y apoptosis, respectivamente (Hanahan y Weinberg 2000). Dado que pertuzumab y trastuzumab se unen a distintos epítopos en el receptor HER2, la señalización corriente abajo activada por ligando se bloquea con pertuzumab pero no con trastuzumab. Por lo tanto, el pertuzumab puede no requerir la sobreexpresión de HER2 para ejercer su actividad como un agente antitumoral. Además, debido a sus modos de acción complementarios, la combinación de pertuzumab y T-DM1 puede tener un papel potencial enfermedades que sobreexpresan HER2.

El pertuzumab se ha evaluado como un solo agente en cinco estudios en Fase II realizados en diversos tipos de cáncer, incluyendo MBC que expresa niveles bajos de HER2, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de próstata resistente a hormonas, y cáncer de ovarios. Un ensayo en Fase II evaluó al pertuzumab como un agente solo en el tratamiento de segunda o tercera línea de pacientes con cáncer de mama metastásico (MBC) con una expresión normal de HER2 (Cortes *et al*. (2005) J. Clin. Oncol. 23: 3068). El pertuzumab se ha evaluado in dos estudios en 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). El primer estudio incluyó a 11 pacientes con MBC positivo para HER2 que previamente recibieron hasta tres regímenes anteriores que contenían trastuzumab (Portera *et al*. 2007).

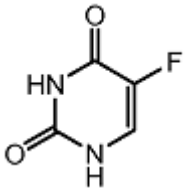
El bevacizumab (N.º de Reg. CAS 216974-75-3, AVASTIN®, Genentech) es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 7227004; US 6884879; US 7060269; US 7169901; US 7297334) usada en el tratamiento de cáncer, en el que inhibe el crecimiento del tumor mediante el bloqueo de la formación de nuevos vasos sanguíneos. El bevacizumab fue el primer inhibidor de la angiogénesis clínicamente disponible en Estados Unidos, aprobado por la FDA en 2004 para su uso en combinación con quimioterapia convencional en el tratamiento de cáncer de colon metastásico en la mayoría de las formas de cáncer de pulmón no microcítico metastásico. Se realizaron varios estudios clínicos del estadio tardío 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 ovarios metastásico, cáncer de próstata resistente a hormonas metastásico, y cáncer pancreático localmente avanzado metastásico o no extirpable.

Un anticuerpo anti-VEGF normalmente no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como P1GF, PDGF o bFGF. Los anticuerpos anti-VEGF preferentes incluyen un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido por ATCC HB 10709 de hibridoma; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al*. (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599, que incluye, pero no se limita a, bevacizumab. El bevacizumab incluye regiones marco conservadas de IgG1 humana mutada y regiones determinantes de la complementariedad de unión a antígeno a partir del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino, A.4.6.1, que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente un 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayor parte de las regiones marco conservadas, se obtiene a partir de IgG1 humana, y aproximadamente un 7 % de la secuencia se obtiene a partir del anticuerpo murino A4.6.1. El bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glicosilado. El bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen adicionalmente en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 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 epítopo funcional en epi VEGF humano que comprende los restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, y C104.

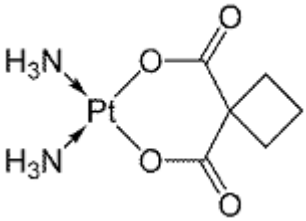
Las líneas de células de hibridoma que expresan anti-VEGF A 4.6.1 (ATCC HB 10709) y B 2.6.2 (ATCC HB 10710) se han depositado y mantenido en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard,

Manassas, VA 20110-2209 USA. El clon que expresa el polipéptido VEGF-E (documento US 6391311) codificado por la inserción de la secuencia de nucleótidos 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, USA.

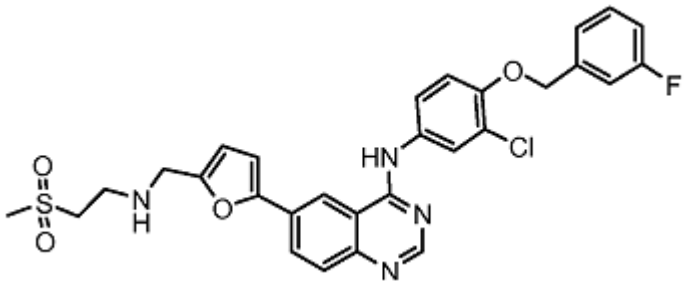
El 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, No. de Reg. CAS 51-21-8) es un inhibidor de la timidilato sintasa y se ha usado durante décadas en el tratamiento de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal y pancreático (documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 2802005, US 2885396; Barton *et al* (1972) Jour. Org. Chem. 37: 329; Hansen, R.M. (1991) Cancer Invest. 9: 637-642). El 5-FU se denomina 5-fluoro-1*H*-pirimidina-2,4-diona, y tiene la estructura:



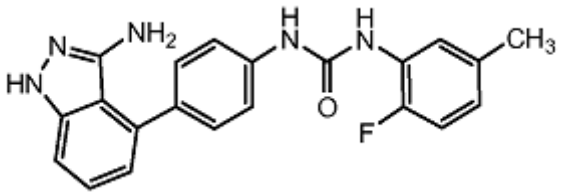
El carboplatino (No. de Reg. CAS 41575-94-4) es un fármaco quimioterapéutico usado frente al carcinoma de ovarios, cánceres de pulmón, cabeza y cuello (documento de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 4140707). El carboplatino se denomina azanida; ácido ciclobutano-1,1-dicarboxílico platino, y tiene la estructura:



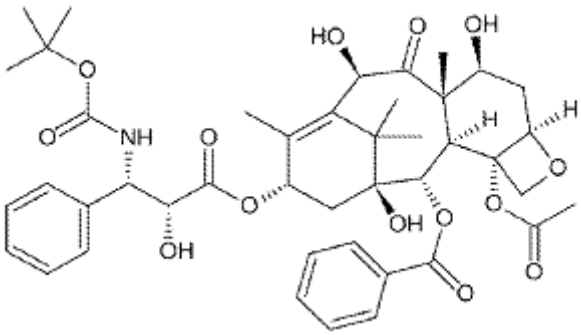
El lapatinib (No. de Reg. CAS 388082-78-8, TYKERB®, GW572016, Glaxo SmithKline) se ha aprobado para su uso en combinación con capecitabina (XELODA®, Roche) para el testamento de pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico cuyos tumores sobreexpresan HER2 (ErbB2) y que han recibido terapia anterior que incluye una antraciclina, un taxano y trastuzumab. El lapatinib es un factor de crecimiento epidérmico competitivo con ATP (EGFR) e inhibidor doble de tirosina quinasa HER2/neu (ErbB-2) (documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 6727256; US 6713485; US 7109333; US 6933299; US 7084147; US 7157466; US 7141576) que inhibe la autofosforilación y activación del receptor mediante la unión al bolsillo de unión a ATP del dominio de proteína quinasa de EGFR/HER2. El lapatinib se denomina N-(3-cloro-4-(3-fluorobenciloxi)fenil)-6-(5-((2-(metilsulfonil)etil-amino)metil)furan-2-il)quinazolin-4-amina, y tiene la estructura:



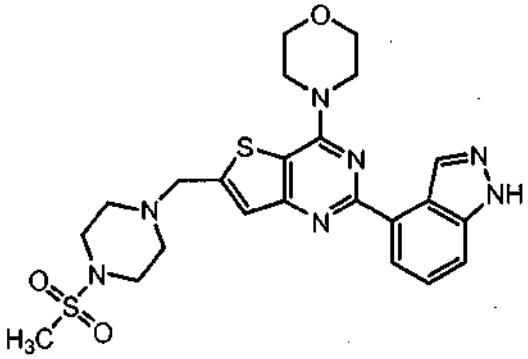
El ABT-869 (Abbott y Genentech) es un inhibidor multidirigido de tirosina quinasas receptoras de la familia de VEGF y PDGF, para el otorgamiento oral potencial de cáncer (documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 7297709; US 2004/235892; US 2007/104780). Se han iniciado ensayos clínicos, que tratan el cáncer de pulmón de no microcítico (NSCLC), carcinoma hepatocelular (HCC), y carcinoma de células renales (RCC). El ABT-869 se denomina 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:



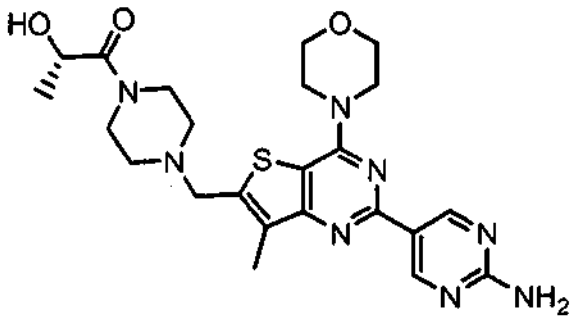
El docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis) se usa para tratar cánceres de mama, ovarios, y cánceres NSCLC (documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} US 4814470; US 5438072; US 5698582; US 5714512; US 5750561). El docetaxel se denomina (2*R* ,3*S*)- N-carboxi-3-fenilisoserina, éster de N-terc-butilo, 13-éster con 4-acetato 2-benzoato de 5,20-epoxi-1, 2, 4, 7, 10, 13-hexahidroxitax-11-en-9-ona, trihidrato (documentos US 4814470; 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 US2008/0076768; (documento de patente US 2008/0207611; Belvin *et al*., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99º: 15 de abril, Resumen 4004; Folkes *et al*., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99º: 14 de abril, Resumen LB-146; Friedman *et al*., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99º: 14 de abril, Resumen LB-110). GDC-0941, muestra una actividad sinérgica *in vitro* e *in vivo* en combinación con ciertos agentes quimioterapéuticos frente a líneas celulares de tumor sólido (documento de patente con Nº de Ser. US 12/208.227, Belvin *et al*., "Combinations Of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor Compounds And Chemotherapeutic Agents, And Methods Of Use", presentado el 10 de septiembre de 2008). El GDC-0941 se denomina 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)metil)tieno[3,2-d]pirimidin-4-il)morfolina (Nº 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 Nº 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-hidroxipropan-1-ona, y tiene la estructura:



EVALUACIÓN BIOLÓGICA

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 (IC) 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 daba como resultado una actividad antiproliferativa aditiva o sinérgica, mientras que las combinaciones con cualquiera de gemcitabina o carboplatino no tenían efecto o eran antagonistas con T-DM1. Los estudios de xenoinjerto de ratón presentaban resultados similares en los que T-DM1 combinado con docetaxel o 5-FU daba como resultado una eficacia antitumoral a aumentar en gran medida en comparación con el tratamiento con agentes individuales. El T-DM1 combinado con carboplatino daba como resultado un aumento de la eficacia en comparación con cualquier fármaco solo mientras que la combinación de T-DM1 con gemcitabina no era más eficaz que el T-DM1 solo. El T-DM1 combinado con cualquiera de pertuzumab, lapatinib o GDC-0941 daba como resultado una actividad antiproliferativa aditiva o sinérgica en experimentos de cultivo celular, y un aumento considerable de la eficacia antitumoral *in vivo* en comparación con el tratamiento con agentes individuales. Por el contrario, el trastuzumab sin conjugar antagonizaba la actividad de T-DM1 debido a la unión del mismo epítopo en HER2. Los estudios *in vivo* usando combinaciones de T-DM1 con agentes antiangiogénicos tales como el anticuerpo B20-4.1 o el inhibidor de molécula pequeña ABT-869 daban como resultado un aumento de la eficacia antitumoral con todas las combinaciones sometidas a ensayo, con la excepción de la dosis más elevada de T-DM1 (10 o 15 mg/kg) administrada con B20-4.1.

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

La combinación del anticuerpo B20-4.1 de murino anti-VEGF (Liang *et al* (2006) Jour. Biol. Chem. 281: 951-961), un homólogo de bevacizumab, y trastuzumab-MCC-DM1 en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama de ratón dio como resultado una actividad antitumoral superior a la de B20-4.1 solo. Los resultados de estos estudios proporcionan una base predictiva de efectos enérgicos y una razón para la evaluación clínica futura de regímenes de tratamiento que incluyen trastuzumab-MCC-DM1 en combinación con diferentes terapias antitumorales en cáncer de mama positivo para HER2.

Los efectos sinérgicos del fármaco se observaron con combinaciones de agentes dirigidos a HER2, tales como trastuzumab-DM1 más lapatinib, o trastuzumab-DM1 combinado con el anticuerpo de HER2 pertuzumab (un inhibidor de la dimerización de HER2).

El trastuzumab-MCC-DM1 combinado con carboplatino o 5-FU presentaba un aumento de la actividad en comparación con el tratamiento con agentes individuales solos, mientras que el cargamento de combinación con gemcitabina no daba como resultado un aumento de la actividad antitumoral.

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.

T-DM1 combinado con el inhibidor GDC-0941 de PI3K aumentaba la actividad antitumoral 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 ofrecenfoques terapéuticos adicionales para pacientes cuya enfermedad evoluciona con la terapia basada en trastuzumab o lapatinib.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

La potencia *in vitro* de las composiciones de trastuzumab-MCC-DM1 con agentes quimioterapéuticos se midió mediante el ensayo de proliferación celular del Ejemplo 2; el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo®, disponible en el mercado en Promega Corp., Madison, WI. Este método de ensayo homogéneo se basa en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (documento de Patente de Estados Unidos Nº 5583024; documento de Patente de Estados Unidos Nº 5674713; documento de Patente de Estados Unidos Nº 5700670) y determina el número de células viales 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 Nº 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo® se realizó en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible a identificación sistemática de alto rendimiento automatizada (HTS) (Cree *et al*., (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición de un solo reactivo (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a células cultivadas en medio complementado con suero. No se requieren etapas de lavado celular, retirada del medio y pipeteo múltiple. El sistema detecta tan solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos a los 10 minutos después de la adición del reactivo y mezcla.

El formato de "añadir-mezclar-medir" homogéneo da como resultado lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en cultivo. El Ensayo de CellTiter-Glo® genera una señal luminescente "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® (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_{50} (Tabla 1) en células SK-BR-3 que son sensibles al trastuzumab. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplos de CI_{50}. El índice de combinación (IC) de CI_{10} a CI_{90} para cada combinación es mayor que 2, lo que indica antagonismo *in vitro*. Sin embargo, la combinación de T-DM1 + trastuzumab *in vivo* no muestra un efecto antagonista.

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

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

16 X	5000	555,56	41,7	> 2

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

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

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

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 IC_{50} (Tabla 3) en células MDA-MB-175. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplo de CI_{50}. El índice de combinación (IC) sobre IC_{10} con respecto a IC_{90} para cada combinación es inferior a 1, con el IC promedio = 0,387, lo que indica sinergia (Tabla 3).

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

múltiplo de CI_{50}	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 con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 múltiplo de CI_{50}. El índice de combinación (IC) sobre IC_{10} con respecto a IC_{90} para cada combinación es inferior a 1, con el IC promedio = 0,096, lo que indica sinergia (Tabla 3a).

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

múltiplo de CI_{50}	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 con respecto a diversas dosis fijas de pertuzumab en combinación con respuesta a la dosis de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), y diversas dosis de T-DM1 solo. La Figura 4 muestra los efectos de las dosis fijas de T-DM1 en combinación con diversas dosificaciones de pertuzumab. La adición de pertuzumab a T-DM1 como resultado una actividad antiproliferativa ligeramente superior a la de T-DM1 solo.

La Figura 5 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 5 días con respecto a diversas dosis fijas de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) en combinación con respuesta a la dosis de pertuzumab, y diversas dosis de pertuzumab solo. La Figura 5 muestra los efectos de las dosis fijas de pertuzumab en combinación con diversas dosificaciones de T-DM1 en la proliferación de células BT-474. La adición de T-DM1 ha pertuzumab aumenta el efecto del 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 IC_{50} (Tabla 4) en células BT-474. El número de células viables se representa con respecto a los valores de múltiplo de CI_{50}. Los valores del índice de combinación (IC) de IC_{10} a IC_{90} varían de 0,198 a 1,328. El IC promedio para este intervalo = 0,658 lo que indica sinergia.

Tabla 4 Proliferación de BT-474 - 5 días

múltiplo de CI_{50}	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 con respecto 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 superior a la de T-DM1 solo.

La Figura 7a muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días con respecto 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 el IC_{10} y IC_{90} = 0,793, lo que indica aditividad.

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

múltiplo de CI_{50}	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 con respecto 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 IC promedio entre el IC_{10} y IC_{90} = 0,403, lo que indica sinergia.

Tabla 8a Proliferación de BT-474 - 3 días

múltiplo de CI_{50}	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

múltiplo de CI_{50}	lapatinib nM	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
4x	123,44	370,33	84,1	0,390
8x	370,33	1111	89,3	0,638

La Figura 8 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 3 días con respecto 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 actividad antiproliferativa más elevada en comparación con la de cualquier fármaco solo.

La Figura 9 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474-EEI a los 3 días con respecto 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 actividad antiproliferativa más elevada en comparación con la de cualquier fármaco solo.

La Figura 18 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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 el IC_{10} y IC_{90} = 0,952.

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

múltiplo de CI_{50}	5-FU (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

La Figura 19 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de BT-474 a los 3 días con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} 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.

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

múltiplo de CI_{50}	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

La Figura 20 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de SK-BR-3 a los 3 días con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} de gemcitabina, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), y combinaciones de proporción de dosis fija de gemcitabina y T-DM1 (Tabla 20). La gemcitabina combinada con T-DM1 da como resultado una interacción de fármaco antagonista, con valores de IC > 1,3 en todas las combinaciones sometidas a ensayo.

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

múltiplo de CI_{50}	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

La Figura 21 muestra una representación de la viabilidad celular *in vitro* de MDA-MD-361 a los 3 días con respecto a las concentraciones de múltiplo de CI_{50} de gemcitabina, trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), y combinaciones de

proporción de dosis fija de gemcitabina y T-DM1 (Tabla 21). La combinación de fármaco proporciona un efecto antagonista con el IC promedio = 1,706,

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

múltiplo de CI_{50}	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

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 múltiples de CI_{50} de 0,25x a 4x. La Tabla 3 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y el IC medio de 1.111. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos en la Figura 22. La representación de independencia de Bliss muestra la respuesta de la aditividad calculada de la combinación de dos compuestos individuales.

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

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

La Figura 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 múltiples de CI_{50} de 0,0625x a 16x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 23 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y el IC medio de 0,802. La combinación de T-DM1 y GDC-0941 es aditiva en la línea celular KPL4.

Tabla 23 Proliferación de GDC-0941 + T-DM1: KPL4 - 3 días

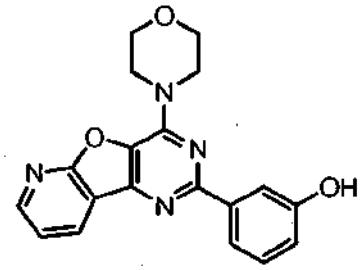
múltiplo de CI_{50}	GDC-0941 (nM)	T-DM1 ng/ml	Efecto (%)	IC
0,125x	31,25	1,25	12,6	1,100
0,25x	62,5	2,5	20,6	1,344
0,5x	125	5	39,2	1,263
1x	250	10	84,5	0,452
2x	500	20	94,9	0,350
4x	1000	40	97,1	0,440
8x	2000	80	97,9	0,668

La Figura 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 5 muestran los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren una sinergia *in vitro* moderada entre T-DM-1 y GDC-0941 ya que los valores del IC están entre 0,5 y 1, y la aditividad entre T-DM-1 y PI103 ya que los valores del IC son próximos a 1.

Tabla 24 Combinaciones: Proliferación de KPL4

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

El inhibidor selectivo de PI3K, PI103 (Hayakawa *et al*., (2007) Bioorg. Med. Chem. Lett. 17: 2438-2442; Raynaud *et al*., (2007) Cancer Res. 67: 5840-5850; Fan *et al*., (2006) Cancer Cell 9: 341-349; documento de Patente de Estados Unidos Nº 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 µM) a concentraciones múltiples de CI_{50} de 0,125x a 8x. La predicción de aditividad de Bliss se representa como la línea de puntos. La Tabla 6 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 0,888. T-DM1 combinado con GDC-0941 da como resultado una actividad antiproliferativa aditiva en las células MDA-MB-361, con el IC medio = 0,889.

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

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

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 la100 ng/ml) y GDC-0941 (de 62,5 nM a 2 µM) 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 7 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 0,813. El T-DM1 combinado con GDC-0941 da como resultado una actividad antiproliferativa aditiva en las células MDA-MB-361, con el IC medio = 0,813.

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 µM) 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 8 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 1,2122. GDC-0941 y T-DM1 no tienen un efecto de combinación en BT-474, usando estas proporciones de dosis.

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 µM) 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 9 muestra el efecto en el intervalo de inhibición de un 10-90 % con valores del IC calculados y del IC medio de 0,997, lo que indica aditividad.

Tabla 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 10 muestra los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren antagonismo *in vitro* entre T-DM-1 y GDC-0941 ya que los valores del IC están entre > 1, y aditividad o ligero antagonismo entre T-DM-1 y PI103 ya que los valores del IC son próximos o son ligeramente mayores que 1.

Tabla 31 Combinaciones: Proliferación de AU565

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

La Figura 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 11 muestra los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren una sinergia *in*

vitro moderada entre T-DM-1 y GDC-0941 ya que los valores del IC están entre 0,5 y 1, y sinergia entre T-DM-1 y PI103 ya que los valores del IC son próximos a 0,5.

Tabla 32 Combinaciones: Proliferación de EFM 192A

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

La Figura 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 12 muestra los valores del Índice de Combinación. Los resultados sugieren aditividad o ligera sinergia *in vitro* entre T-DM-1 y GDC-0941 dado que los valores del IC son próximos a 1, y ligera sinergia entre T-DM-1 y PI103 dado que los valores del IC son < 1.

Tabla 33 Combinaciones: Proliferación de HCC1954

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

EFICACIA DEL XENOINJERTO DE TUMOR *IN VIVO*

La eficacia de las combinaciones de la invención se puede medir *in vivo* mediante implante de aloinjertos o xenoinjertos de células cancerígenas en roedores y tratamiento de los tumores con las combinaciones. Se van a esperar resultados variables dependiendo de la línea celular, la presencia o ausencia de ciertas mutaciones en las células tumorales, la secuencia de administración de trastuzumab-MCC-DM1 y agente quimioterapéutico, régimen de dosificación, y otros factores. Los ratones objeto se trataron con fármaco o fármacos o control (Vehículo) y se controlaron durante varias semanas o más para medir el tiempo de duplicación del tumor, log de la muerte celular, e inhibición tumoral (Ejemplo 3). Las Figuras 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 del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores KPL-4 inoculados en el panículo adiposo mamario de ratones SCID beige después de dosificación con: (1) tampón de ADC, (2) pertuzumab 15 mg/kg de, (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 mg/kg, (8) pertuzumab 15 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg. Los animales dosificados con tampón de 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 da como resultado una actividad antitumoral más elevada en xenoinjertos de KPL4 que cualquier agente solo.

La Figura 11 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumores KPL-4 inoculados en el panículo adiposo mamario de ratones SCID beige después de dosificación con: (1) tampón de 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) B20-4.1, 5 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg, (9) B20-4.1, 5 mg/kg + pertuzumab, 40 mg/kg. Al final del estudio, todos los tumores restantes con un volumen inferior a 50 mm^3 se evaluaron de forma histológica y se determinó que 8 muestras en un solo agente (5) T-DM1, 5 mg/kg, 5 muestras en el grupo de combinación (6) 5-FU, 100 mg/kg + T-DM1, 5 mg, y 8 muestras en el grupo de combinación (7) pertuzumab, 40 mg/kg + T-DM1, 5 mg/kg tenían evidencia de células tumorales viables.

La Figura 12 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico de MMTV-HER2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 da como resultado un aumento de la inhibición del crecimiento del tumor con T-DM1 de 3 y 5 mg/kg, pero no con 10 mg/kg.

La Figura 13 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico de MMTV-HER2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 cualquiera de 5-FU, carboplatino o gemcitabina da como resultado un aumento de la eficacia antitumoral en comparación con el tratamiento con el agente solo.

La Figura 14 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en xenoinjertos de tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 solo T-DM1 a una dosis de 15 mg/kg (5) no es significativamente diferente de la combinación de T-DM1 a 15 mg/kg y B20-4.1 a 5 mg/kg (8). En este estudio lapatinib y pertuzumab no eran diferentes del vehículo. B20-4.1 mostraba una tendencia hacia el aumento de la eficacia en comparación con el vehículo. T-DM1 eficaz como un agente solo ($p < 0,01$). La combinación de T-DM1 con lapatinib era significativamente mejor que el lapatinib solo ($p < 0,01$), pero no diferente al T-DM1 solo. La combinación de T-DM1 con pertuzumab era significativamente mejor que el pertuzumab solo ($p < 0,01$), pero no diferente al T-DM1 solo. La combinación de T-DM1 con B20-4.1 era significativamente mejor que el B20-4.1 solo ($p < 0,01$), pero no diferente al T-DM1 solo.

La Figura 15 muestra una representación de la eficacia *in vivo* por el cambio del volumen tumoral medio en el tiempo en xenoinjertos de tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de dosificación con: (1) Vehículo (tampón de 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 mostraba dos respuestas parciales (8), y no es significativamente más eficaz que el agente solo 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 solo ABT-869, 15 mg/kg (5). ABT-869 dosificado a 5 mg/kg era significativamente mejor que el vehículo en el tiempo con respecto al criterio de valoración ($p < 0,01$), pero no era diferente al vehículo en el tiempo con respecto a la duplicación tumoral. ABT-869 dosificado a 15 mg/kg y T-DM1 dosificado a cualquiera de 7,5 o 15 mg/kg era significativamente mejor que el vehículo tanto en el tiempo con respecto a la duplicación tumoral como en el tiempo con respecto al criterio de valoración del tumor ($p < 0,01$). La combinación de 7,5 mg/kg de T-DM1 y 5 mg/kg de ABT-869 manera diferente a la del agente solo de 7,5 mg/kg de T-DM1. En comparación con el agente solo de 5 mg/kg de ABT-869, la combinación de 7,5 mg/kg de T-DM1 + 5 mg/kg de ABT-869 era significativamente mejor en el tiempo con respecto a la duplicación del tumor ($p < 0,01$), pero no era diferente en el tiempo con respecto al criterio de valoración. La combinación de 7,5 mg/kg de T-DM1 y 15 mg/kg de ABT-869 era significativamente mejor que cualquier agente solo ($p < 0,01$). La combinación de 15 mg/kg de T-DM1 + 5 mg/kg de ABT-869 no era diferente a la de 15 mg/kg de agente solo de T-DM1. En comparación con 5 mg/kg de agente solo de ABT-869, la combinación de 15 mg/kg de T-DM1 y 5 mg/kg de ABT-869 no era diferente en el tiempo con respecto al criterio de valoración, pero era significativamente diferente en el tiempo con respecto a la duplicación del tumor ($p < 0,01$). La combinación de 15 mg/kg de T-DM1 + 15 mg/kg de ABT-869 era significativamente mejor que el 15 mg/kg de ABT-869 solo y era mejor que 15 mg/kg de T-DM1 solo en el tiempo con respecto a la duplicación del tumor ($p < 0,01$). El tiempo con respecto al criterio de valoración de 15 mg/kg de T-DM1 y 15 mg/kg de T-DM1 + 15 mg/kg de ABT-869 no era diferente.

La Figura 16 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en xenoinjertos de tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de 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) mostraban una respuesta a la dosis con 7 PR y 3 CR. Todos los grupos de agentes solo eran significativamente diferentes al grupo de vehículo ($p < 0,01$). La combinación de 7,5 mg/kg de T-DM1 + docetaxel era significativamente mejor que cualquier agente solo tanto en el tiempo con respecto a la duplicación del tumor como en el tiempo con respecto al criterio de valoración ($p < 0,01$). No había respuestas objetivas en el grupo de 7,5 mg/kg de T-DM1 y 2 respuestas parciales

(PR) en el grupo de agentes solo de docetaxel. La combinación de 7,5 mg/kg de T-DM1 y docetaxel dio como resultado 9 PRs y 1 respuesta completa (CR). La combinación de 15 mg/kg de T-DM1 + docetaxel era significativamente mejor que cualquier agente individual en el tiempo con respecto a la duplicación del tumor y en el tiempo con respecto al criterio de valoración ($p < 0,01$). El tratamiento con 15 mg/kg de agente solo de T-DM1 dio como resultado 5 PRs y 2 CRs. La combinación de 15 mg/kg de T-DM1 + docetaxel aumentaba la tasa de respuesta objetiva a 7 PRs y 3 CRs. Todos los ratones en este grupo de combinación presentaban una respuesta objetiva al tratamiento.

La Figura 17 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en xenoinjertos de tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en el panículo adiposo mamario de ratones desnudos atímicos Harlan después de 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-DM1l 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 and lapatinib a 100 mg/kg (6) mostraban una respuesta a la dosis con 8 CR. Todos los grupos de agentes solo eran significativamente diferentes al vehículo ($p < 0,01$) tanto en el tiempo con respecto a la duplicación del tumor como en el tiempo con respecto al criterio de valoración. T-DM1 dosificado a 7,5 mg/kg en combinación con lapatinib era significativamente mejor que cualquiera de lapatinib o T-DM1 a 7,5 mg/kg como un agente solo ($p < 0,01$). T-DM1 dosificado a 15 mg/kg en combinación con lapatinib era significativamente mejor que el agente solo de lapatinib ($p < 0,01$). Esta combinación no era diferente a la de 15 mg/kg de T-DM1 dosificado como un agente solo.

El tiempo con respecto a la duplicación del tumor se midió mediante análisis estadístico de Kaplan-Meier como 2 X Vo. El tiempo con respecto a la duplicación del tumor y el análisis de supervivencia se cuantificaron mediante valores de p de rango logarítmico. El tiempo hasta la progresión se mide como el tiempo transcurrido para que el volumen tumoral alcance 1000 mm^3, o el tiempo de supervivencia si no se alcanza un volumen tumoral de 1000 mm^3. T-DM1 combinado con lapatinib dio como resultado una eficacia antitumoral aumentada en gran medida en comparación con el tratamiento con el agente solo.

La Figura 34 muestra una representación del cambio del volumen tumoral medio *in vivo* en el tiempo en tumor de mama transgénico MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk, (3) 5-FU, 100 mg/kg, po, qwk x2, (4) (5) 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 temporal del día 42. El tratamiento con T-DM1 y 5-FU da como resultado un aumento de la actividad antitumoral 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 MMTV-Her2 Fo5 inoculado en ratones CRL nu/nu después de dosificación con: (1) Vehículo, po, qd x21 (2) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk, (3) GDC-0941, 100 mg/kg, po, bid x21, (4) GDC-0152, 50 mg/kg, po, qwk x2, (5) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk + GDC-0941, 100 mg/kg, po, bid x21, (6) T-DM1, 5 mg/kg, iv, q3wk + GDC-0152, 50 mg/kg, po, qwk x2. El tratamiento con T-DM1 y GDC-0941 da como resultado un aumento de la actividad tumoral en comparación con el tratamiento con un solo agente, mientras que la combinación de T-DM1 y GDC-0152 no era más eficaz que T-DM1 solo.

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

La Figura 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, qdx21 + T-DM1, 10 mg/kg, iv, q3wk.

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

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

La Figura 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.

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

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

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

El 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.

El 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.

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 entre los listados de los agentes adicionales que se describen 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. Del mismo modo, el método de tratamiento de un paciente mediante la administración de una composición farmacéutica de la presente invención también pretende incluir la administración de la composición en volumen y 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}H, ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{13}N, ^{15}N, ^{15}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, ^{18}F, ^{36}Cl, ^{123}I e ^{125}I. Ciertos compuestos de la presente invención marcados de forma isotópica (por ejemplo, los marcados con ^{3}H y ^{14}C) son útiles ensayos de distribución de compuesto y/o tejido de sustrato. Los isótopos tritiados (^{3}H) y de carbono 14 (^{14}C) son útiles por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (^{2}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}O, ^{13}N, ^{11}C y ^{18}F son útiles para estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Por lo general, algunos compuestos de la presente invención marcados de forma isotópica se pueden preparar siguiendo procedimientos análogos a los que se desvelan en los Esquemas y/o en los Ejemplos que siguen a continuación en el presente documento, mediante sustitución de un reactivo marcado de forma isotópica por un reactivo no marcado de forma isotópica.

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

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

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

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

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

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

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

Las formulaciones farmacéuticas de la invención se dosificarán y administrarán de una manera, es decir, cantidades, concentraciones, programas, transcurso, vehículos y vía de administración, coherentes con la buena práctica médica. Algunos factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio

de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto a administrar estará regida por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar el trastorno mediado por el factor de coagulación. Tal cantidad es preferentemente inferior a la cantidad que es tóxica para el hospedador o que hace al hospedador más susceptible al sangrado de forma significativa.

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

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

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

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

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

agradable o para enmascarar un sabor desagradable y Colorante para facilitar la identificación y el cumplimiento del paciente.

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

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

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

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

Algunas suspensiones acuosas de las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la preparación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilen 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 puedenvasar 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

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

Las combinaciones terapéuticas de la invención incluyen una formulación, régimen de dosificación, cuatro cursos de tratamiento que comprende la administración de trastuzumab-MCC-DM1, y docetaxel, como una preparación combinada para su uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2.

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

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

En una realización en particular de terapia anticáncer, el trastuzumab-MCC-DM1 se puede combinar con docetaxel. Las cantidades de trastuzumab-MCC-DM1 y docetaxel y los tiempos relativos de administración se seleccionarán para conseguir el efecto terapéutico combinado deseado.

ADMINISTRACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

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

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. 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.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Las combinaciones terapéuticas de: (1) trastuzumab-MCC-DM1 y (2) docetaxel son útiles para el tratamiento de cáncer caracterizado por la activación de la ruta de HER2. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención incluye combinaciones para el tratamiento de enfermedades o afecciones que se pueden tratar mediante el direccionamiento de HER2. Para el tratamiento de un cáncer que expresa ErbB2 se pueden usar combinaciones terapéuticas de: (1) trastuzumab-MCC-DM1 y (2) docetaxel.

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

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

ARTÍCULOS PARA PREPARACIÓN

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de preparación, o "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 puede 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 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, en base 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 en base 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.

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 la primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente con necesidad de las mismas.

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 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.

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 anti-hiperproliferativa. Como alternativa, o adicionalmente, el kit también puede comprender adicionalmente un tercer envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (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.

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 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

Para ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 Preparación de trastuzumab-MCC-DM1

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

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 Nº 6790954; documento de Patente de Estados Unidos Nº 7432088) y se puede derivatizar para conjugación (documento de Patente de Estados Unidos Nº 6333410; RE 39151). La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón de 4 a aproximadamente 16 horas. La mezcla de la reacción de conjugación se filtró a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con 1 x PBS a pH 6,5. Como alternativa, la mezcla de reacción se filtró en gel con succinato 10 mM y cloruro sódico 150 mM a pH 5. La proporción de DM1/trastuzumab (p) era de 3,1, como se mide mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm. La proporción de fármaco con respecto al anticuerpo (p) también se puede medir mediante espectrometría de masas. La conjugación también se puede controlar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. La agregación se puede evaluar mediante análisis por dispersión de luz láser.

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

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

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

Ejemplo 2 Ensayo de Proliferación Celular *In Vitro*

La eficacia de las combinaciones de la invención se midió mediante un ensayo de proliferación celular que usa el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza *et al*., (2002) Cancer Res. 62: 5485-5488). Los reactivos del ensayo de Cell-Titer Glo y el protocolo están disponibles en el mercado (Promega). El ensayo evalúa la capacidad de los compuestos para entrar en las células e influir en la proliferación celular. El principio del ensayo es la determinación del número de células viables presentes mediante la cuantificación del ATP celular. Cell-Titer Glo es el reactivo usado para esta cuantificación. Se trata de un ensayo homogéneo en el que la adición del Cell-Titer Glo da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscencia a través de la reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente.

DMSO y Placas de los Medios: placas de polipropileno de fondo cónico de 96 pocillos de Nunc (Nº de cat. 249946)
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 (Nº 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 ºC, CO_2 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 ul 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 otros 1,5 µl de 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 ºC, CO_2 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 ºC 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 ºC y CO_2 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_{50} se calcularon usando el software Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software) o Prism 4.0 (GraphPad, San Diego). Los fármacos ensayos de combinación se dosificaron comenzando en concentraciones de CE_{50} de 8X. En los casos en los que la CE_{50} 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 10^4 células (véase la Figura 1 para líneas celulares y tipo de tumor) en medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 384 pocillos.
2. Se prepararon pocillos de control que contienen medio y sin células.
3. El compuesto se añadió a los pocillos experimentales y se incubó durante 3-5 días.
4. Las placas equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen de Reactivo de CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. La placa se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró y se informó en gráficos como RLU = unidades relativas de luminiscencia.

Como alternativa, las células se sembraron a una densidad óptima en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 4 días en presencia de compuesto de ensayo. Posteriormente se añadió Azul de Alamar™ al medio de ensayo, y las células se incubaron durante 6 h antes de la lectura a una excitación de 544 nm, una emisión de 590 nm. Los valores de la CE_{50} se calcularon usando un ajuste de curva de dosis respuesta sigmoidea.

Ejemplo 3 Xenoinjerto de Tumor *In Vivo*

Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener en fuentes comerciales convencionales. Grupos de ratones beige CB-17 SCID hembra (Charles River Laboratory) se implantaron con 3 millones de células de cáncer de mama KPL-4 (que sobreexpresa Her2) con Matrigel en la almohadilla de grasa mamaria. Grupos de ratones desnudos atímicos hembra (Charles River Laboratory o Harlan) se implantaron con

fragmentos de 2 x 2 mm^3 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^3) = (medida más larga x medida más corta^2) x 0,5.

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

Los ratones cuyo volumen tumoral superaba 2000 mm^3 o cuya pérdida de peso corporal era superior a un 20 % de su peso de partida se sacrificaron rápidamente de acuerdo con las directrices reguladoras.

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

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

Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia)

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

Se diseñó un estudio o sin ocultación, en Fase 1b/II, de la seguridad, tolerabilidad, y eficacia de trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) en combinación con pertuzumab administrado por vía intravenosa a pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo para HER2 que habían evolucionado a la vez que recibían la terapia anterior para caracterizar la seguridad y la tolerabilidad de la combinación. La combinación se administra cada 3 semanas a los pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo para HER2 que previamente habían recibido trastuzumab en cualquier línea de terapia, han recibido quimioterapia combinada con terapia dirigida a HER2 para enfermedad avanzada, o han evolucionado a la vez que recibían su terapia más reciente. Otro objetivo es evaluar la farmacocinética de T-DM1 cuando la combinación de T-DM1 y pertuzumab se administra en esta programación. Otro objetivo es realizar una evaluación preliminar de la eficacia de la combinación de T-DM1 y pertuzumab administrada en esta programación, tal como se mide mediante una tasa de respuesta objetiva basada en la evaluación del investigador usando Criterios de Evaluación de Respuesta modificada en Tumores Sólidos (RECIST), Versión 1.0. Los objetivos secundarios de este estudio son los que siguen a continuación: (1) Calcular la supervivencia sin evolución (PFS) de pacientes que reciben la combinación de T-DM1 y pertuzumab administrada en esta programación; (2) Evaluar la duración de la respuesta de la combinación de T-DM1 y pertuzumab administrada en esta programación; y (3) Evaluar el desarrollo de anticuerpos anti-terapéuticos para T-DM1.

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

Los pacientes a un nivel de dosis grado se observarán para DLT (Toxicidad Limitante de la Dosis) durante el Periodo de Observación de la DLT (definido como 21 días desde el momento de la primera dosis de 21 T-DM1) después de recibir sus primeras dosis de fármacos del estudio antes del tratamiento de cualquier paciente a un nivel de dosis más elevado. Si no se observan DLT en estos pacientes durante el Periodo de Observación de la DLT, el aumento

de la dosis has hasta el siguiente nivel de dosis puede avanzar.

Una DLT se define como cualquiera de las siguientes toxicidades relacionadas con el tratamiento que se producen dentro del Periodo de Observación de la DLT: (1) Grado ≥ 3 suceso adverso no hematológico que no se debe a la evolución de la enfermedad o a otra causa claramente identificable, excepto por alopecia de cualquier grado; (2) Grado 3 diarrea que responde a la terapia con tratamiento de referencia: (3) Grado 3 náuseas o vómitos en ausencia de medicación previa que responden a la terapia con tratamiento de referencia; (4) Grado ≥ 3 aumento de la bilirrubina en suero, transaminasas hepáticas (ALT o AST), o fosfatasa alcalina (ALP) con una duración de 72 horas, con excepción de pacientes con niveles de transaminasas hepáticas o ALP de Grado 2 en el periodo inicial, (≤ 5 del límite superior de la normal [ULN]) como resultado de metástasis hepática u ósea. Un nivel de transaminasas hepáticas o ALP ≥ 10 ULN se considerará una DLT; (5) Grado ≥ 4 trombocitopenia con una duración de 24 horas; (6) Grado ≥ 4 neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos < 500/células/mm^3) con una duración de 4 días su acompañado por fiebre (temperatura oral o del tímpano 100,4 ºF o 38 ºC); (7) Cualquier toxicidad subjetivamente intolerable percibida por el investigador que se relaciona con cualquier compuesto de ensayo; (8) Cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento que prohiba el inicio del segundo ciclo de tratamiento.

Una vez que se ha tomado la decisión de avanzar al siguiente nivel de dosis más elevada, también se permitirá un aumento de la dosis intra-paciente; los pacientes inscritos en este estudio inicialmente recibirán una dosis reducida de T-DM1 (3,0 mg/kg) junto con una dosis completa de pertuzumab. Se permitirá que estos pacientes aumenten hasta dosis más elevadas de ambos fármacos para ciclos posteriores una vez que su población base haya eliminado el Periodo de Observación de la DLT. Sin embargo, la seguridad del nivel de dosis de 3,6 mg/kg se basará en la evaluación de DLT. Los pacientes (incluyendo los que se han inscrito en el estudio durante la fase de aumento de la dosis del estudio) se considerarán evaluables para la eficacia si permanecen el estudio durante el seguimiento de la primera evaluación del tumor. Al final del Ciclo 1 se debería realizar ecocardiograma (ECHO) o barridos de adquisición de angiografía radioisotópica en reposo (MUGA), y a continuación cada tres ciclos durante el periodo 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 0,45 %. En los casos en los que se usan bolsas de PVC o PO que contienen Cloruro Sódico al 0,9 %, se recomienda el uso de filtros en línea de 0,22 µm. La bolsa se invierte suavemente para mezclar la solución. La solución de T-DM1 la infusión diluida en bolsas de cloruro de polivinilo (PVC) o de poliolefina (PO) libre de PVC y libre de látex que contienen Inyección de Cloruro Sódico de un 0,9 % o de un 0,45 %, USP, se pueden almacenar a 2 ºC-8 ºC (36 ºF-46 ºF) durante un breve periodo de tiempo.

Formulación de Pertuzumab

El pertuzumab se proporciona como una formulación de un solo uso que contiene 30 mg/ml de pertuzumab 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 retira de los viales y se añade a una bolsa de IV de 250 cc de solución de cloruro sódico al 0,9 % para inyección. La bolsa se golpea suavemente para mezclar la solución, y se inspecciona visualmente para partículas y decoloración antes de su administración. La solución de pertuzumab para infusión diluida en bolsas de poliolefina de polietileno o sin PVC que contiene solución de cloruro sódico al 0,9 % se puede almacenar a 2 ºC-8 ºC (36 ºF-46 ºF) durante un breve periodo de tiempo.

Medidas de Resultados de Seguridad

La seguridad y la tolerabilidad de T-DM1 y pertuzumab se evaluarán usando las siguientes medidas primarias de resultado de seguridad: (1) Incidencia, naturaleza y gravedad de los sucesos adversos; (2) may es clínica sucesos adversos o cambios en hallazgos físicos y resultados clínicos de laboratorio durante y siguiendo la administración del fármaco de estudio que da como resultado una modificación de la dosis, retraso de la dosis, o interrupción de T-DM1 y/o pertuzumab; y (3) Cambio en la función cardiaca (es decir, fracción de eyección del ventrículo izquierdo [LVEF], anomalías de la pared segmentaria), incluyendo barridos de ECHO o MUGA.

Medidas de Resultados Farmacocinéticos y farmacodinámicos

Los siguientes parámetros farmacocinéticos de T-DM1 y pertuzumab se determinará en todos los pacientes que reciben el tratamiento del estudio usando métodos no compartí mentales y/o de población, cuando sea apropiado, según lo permitan los datos: (1) Concentraciones en suero de T-DM1 (conjugado), trastuzumab total (libre y conjugado con respecto a DM1); (2) Concentraciones en plasma de DM1 libre; (3) Exposición total (área bajo la curva de concentración-tiempo [AUC]); (4) Concentración en suero máxima (Cmáx); (5) Concentración mínima (Cmín); (6) Eliminación; (7) Volumen de distribución; (8) Semivida terminal; (9) Anticuerpos anti-terapéuticos con respecto a T-DM1.

Medidas de Resultados de Eficacia

La tasa de respuesta objetiva usando RECIST, v1.0 se evaluará como la medida de resultados de eficacia. Las medidas secundarias de resultados de eficacia de este estudio son las que siguen a continuación: (1) PFS, definido como el tiempo desde el inicio del tratamiento del estudio hasta la primera aparición de evolución de la enfermedad o muerte en el estudio (dentro de 30 días de la última dosis del tratamiento del estudio) por cualquier causa, según lo determine la revisión del investigador de las evaluaciones del tumor usando RECIST, v1.0 modificado; y (2) Duración de la respuesta, definida como la primera aparición de una respuesta objetiva documentada hasta el momento de la evolución de la enfermedad, según lo determine la revisión del investigador de las evaluaciones del tumor usando RECIST modificado (v1.0), o muerte en el estudio (dentro de 30 días de la última dosis del tratamiento del estudio) por cualquier causa.

Tratamiento del estudio

El T-DM1 se administrará con una frecuencia no superior a cada 3 semanas a una dosis de 2,4, 3,0, o 3,6 mg/kg por IV. La escala de dosificación de cualquier paciente puede disminuir hasta una dosis de T-DM1 tan baja como 2,4 mg/kg. Dependiendo de la toxicidad encontrada en la población base de pacientes que comienzan la terapia a 3,0 mg/kg, y si se confirma que se pueden tolerar 3,0 mg/kg de T-DM1, la dosis de los pacientes se puede elevar hasta una dosis de 3,6 mg/kg por IV cada 3 semanas en ciclos posteriores. El pertuzumab se administrará a una dosis de carga de 840 mg por IV en el Día 1, Ciclo 1, seguido por 420 mg por IV cada 3 semanas en ciclos posteriores.

Métodos Estadísticos

El criterio de valoración de la eficacia primaria de este estudio es la respuesta objetiva evaluada por el investigador, definida como una respuesta completa o parcial determinada en dos ocasiones consecutivas con ≥ 4 semanas de separación. Se hará un cálculo de la tasa de respuesta objetiva así como del correspondiente intervalo de confianza de un 95 %. Para una respuesta objetiva, se hará el recuento de los pacientes sin una evaluación válida del tumor después de la medida inicial como no respondedores. Para la duración de la respuesta y PFS, los datos de los pacientes que pierden el seguimiento se tratarán como censurados en la última fecha en la que se supo que el paciente estaba libre de evolución. Los datos para los pacientes sin evaluación del tumor después del tratamiento o muerte se censurarán en la fecha del inicio del tratamiento más 1 día.

Ejemplo 5 (Ejemplo de referencia)

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

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

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 ºF y 46 ºF (2 ºC y 8 ºC). Se proporcionarán instrucciones a los pacientes para almacenar el fármaco del estudio a temperatura refrigerada entre 36 ºF y 46 ºF

(2 ºC y 8 ºC).

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.

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 (± 10), dependiendo de cómo se tolere T-DM1 en el estudio precursor. Si la infusión de 90 minutos se tolera bien, se administrarán fusiones posteriores durante 30 (± 10) minutos.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de cáncer que expresa ErbB2, en donde el método comprende la administración a un mamífero de una combinación terapéutica como una formulación combinada o de forma alterna, en donde la combinación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1, y una cantidad terapéuticamente eficaz de docetaxel.

2. Una combinación terapéutica para 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 docetaxel se administran como una formulación combinada.

3. Una combinación terapéutica para 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 docetaxel se administran como una formulación alterna.

4. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 3, en donde al mamífero se le administra docetaxel y posteriormente a continuación se le administra trastuzumab-MCC-DM1.

5. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la combinación terapéutica se administra a intervalos de aproximadamente tres semanas a un ser humano con el cáncer que expresa ErbB2.

6. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el trastuzumab-MCC-DM1 se administra a intervalos de aproximadamente una semana a tres semanas a un ser humano con el cáncer que expresa ErbB2.

7. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el trastuzumab-MCC-DM1 se administra 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 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 docetaxel son cada una de 1 mg a 1000 mg y la cantidad de trastuzumab-MCC-DM1 y la cantidad de docetaxel se encuentran en una proporción de 1:10 a 10:1 en peso.

9. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer que expresa ErbB2 es cáncer de mama.

10. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el mamífero es un paciente positivo para HER2.

11. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente positivo para HER2 ha recibido terapia con trastuzumab o lapatinib.

12. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la combinación terapéutica es una composición farmacéutica que comprende trastuzumab-MCC-DM1, docetaxel y uno o más vehículos, sustancias de deslizamiento, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

13. Una combinación terapéutica para uso en un método para el tratamiento de la reivindicación 12, en donde la composición farmacéutica comprende una sustancia de deslizamiento farmacéuticamente aceptable seleccionada entre dióxido de silicio, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, estearatos metálicos, aluminosilicato sódico, benzoato sódico, carbonato cálcico, silicato cálcico, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco libre de asbestos, Stearowet C, almidón, almidón 1500, lauril sulfato de magnesio, óxido de magnesio y combinaciones de los mismos.

14. Uso de una combinación terapéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de mama, en el que la combinación terapéutica se administra a un mamífero como una formulación combinada o de forma alterna, y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de docetaxel.

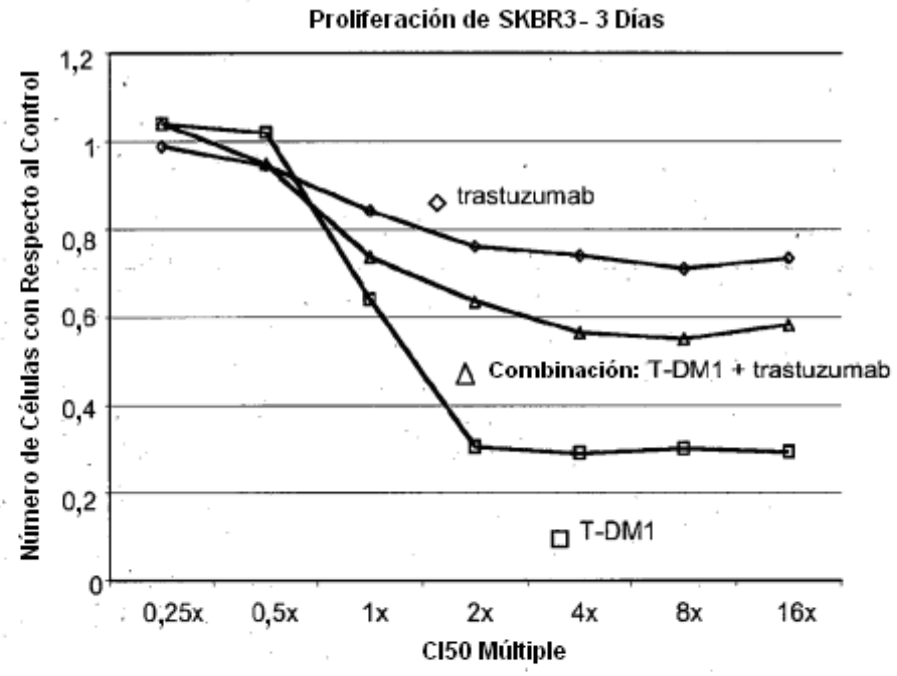


Figura 1

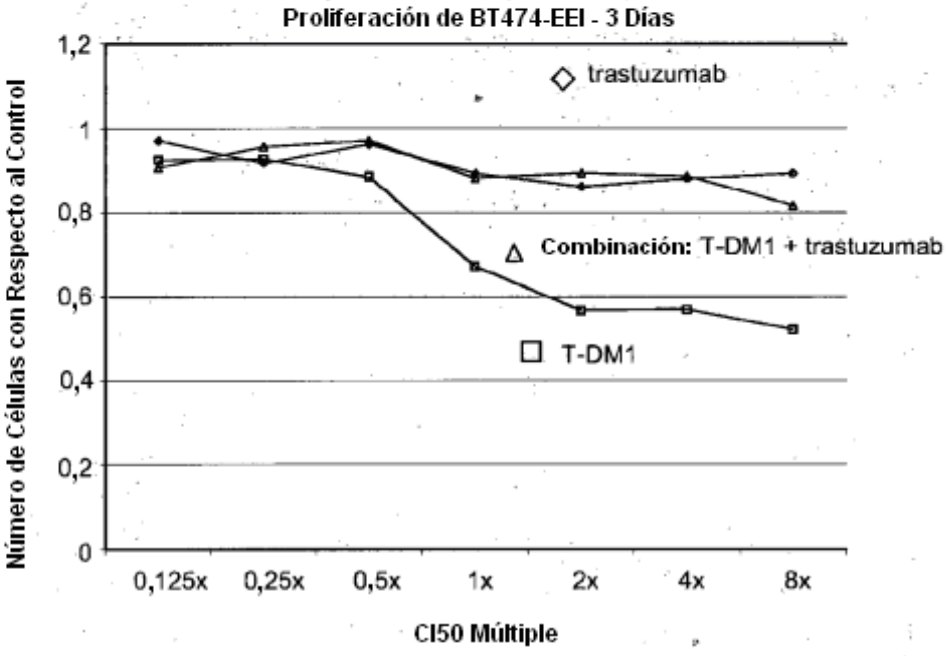


Figura 2

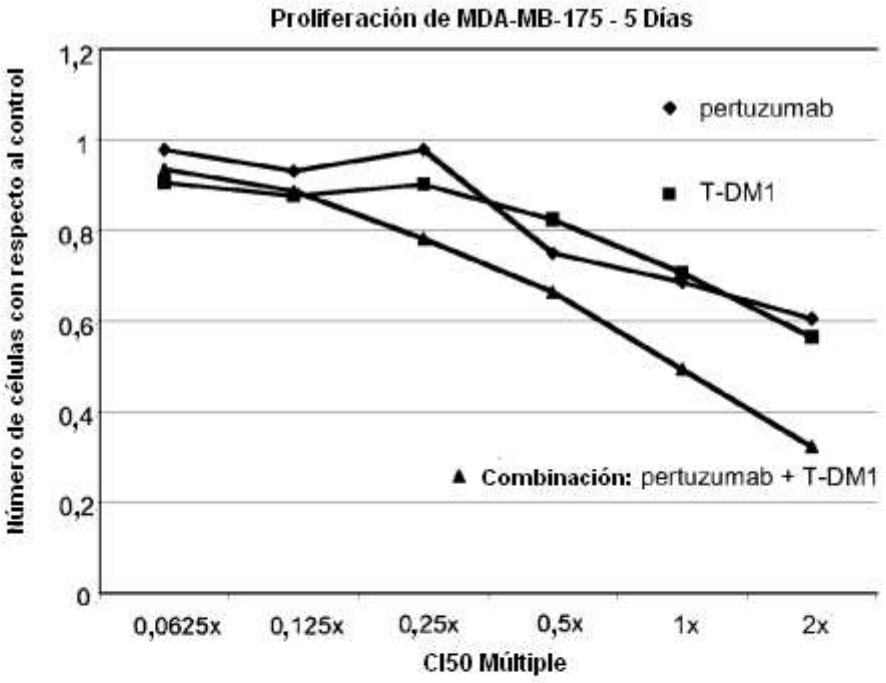


Figura 3

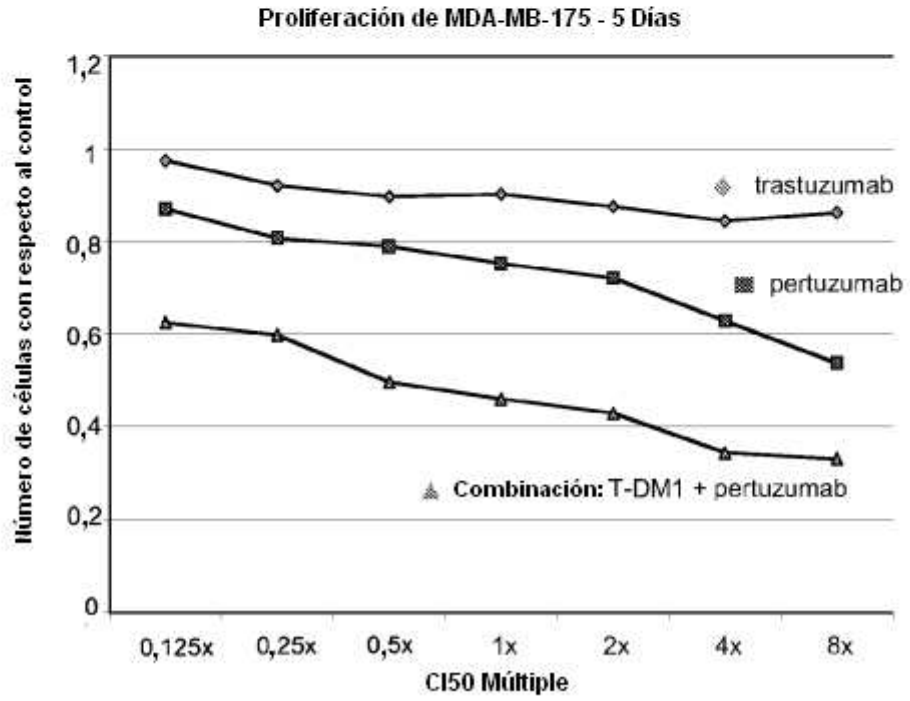


Figura 3 a

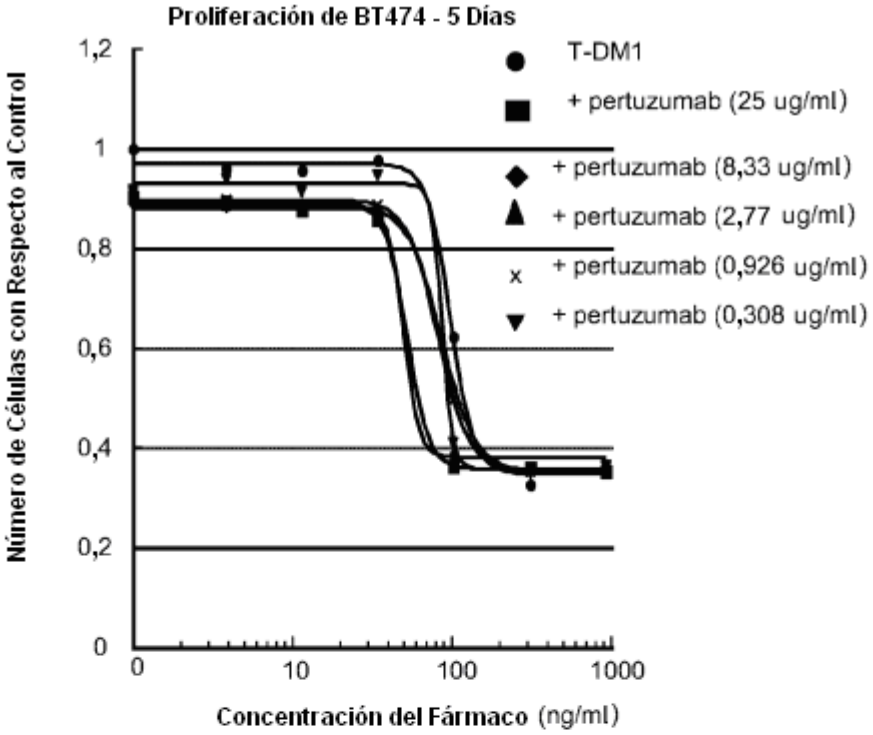


Figura 4

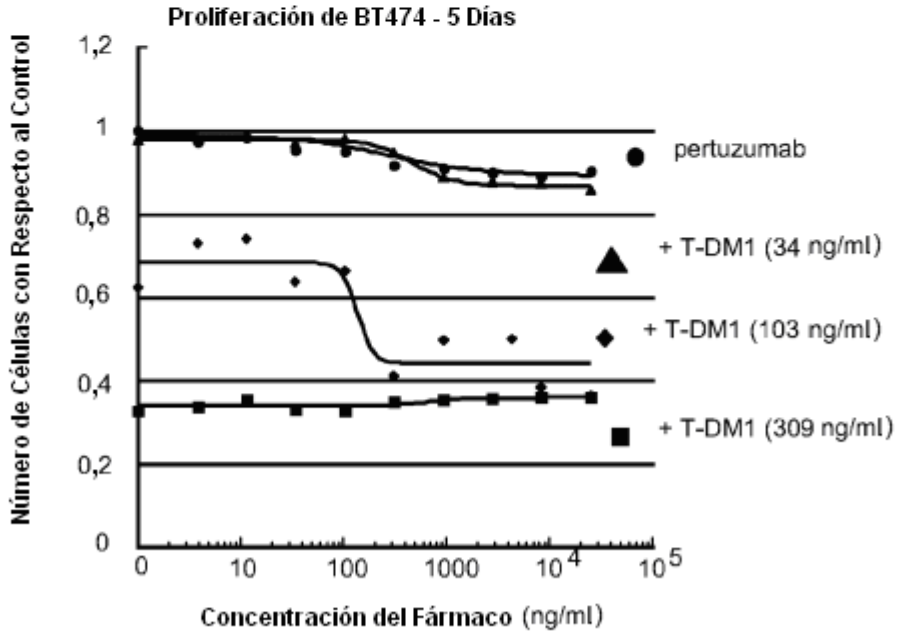


Figura 5

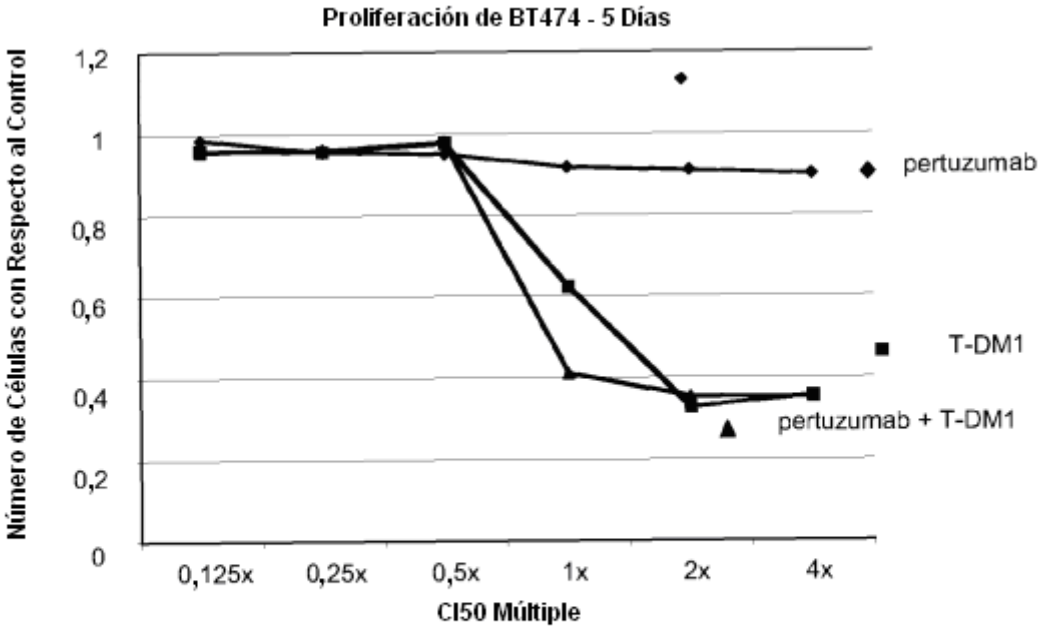


Figura 6

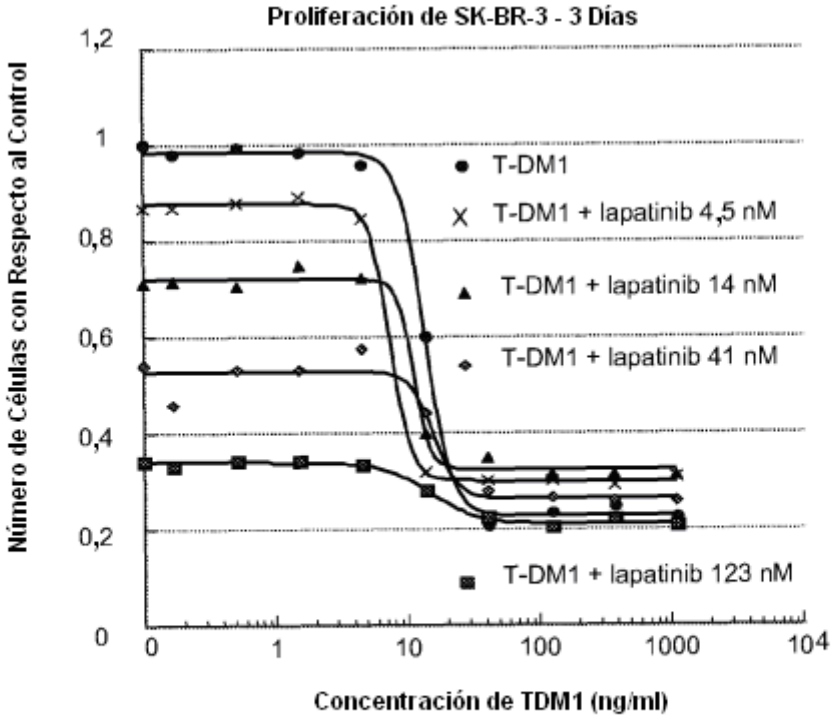


Figura 7

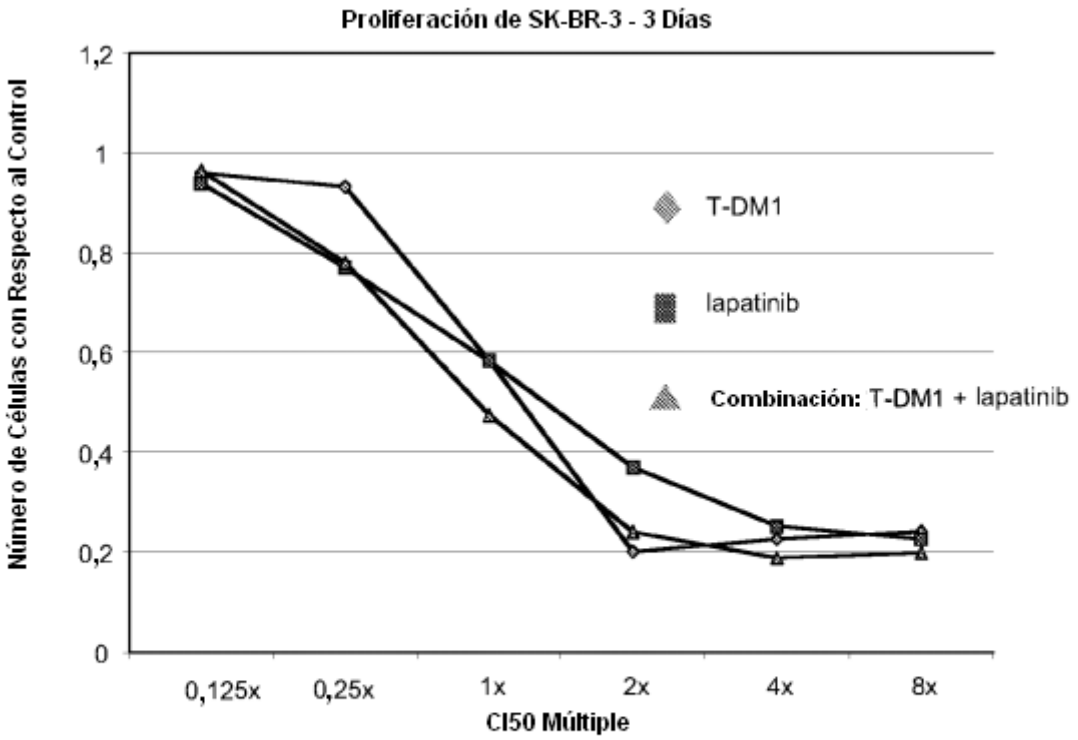


Figura 7a

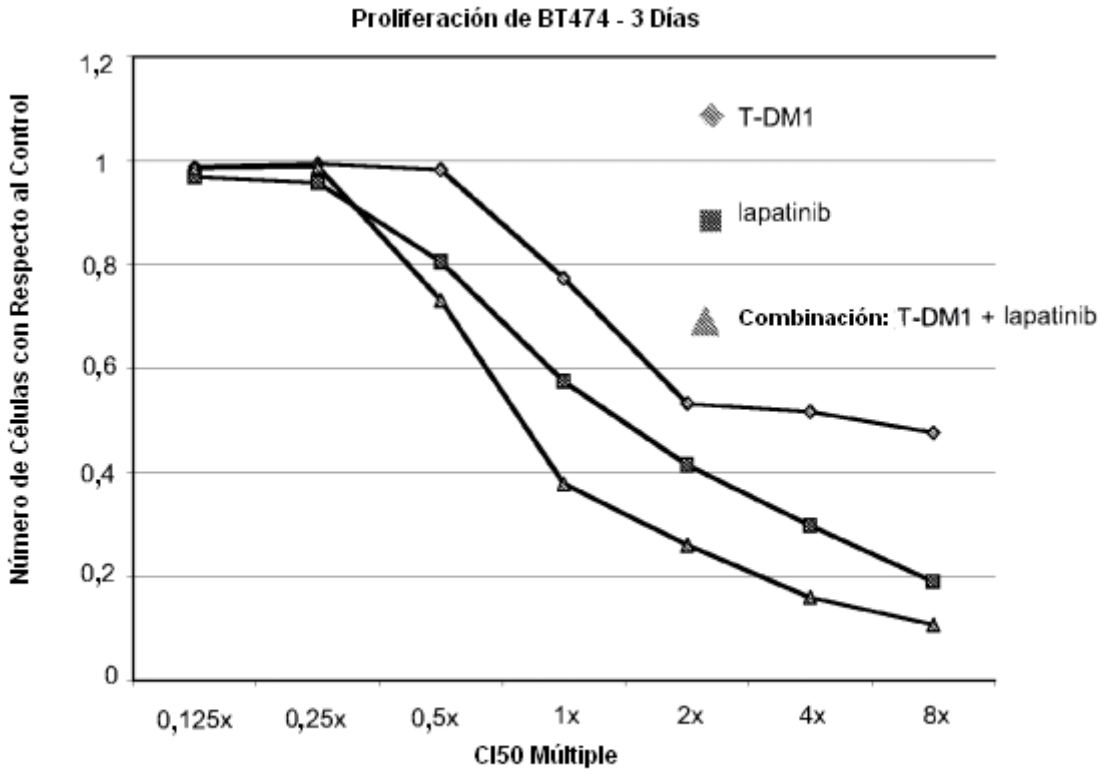


Figura 8a

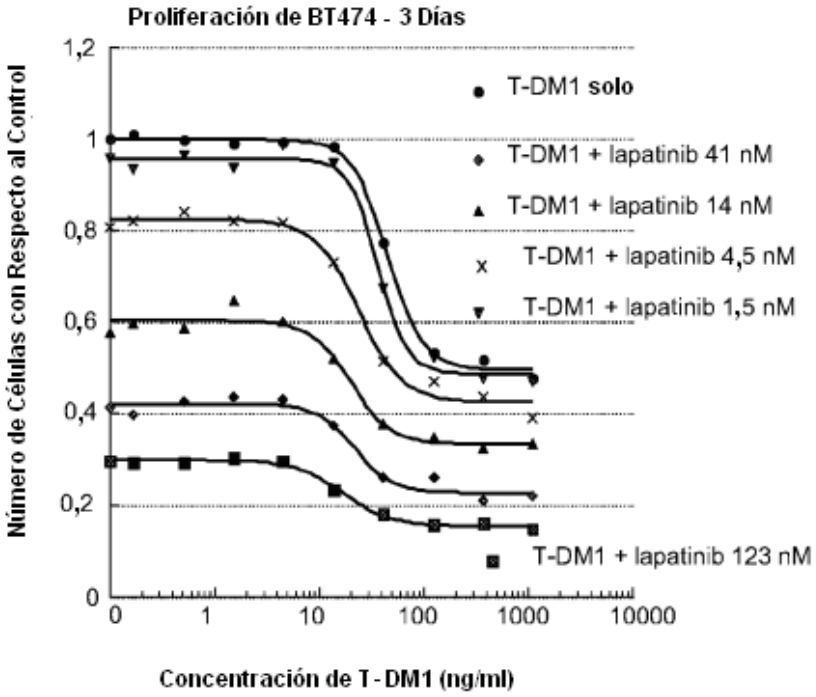


Figura 8

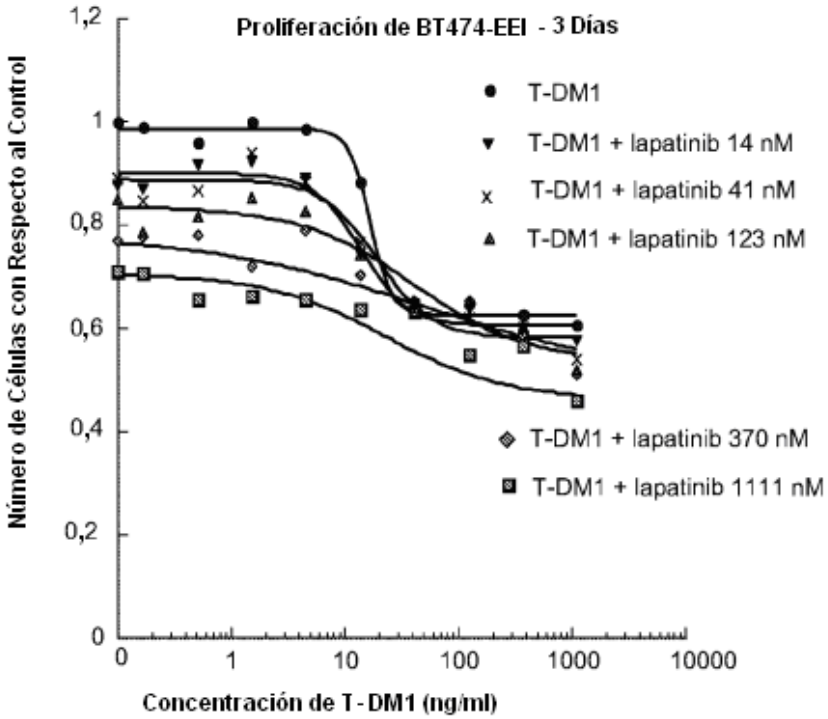


Figura 9

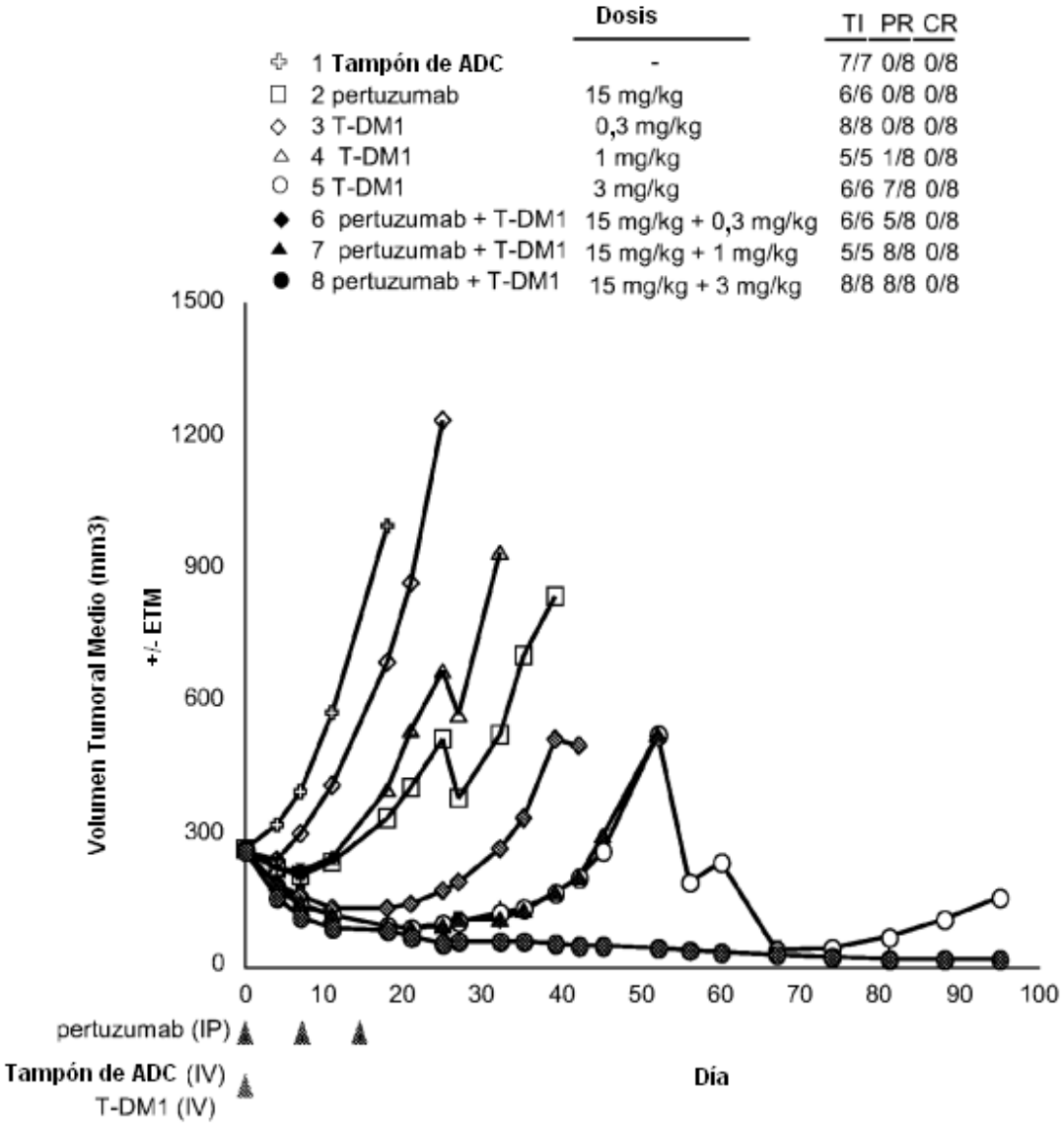

Dosis
TI PR CR
1 Tampón de ADC - 7/7 0/8 0/8
2 pertuzumab 15 mg/kg 6/6 0/8 0/8
3 T-DM1 0,3 mg/kg 8/8 0/8 0/8
4 T-DM1 1 mg/kg 5/5 1/8 0/8
5 T-DM1 3 mg/kg 6/6 7/8 0/8
6 pertuzumab + T-DM1 15 mg/kg + 0,3 mg/kg 6/6 5/8 0/8
7 pertuzumab + T-DM1 15 mg/kg + 1 mg/kg 5/5 8/8 0/8
8 pertuzumab + T-DM1 15 mg/kg + 3 mg/kg 8/8 8/8 0/8
Volumen Tumoral Medio (mm3)
+/- ETM
1500
1200
900
600
300
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Día
pertuzumab (IP)
Tampón de ADC (IV)
T-DM1 (IV)

Figura 10

		Dosis	TI	PR	CR
⊠	1 **Tampón de ADC**	---	9/9	0/9	0/9
○	2 5-FU	100 mg/kg	8/8	0/9	0/9
◇	3 pertuzumab	40 mg/kg	9/9	0/9	0/9
△	4 B20-4.1	5 mg/kg	8/8	0/9	0/9
▩	5 T-DM1	5 mg/kg	8/8	9/9	0/9
●	6 5-FU + T-DM1	100 mg/kg + 5 mg/kg	5/5	9/9	0/9
◆	7 pertuzumab + T-DM1	40 mg/kg + 5 mg/kg	9/9	9/9	0/9
▲	8 B20-4.1 + T-DM1	5 mg/kg + 5 mg/kg	6/6	6/9	0/9
⊕	9 B20-4.1 + pertuzumab	5 mg/kg + 40 mg/kg	9/9	1/9	0/8

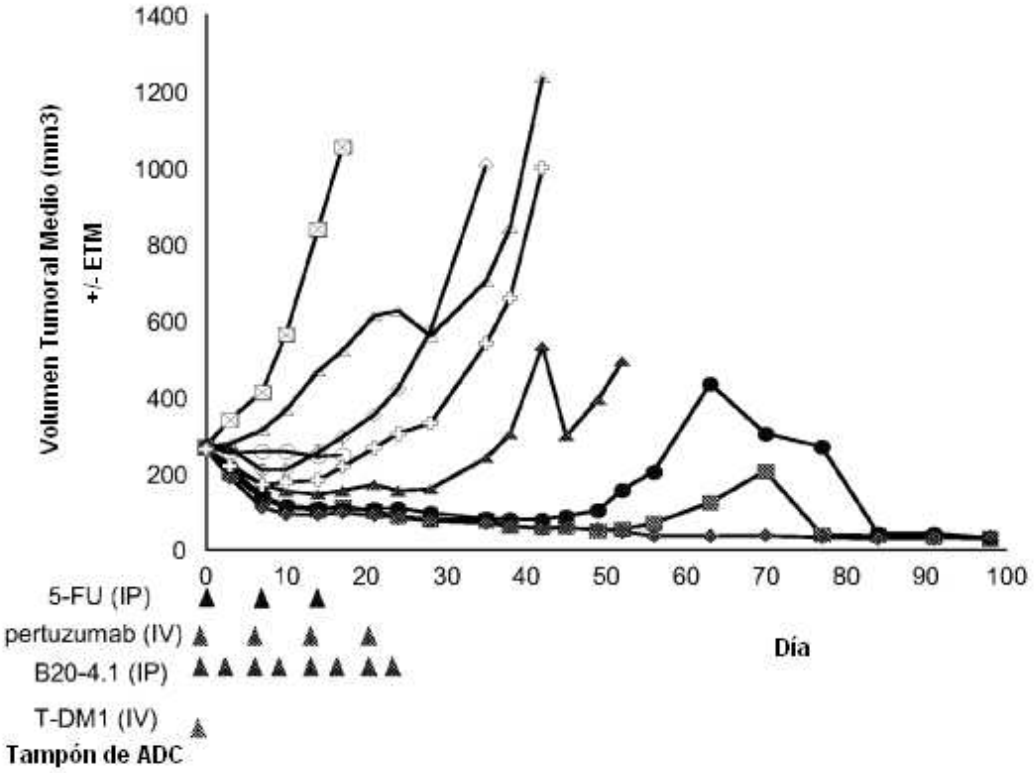


Figura 11

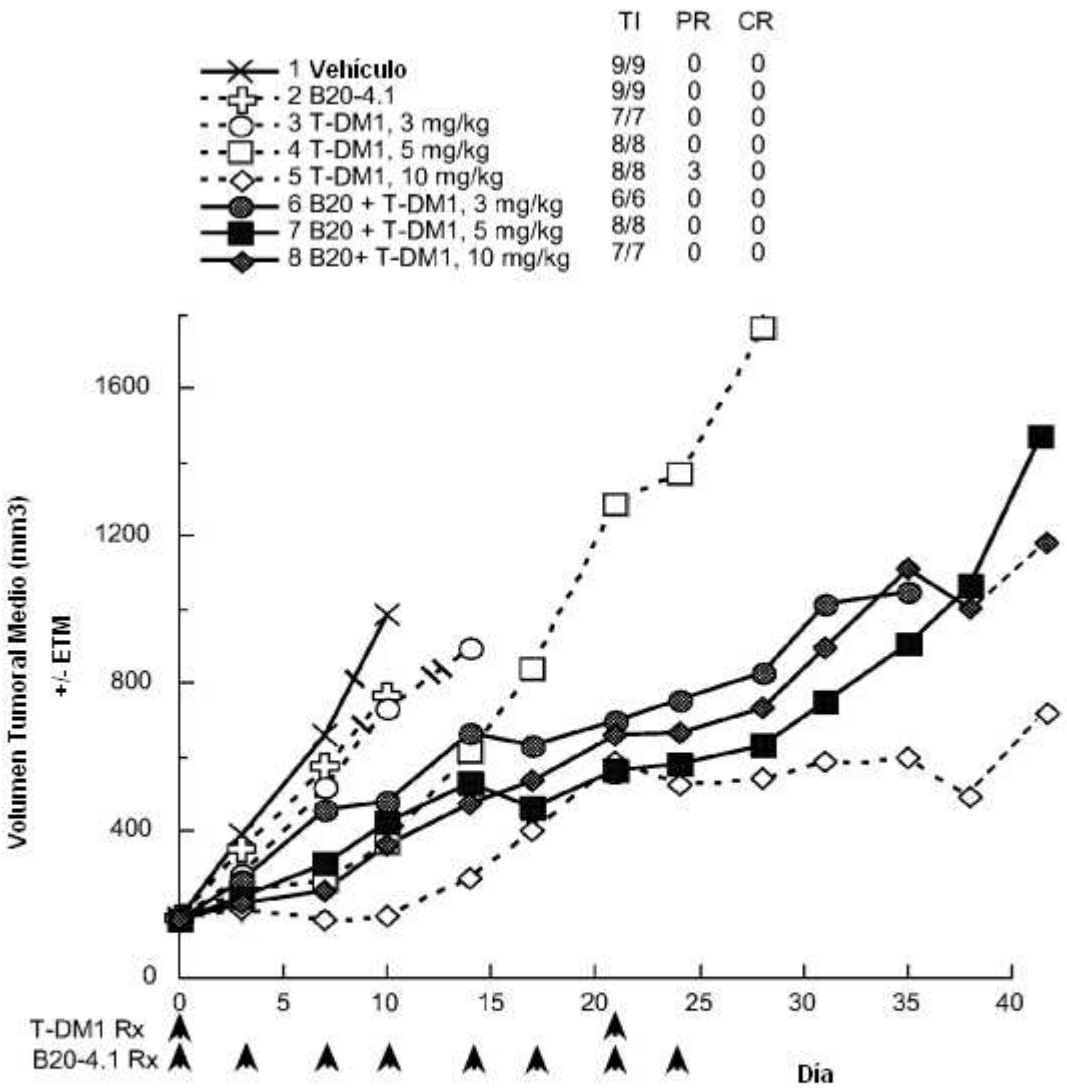

TI PR CR
1 Vehículo 9/9 0 0
2 B20-4.1 9/9 0 0
3 T-DM1, 3 mg/kg 7/7 0 0
4 T-DM1, 5 mg/kg 8/8 0 0
5 T-DM1, 10 mg/kg 8/8 3 0
6 B20 + T-DM1, 3 mg/kg 6/6 0 0
7 B20 + T-DM1, 5 mg/kg 8/8 0 0
8 B20+ T-DM1, 10 mg/kg 7/7 0 0
Volumen Tumoral Medio (mm3)
+/- ETM
1600
1200
800
400
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
T-DM1 Rx
B20-4.1 Rx
Día

Figura 12

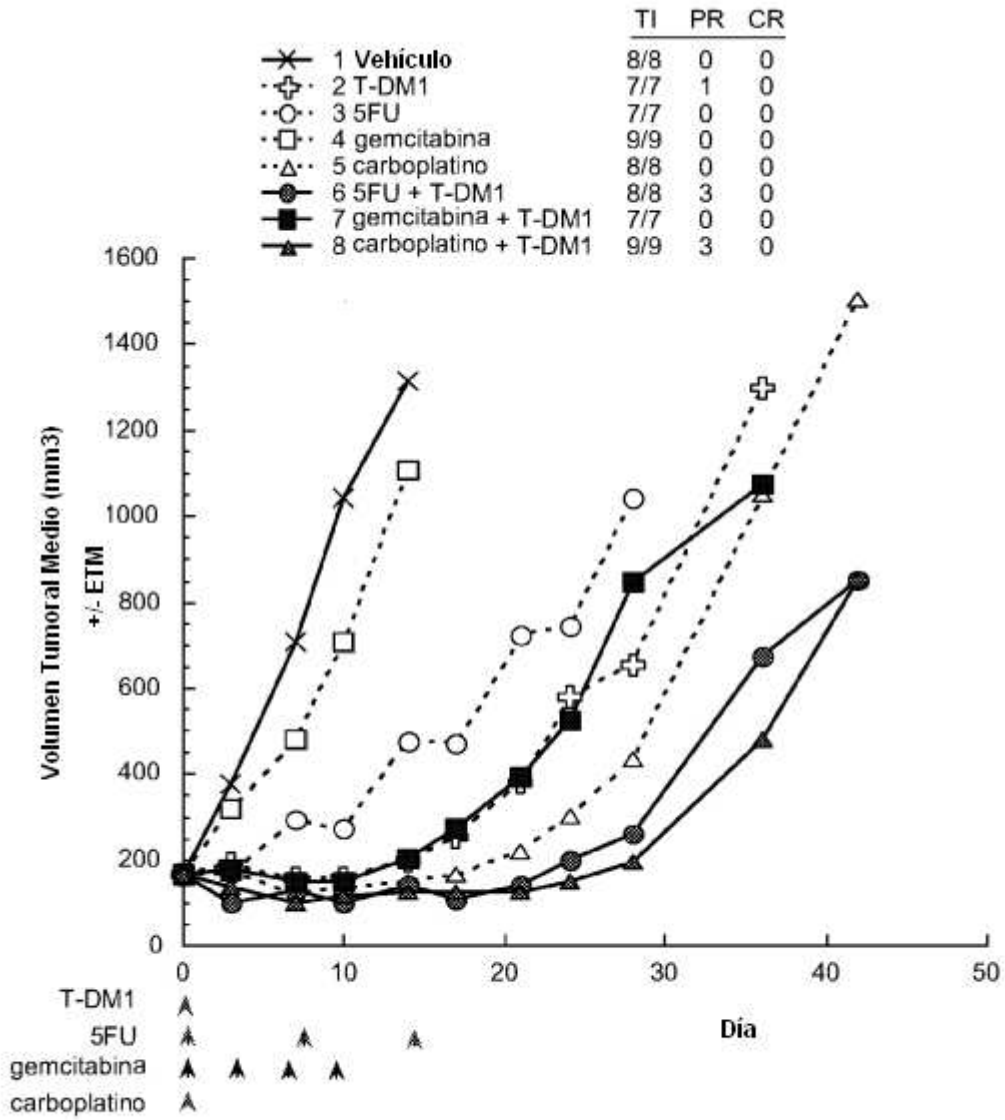

TI PR CR
1 Vehículo 8/8 0 0
2 T-DM1 7/7 1 0
3 5FU 7/7 0 0
4 gemcitabina 9/9 0 0
5 carboplatino 8/8 0 0
6 5FU + T-DM1 8/8 3 0
7 gemcitabina + T-DM1 7/7 0 0
8 carboplatino + T-DM1 9/9 3 0
Volumen Tumoral Medio (mm3)
+/- ETM
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Día
T-DM1
5FU
gemcitabina
carboplatino

Figura 13

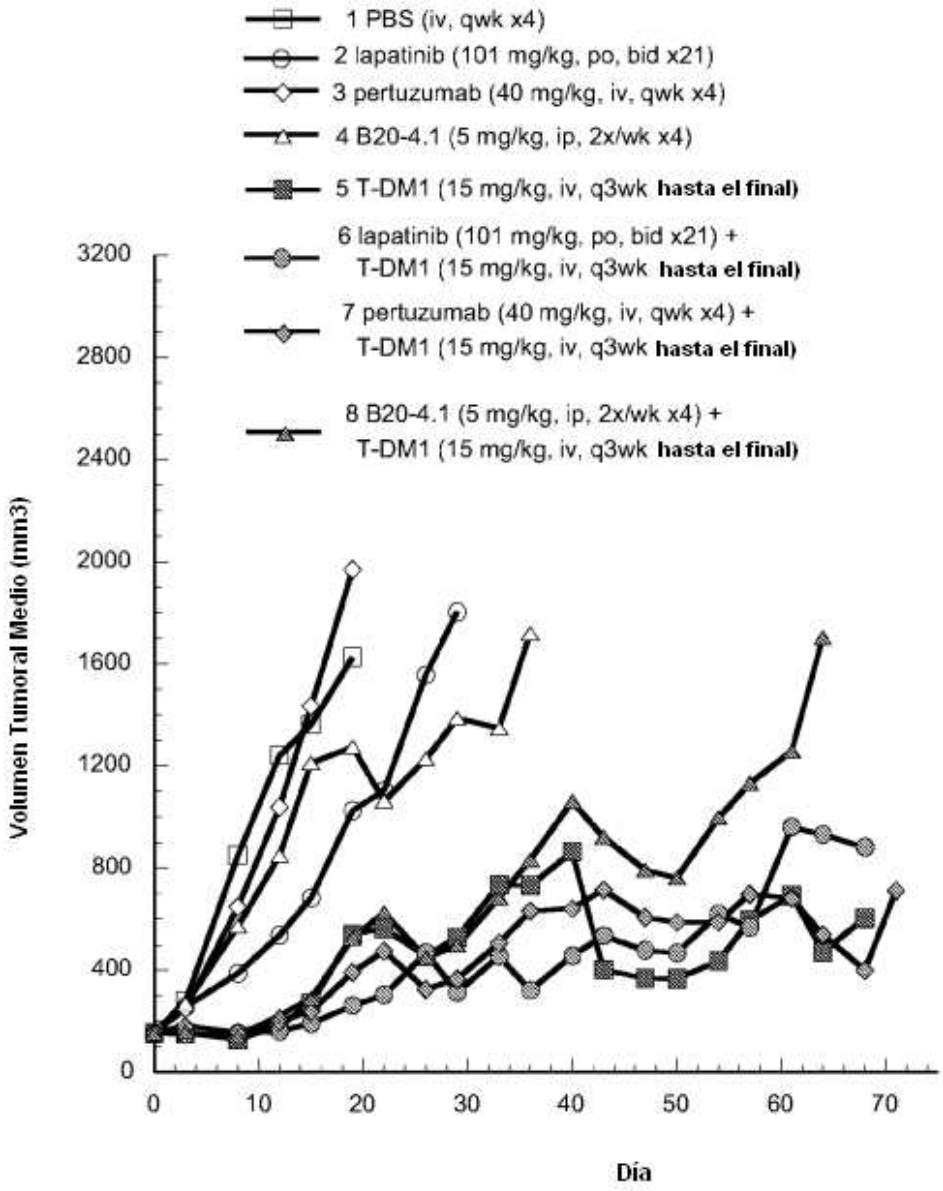

1 PBS (iv, qwk x4)
2 lapatinib (101 mg/kg, po, bid x21)
3 pertuzumab (40 mg/kg, iv, qwk x4)
4 B20-4.1 (5 mg/kg, ip, 2x/wk x4)
5 T-DM1 (15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final)
6 lapatinib (101 mg/kg, po, bid x21) + T-DM1 (15 mg/kg, iv, q3wk hasta el final)
7 pertuzumab (40 mg/kg, iv, qwk x4) + T-DM1 (15 mg/kg, 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)
Volumen Tumoral Medio (mm3)
3200
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Día

Figura 14

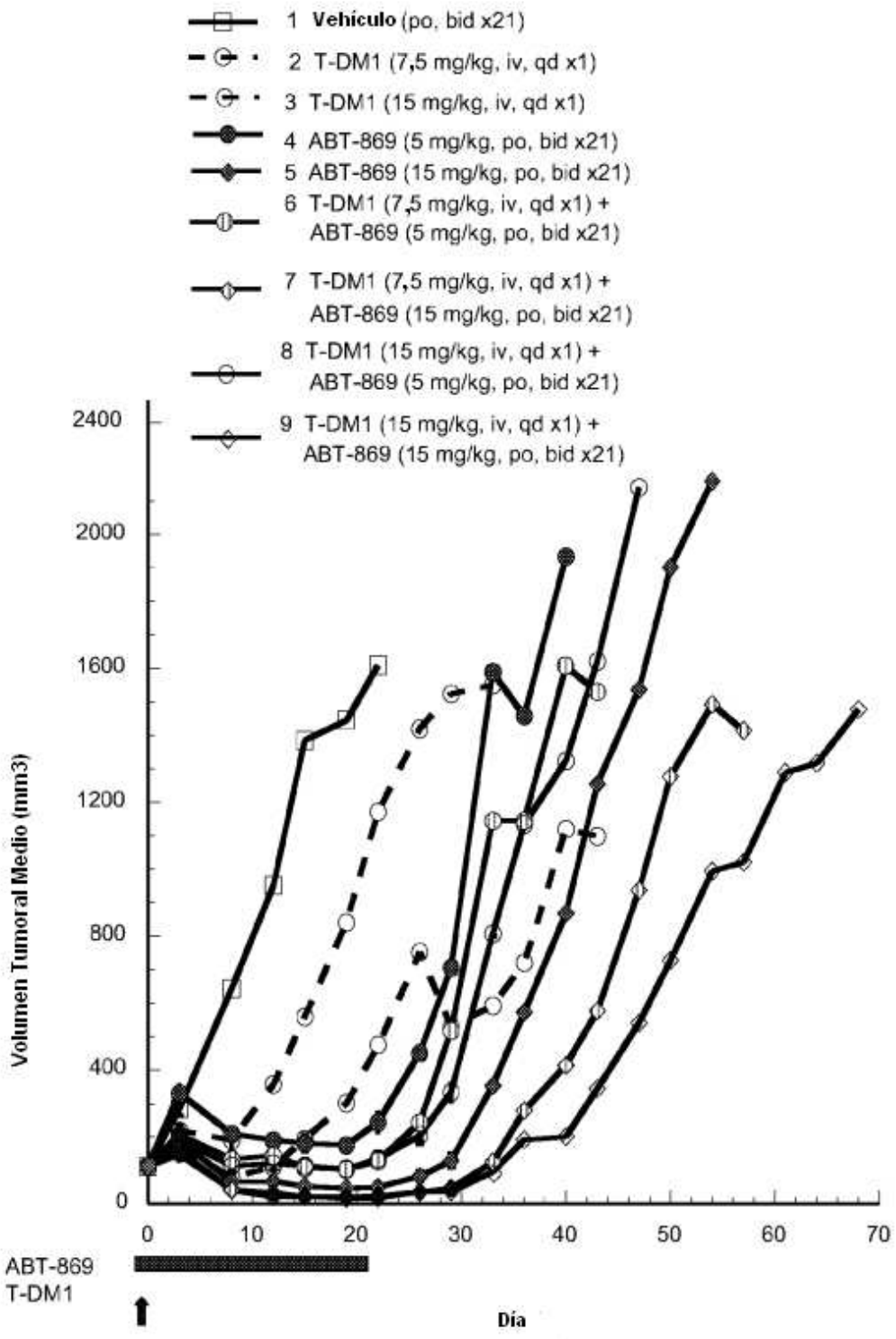

1 Vehículo (po, bid x21)
2 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, qd x1)
3 T-DM1 (15 mg/kg, iv, qd x1)
4 ABT-869 (5 mg/kg, po, bid x21)
5 ABT-869 (15 mg/kg, po, bid x21)
6 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, qd x1) + ABT-869 (5 mg/kg, po, bid x21)
7 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, qd x1) + ABT-869 (15 mg/kg, po, bid x21)
8 T-DM1 (15 mg/kg, 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)
Volumen Tumoral Medio (mm3)
2400
2000
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
60
70
ABT-869
T-DM1
Día

Figura 15

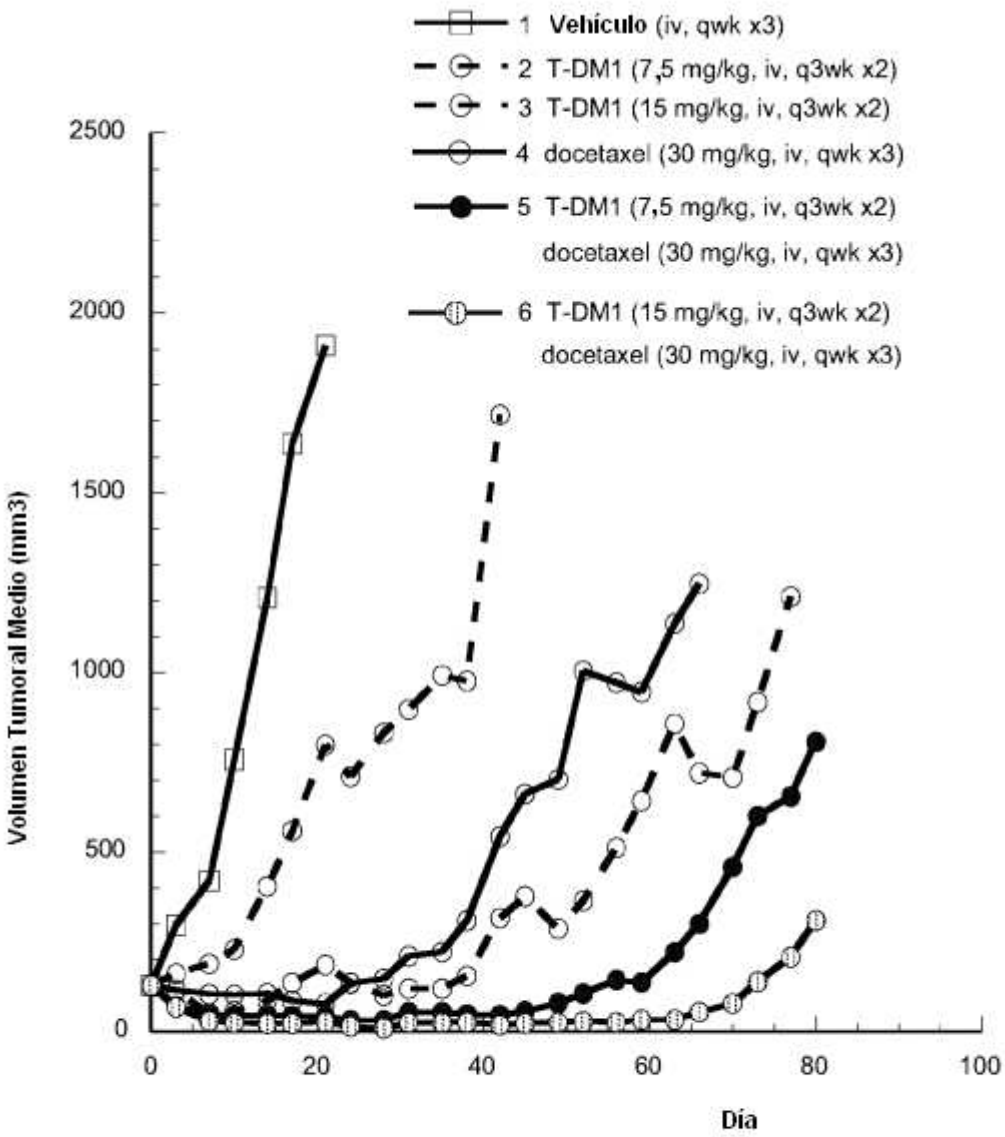

1 Vehículo (iv, qwk x3)
2 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, q3wk x2)
3 T-DM1 (15 mg/kg, iv, q3wk x2)
4 docetaxel (30 mg/kg, iv, qwk x3)
5 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, q3wk x2)
docetaxel (30 mg/kg, iv, qwk x3)
6 T-DM1 (15 mg/kg, iv, q3wk x2)
docetaxel (30 mg/kg, iv, qwk x3)
Volumen Tumoral Medio (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
Día

Figura 16

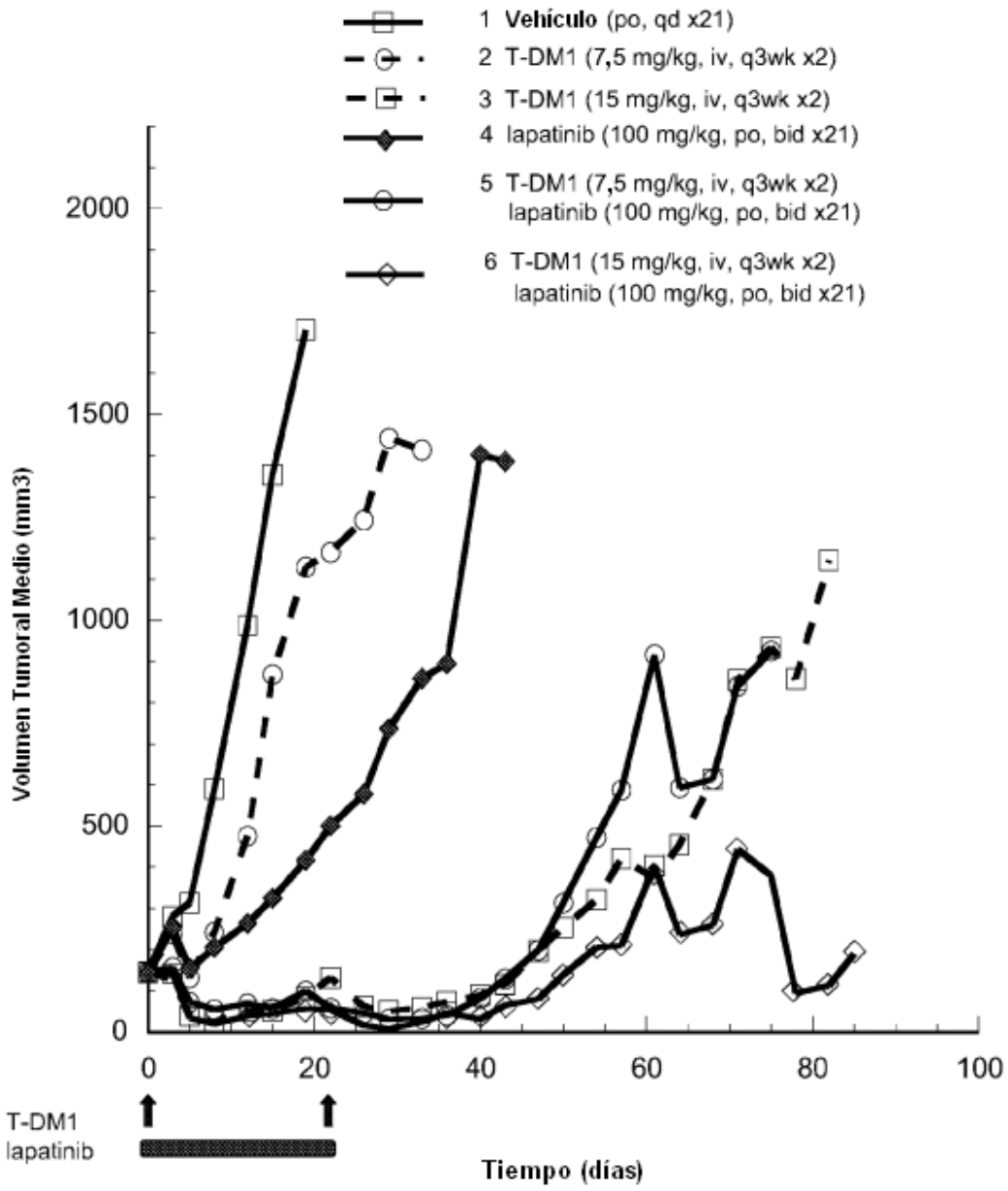

1 Vehículo (po, qd x21)
2 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, q3wk x2)
3 T-DM1 (15 mg/kg, iv, q3wk x2)
4 lapatinib (100 mg/kg, po, bid x21)
5 T-DM1 (7,5 mg/kg, iv, q3wk x2)
lapatinib (100 mg/kg, po, bid x21)
6 T-DM1 (15 mg/kg, iv, q3wk x2)
lapatinib (100 mg/kg, po, bid x21)
Volumen Tumoral Medio (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
T-DM1
lapatinib
Tiempo (días)

Figura 17

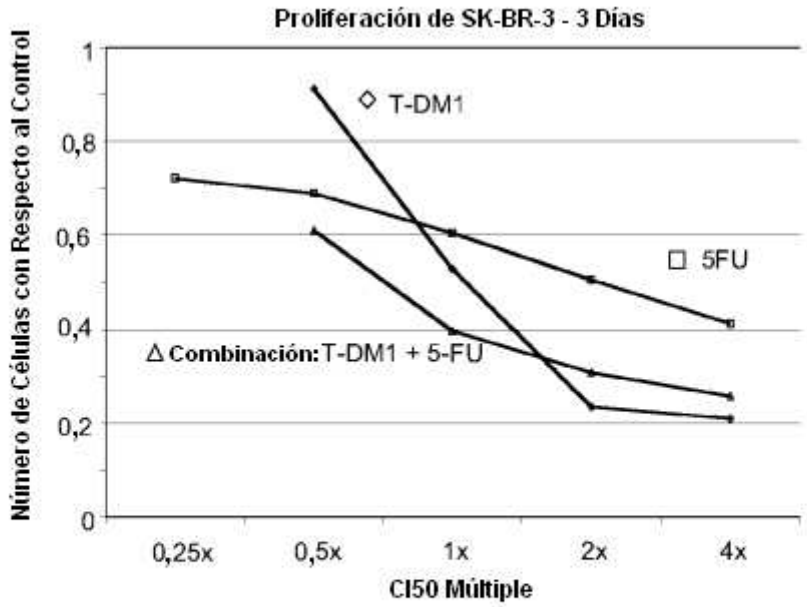


Figura 18

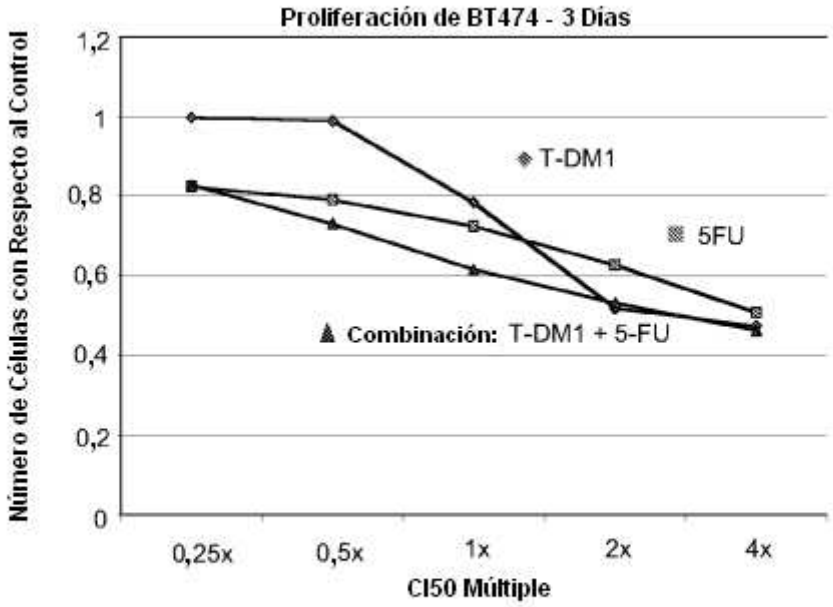


Figura 19

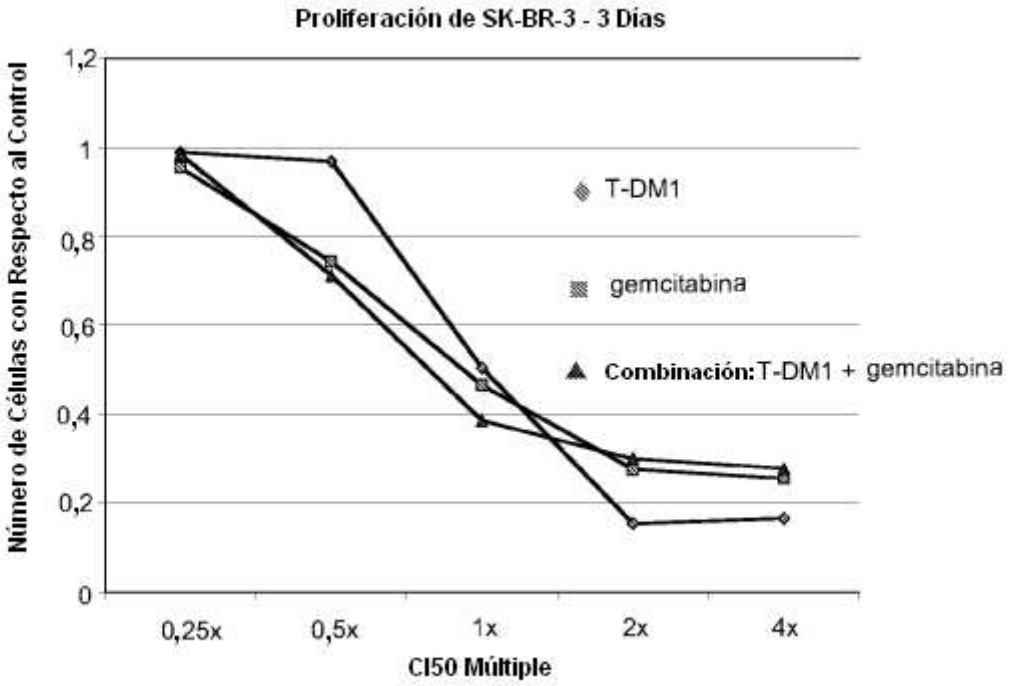


Figura 20

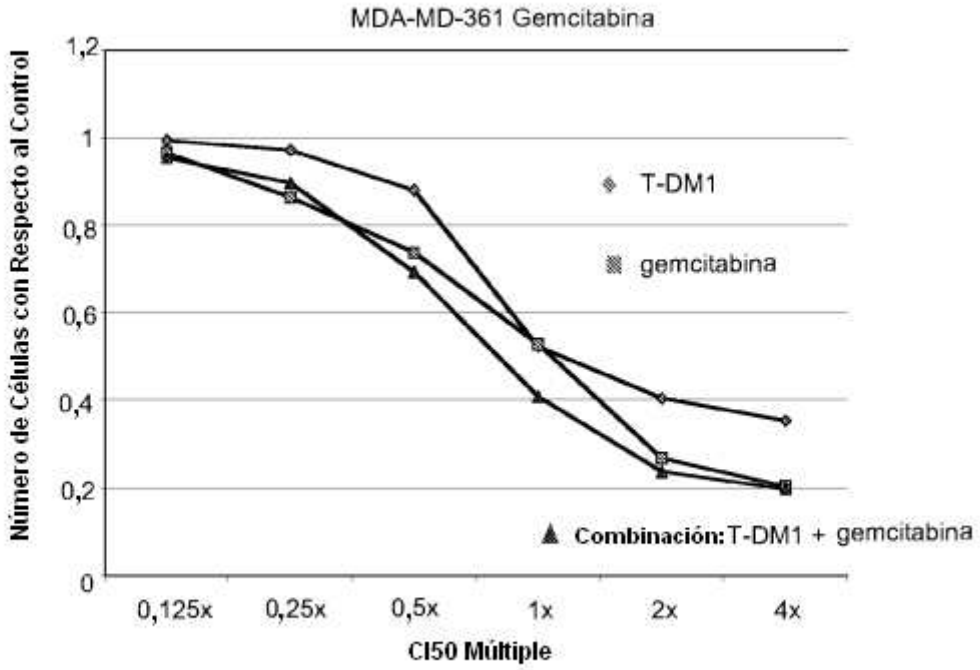


Figura 21

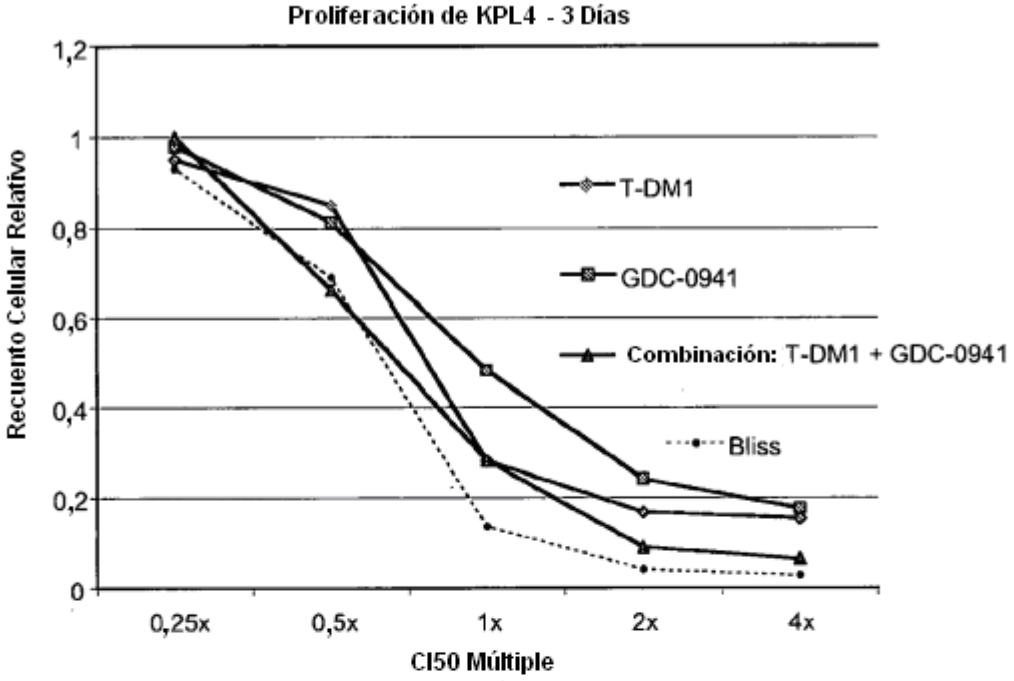


Figura 22

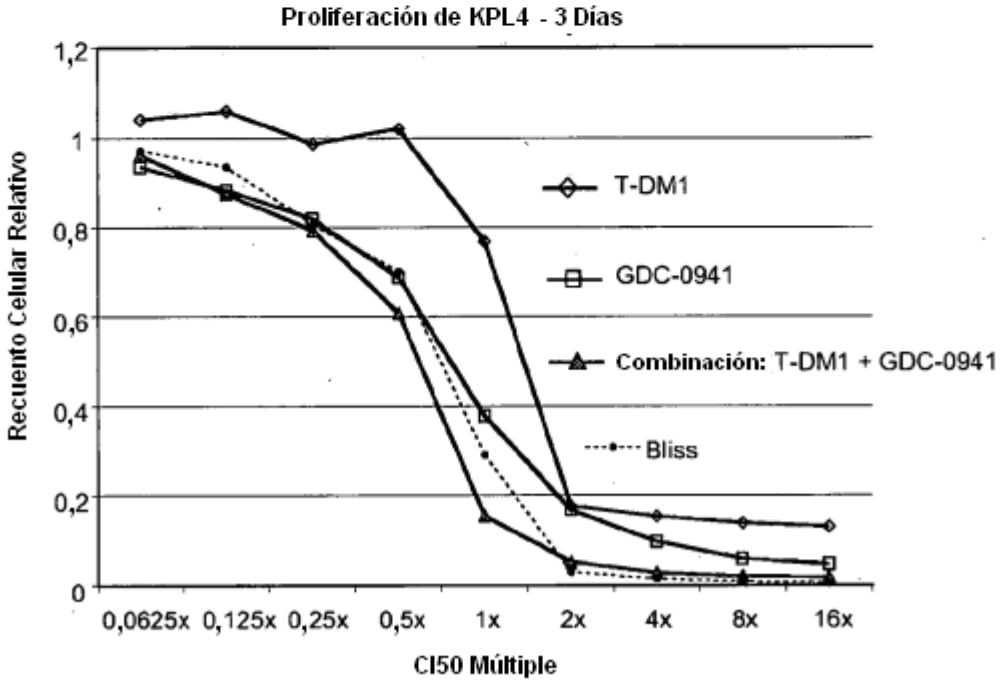


Figura 23

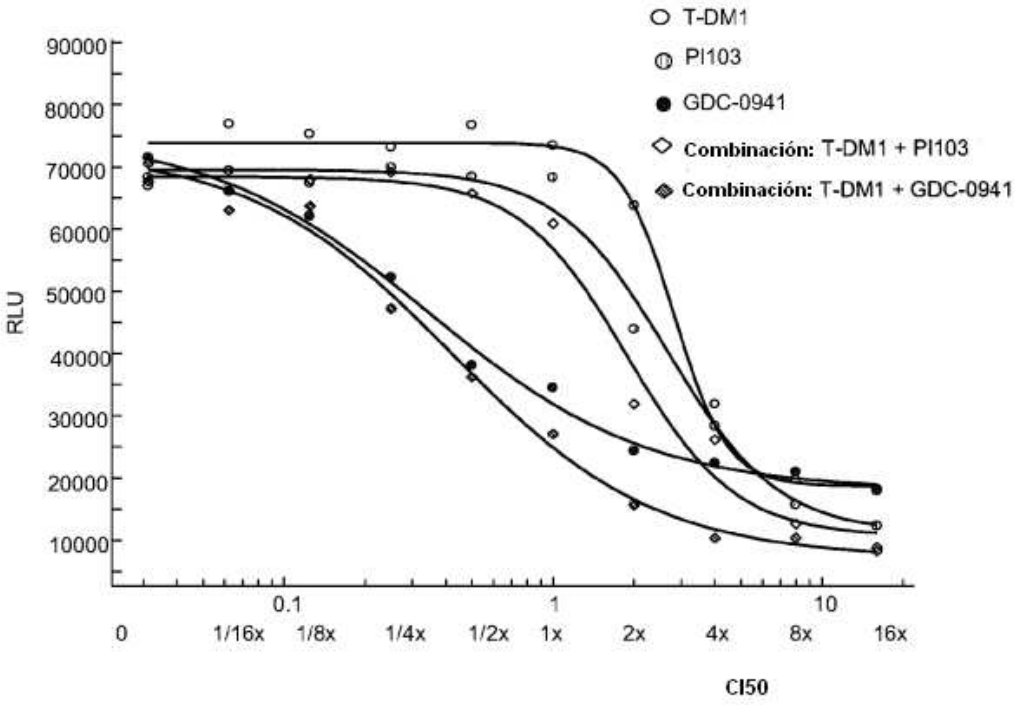

T-DM1
PI103
GDC-0941
Combinación: T-DM1 + PI103
Combinación: T-DM1 + GDC-0941
RLU
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.1
1
10
1/16x
1/8x
1/4x
1/2x
1x
2x
4x
8x
16x
CI50

Figura 24

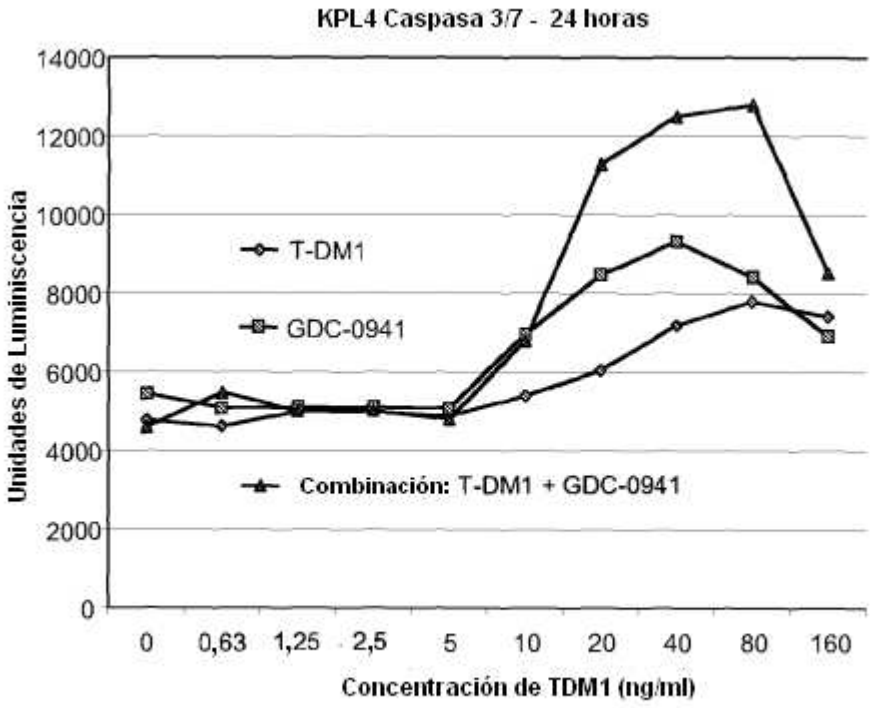


Figura 25

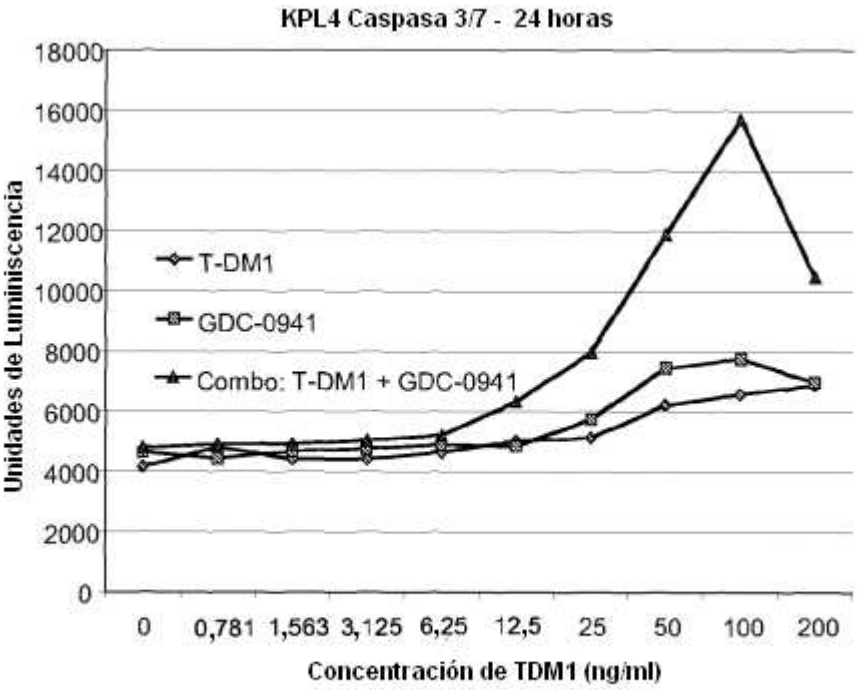


Figura 26

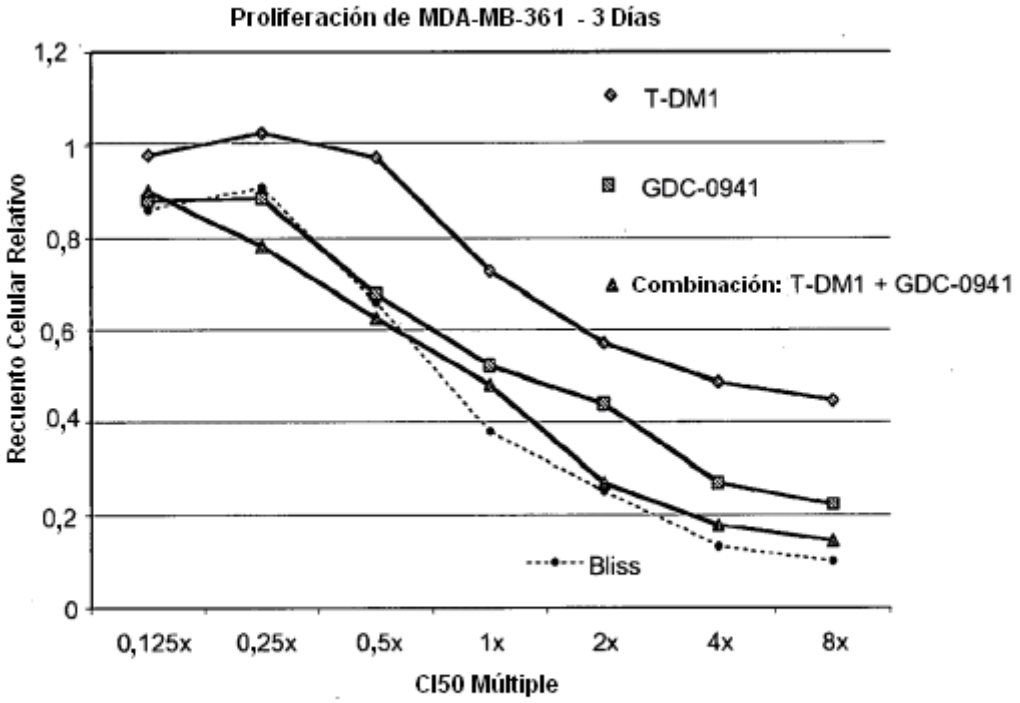


Figura 27

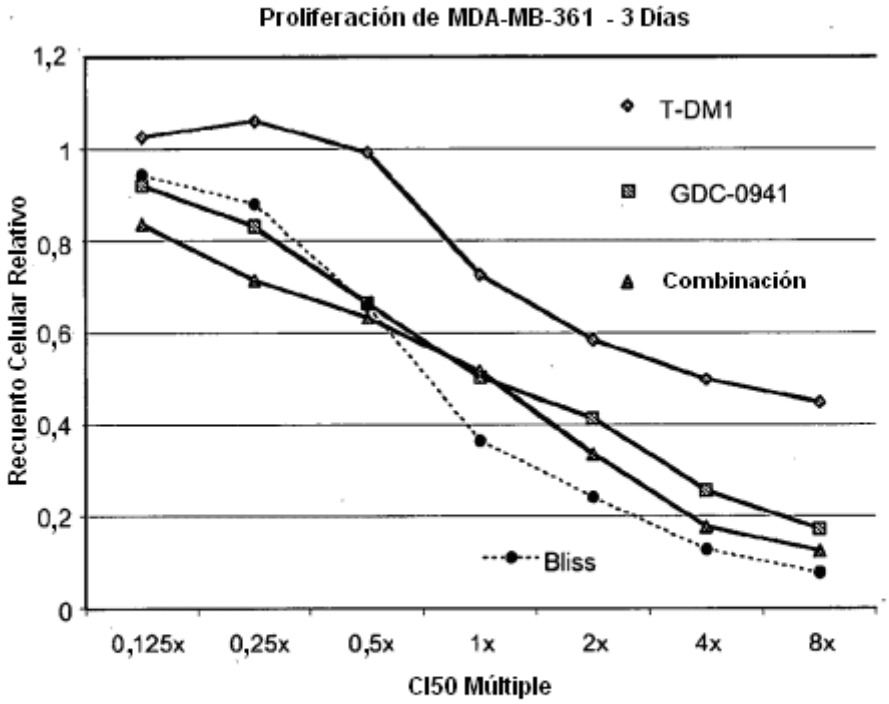


Figura 28

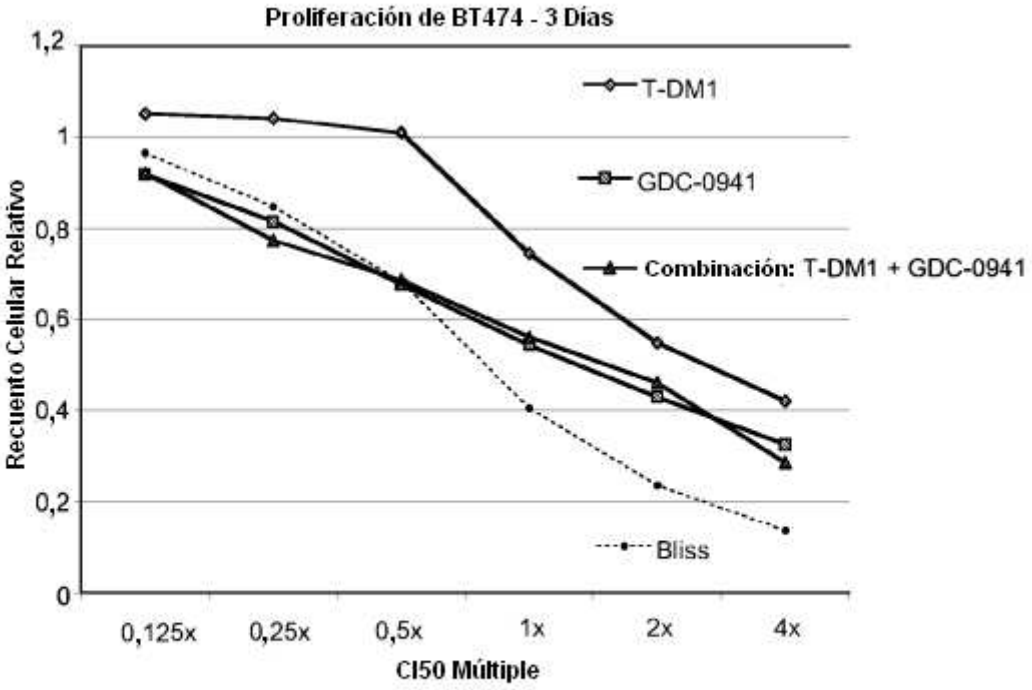


Figura 29

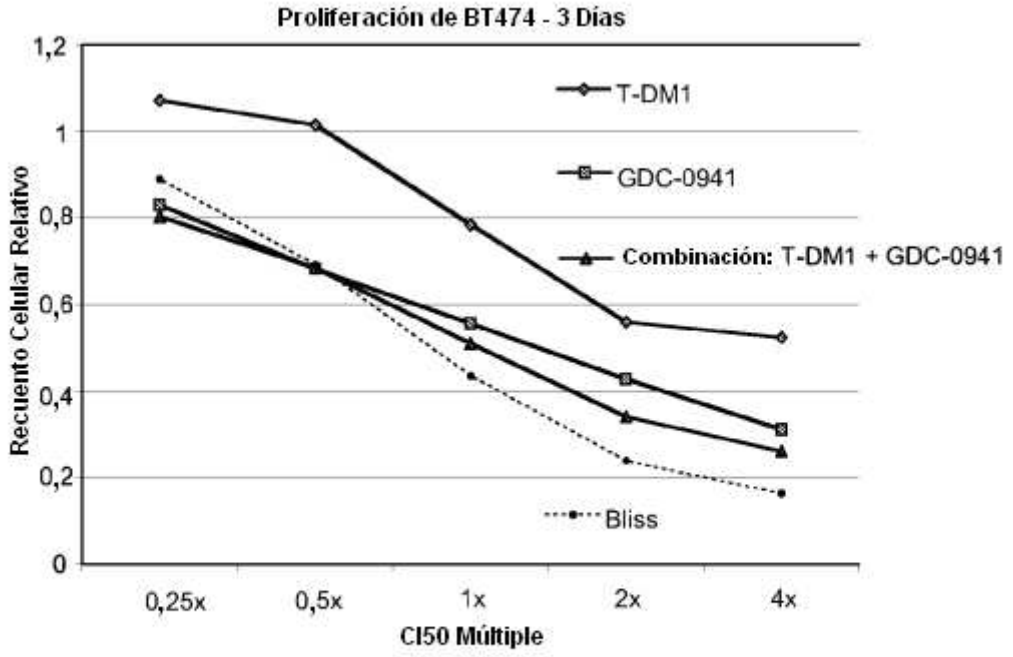


Figura 30

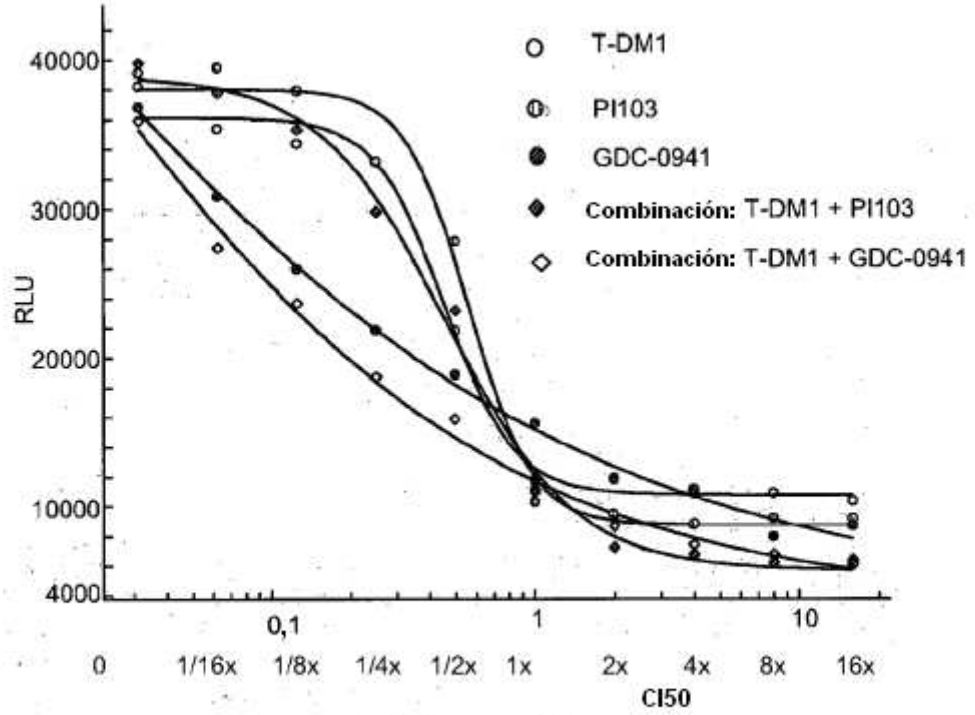


Figura 31

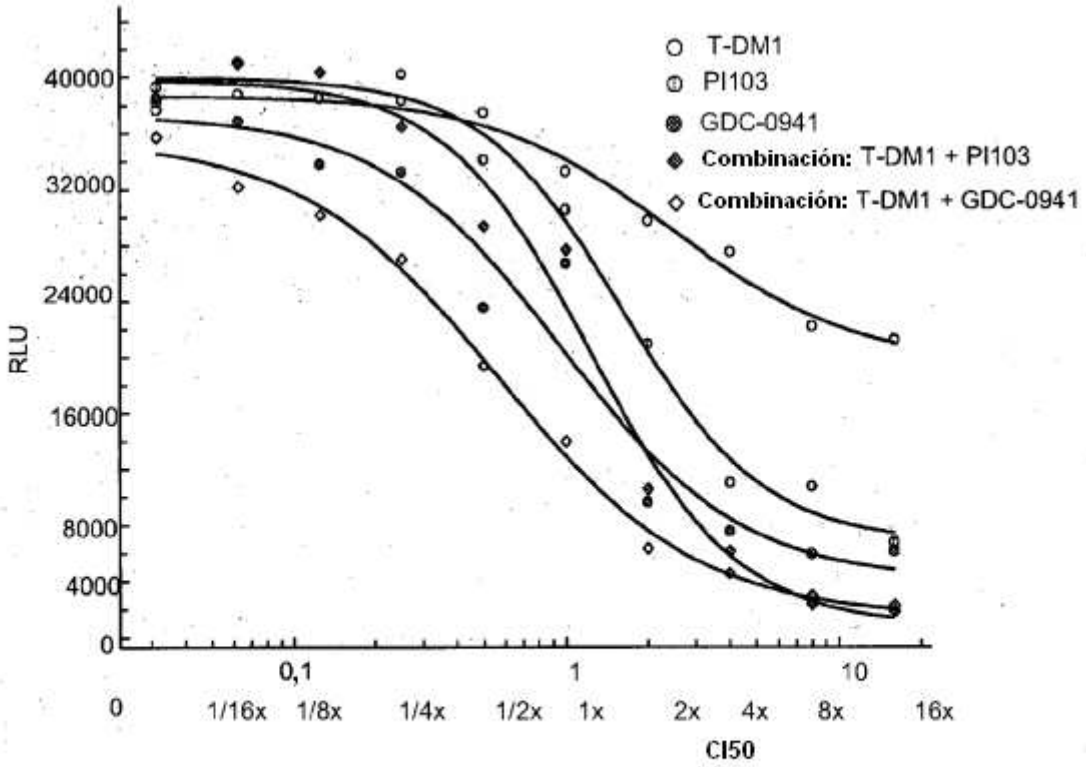


Figura 32

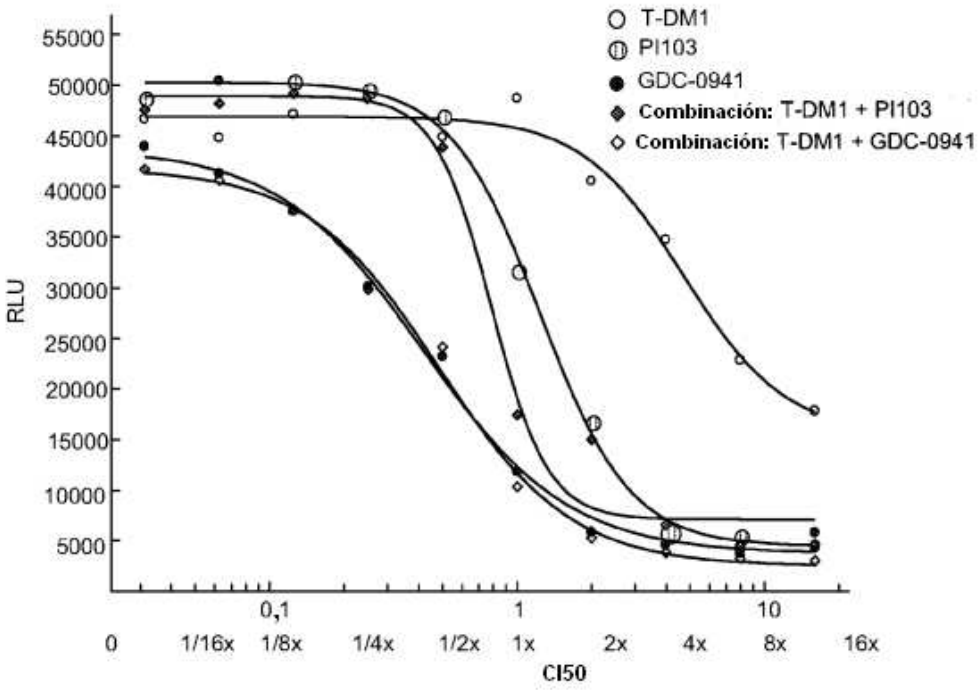

T-DM1
PI103
GDC-0941
Combinación: T-DM1 + PI103
Combinación: T-DM1 + GDC-0941
RLU
55000
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,1
1
10
1/16x
1/8x
1/4x
1/2x
1x
2x
4x
8x
16x
CI50

Figura 33

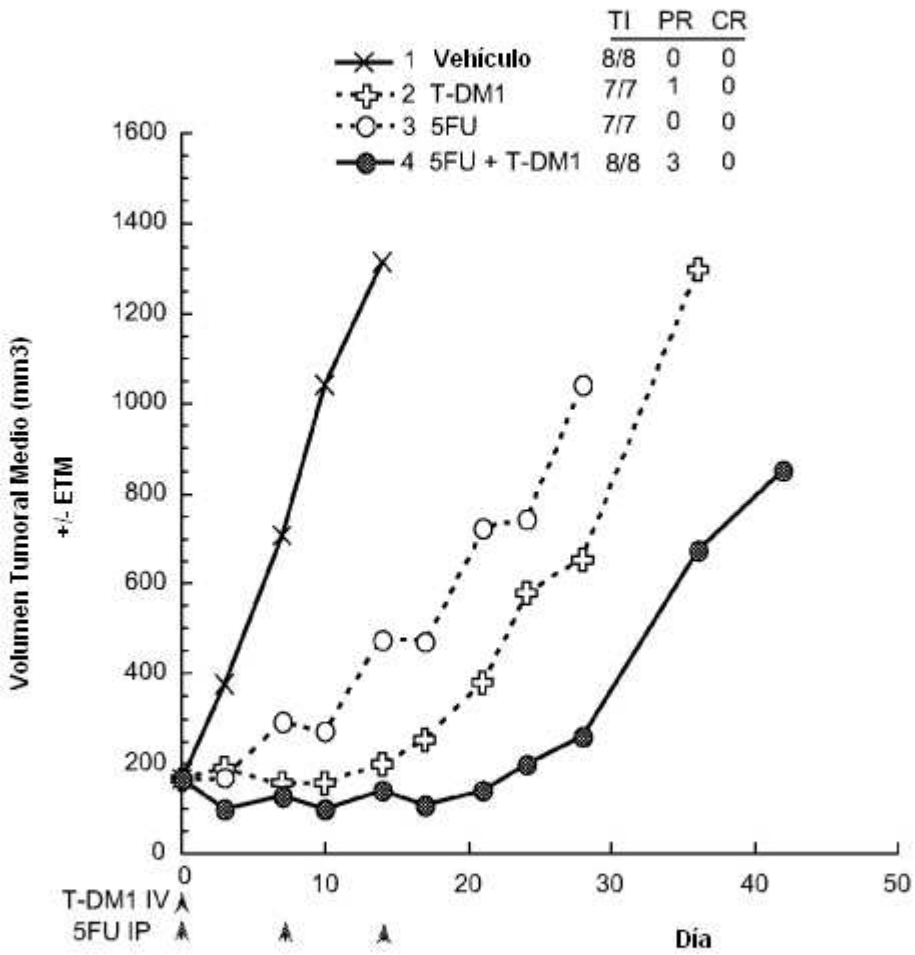

TI PR CR
1 Vehículo 8/8 0 0
2 T-DM1 7/7 1 0
3 5FU 7/7 0 0
4 5FU + T-DM1 8/8 3 0
Volumen Tumoral Medio (mm3)
+/- ETM
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
T-DM1 IV
5FU IP
Día

Figura 34

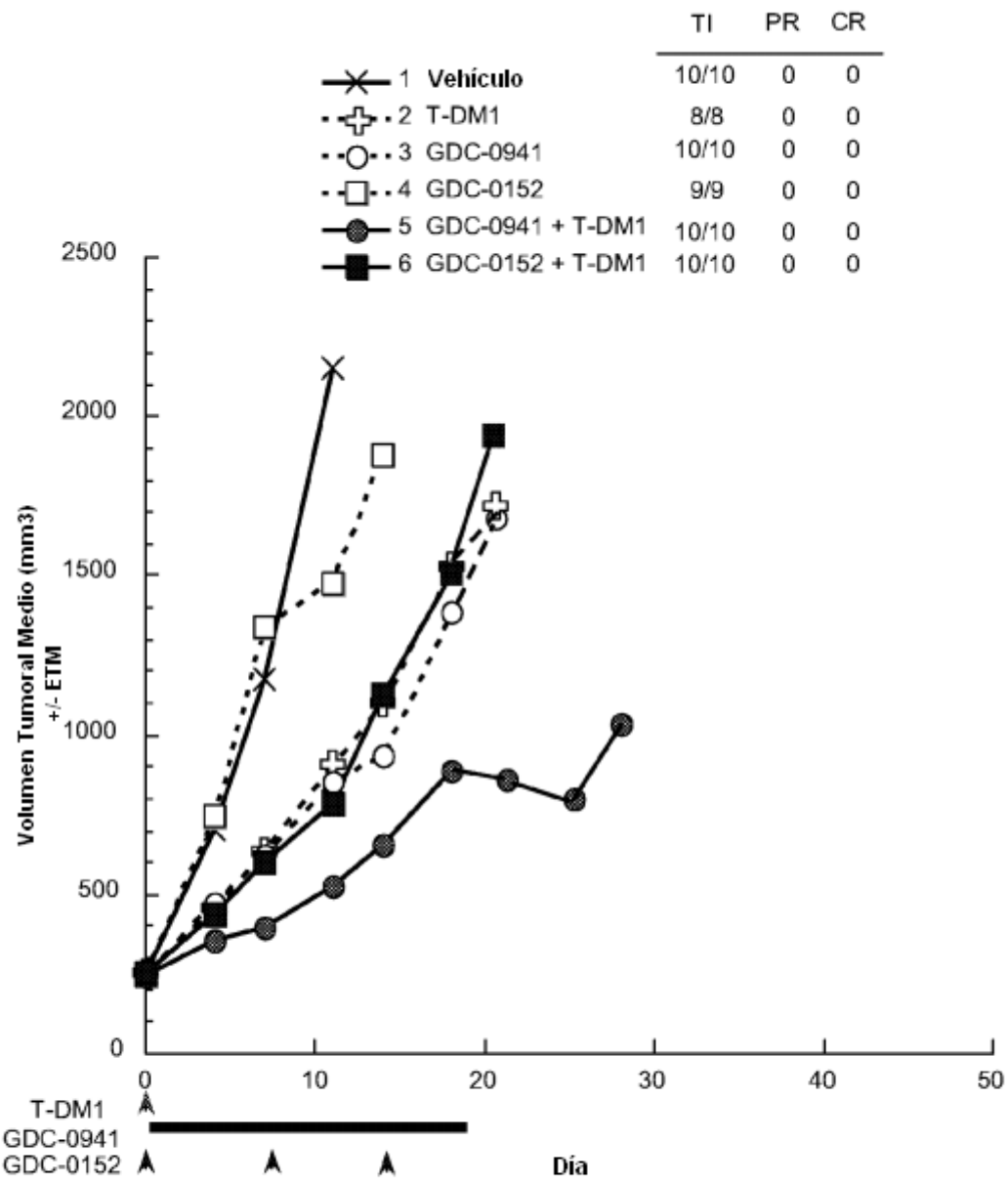

TI PR CR
1 Vehículo 10/10 0 0
2 T-DM1 8/8 0 0
3 GDC-0941 10/10 0 0
4 GDC-0152 9/9 0 0
5 GDC-0941 + T-DM1 10/10 0 0
6 GDC-0152 + T-DM1 10/10 0 0
Volumen Tumoral Medio (mm3) +/- ETM
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
T-DM1
GDC-0941
GDC-0152
Día

Figura 35

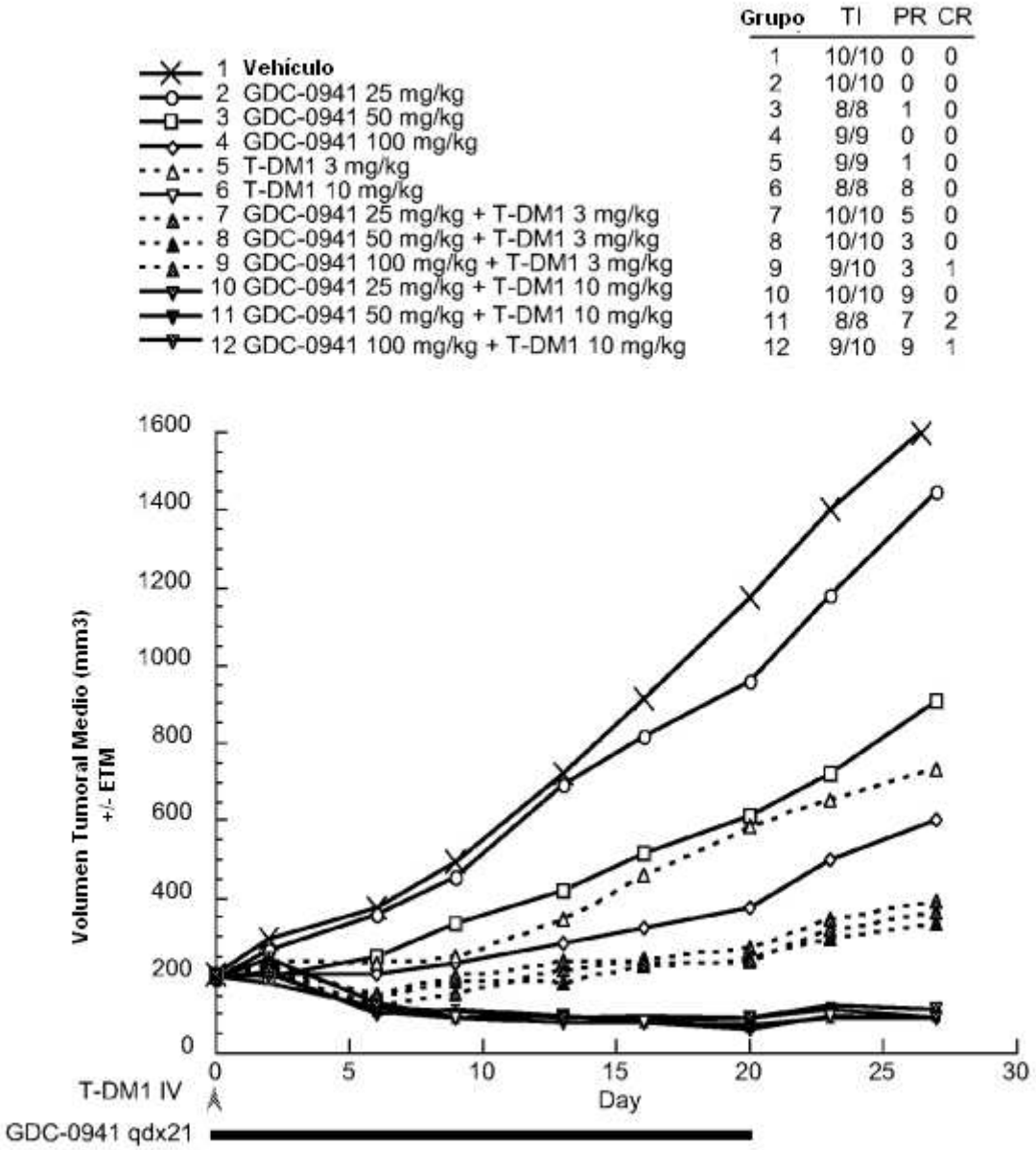

1 Vehículo
2 GDC-0941 25 mg/kg
3 GDC-0941 50 mg/kg
4 GDC-0941 100 mg/kg
5 T-DM1 3 mg/kg
6 T-DM1 10 mg/kg
7 GDC-0941 25 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg
8 GDC-0941 50 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg
9 GDC-0941 100 mg/kg + T-DM1 3 mg/kg
10 GDC-0941 25 mg/kg + T-DM1 10 mg/kg
11 GDC-0941 50 mg/kg + T-DM1 10 mg/kg
12 GDC-0941 100 mg/kg + T-DM1 10 mg/kg
Grupo TI PR CR
1 10/10 0 0
2 10/10 0 0
3 8/8 1 0
4 9/9 0 0
5 9/9 1 0
6 8/8 8 0
7 10/10 5 0
8 10/10 3 0
9 9/10 3 1
10 10/10 9 0
11 8/8 7 2
12 9/10 9 1
Volumen Tumoral Medio (mm3)
+/- ETM
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
Day
T-DM1 IV
GDC-0941 qdx21

Figura 36

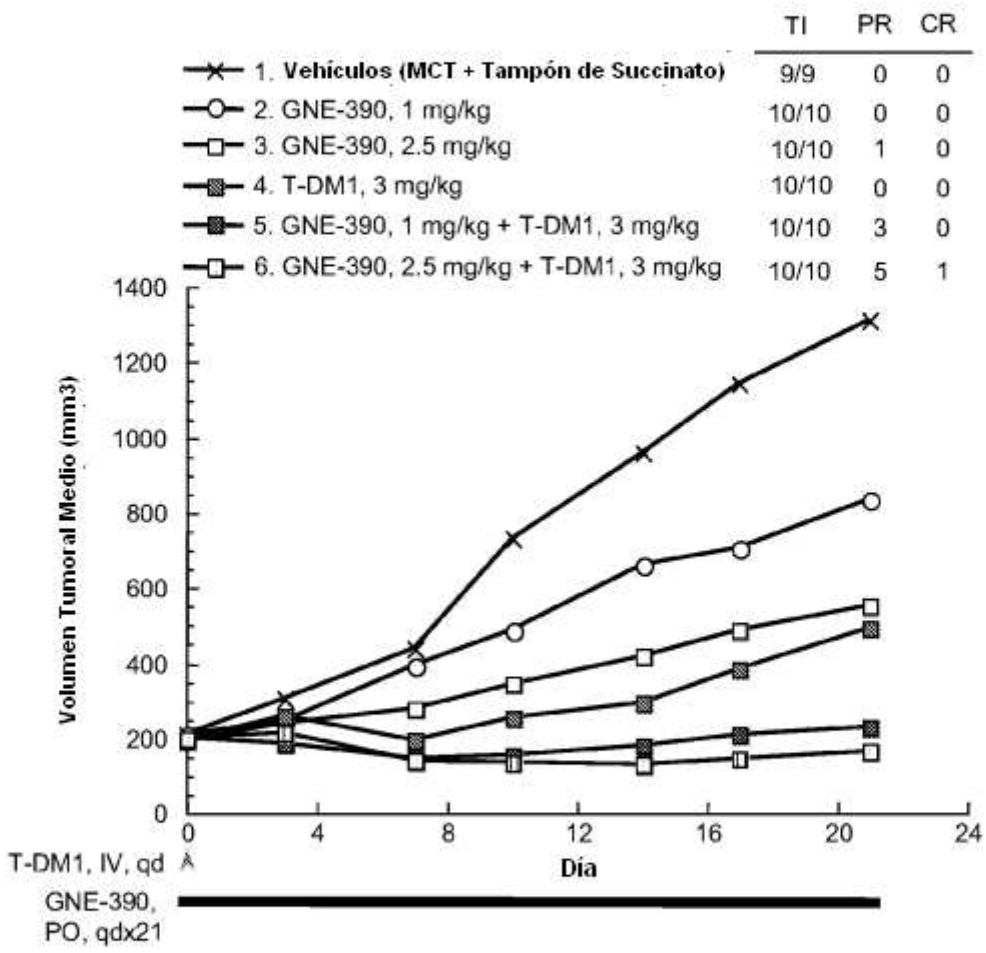

TI PR CR
1. Vehículos (MCT + Tampón de Succinato) 9/9 0 0
2. GNE-390, 1 mg/kg 10/10 0 0
3. GNE-390, 2.5 mg/kg 10/10 1 0
4. T-DM1, 3 mg/kg 10/10 0 0
5. GNE-390, 1 mg/kg + T-DM1, 3 mg/kg 10/10 3 0
6. GNE-390, 2.5 mg/kg + T-DM1, 3 mg/kg 10/10 5 1
Volumen Tumoral Medio (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
Día
T-DM1, IV, qd
GNE-390, PO, qdx21

Figura 37