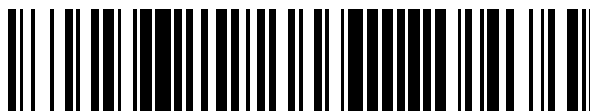


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 377**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2016 PCT/US2016/041184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17007846**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2016 E 16741212 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3319995**

54 Título: **Politerapia con un conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco y un inhibidor de bcl-2**

30 Prioridad:

07.07.2015 US 201562189610 P

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

15.11.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**PHILLIPS, GAIL LEWIS;
SAMPATH, DEEPAK y
WERTZ, INGRID**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 731 377 T3

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

DESCRIPCIÓN

Politerapia con un conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco y un inhibidor de bcl-2

5 **Campo técnico**

La presente invención está dirigida a una politerapia que implica un conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco y un inhibidor de Bcl-2 para el tratamiento del cáncer. En un aspecto particular, la divulgación se refiere a los procedimientos de uso de trastuzumab-MCC-DM1 (trastuzumab emtansina; KADCYLA®) y un inhibidor de Bcl-2 selectivo para el tratamiento del cáncer positivo para HER2, tal como el cáncer de mama o el cáncer gástrico positivo para HER2.

Antecedentes

Los conjugados anticuerpo anti-HER2-fármaco (T-DM1) combinados con el inhibidor de PI3K GDC-0941 para el tratamiento de tumores mamarios se conocen por el documento WO2009117277.

La combinación de Herceptin (trastuzumab) y el inhibidor de bcl-2 ABT-737 en la reducción de la proliferación celular de células tumorales de mama (resistentes a Herceptin) se enseña en Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 9, 2011, 184-190.

Conjugados anticuerpo anti-HER2-fármaco

El receptor tirosina cinasa HER2 (ErbB2) es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de receptores transmembranarios. La sobreexpresión de HER2 se observa en aproximadamente un 20 % de los cánceres de mama humanos (a continuación en el presente documento denominado cáncer de mama positivo para HER2) y está implicada en el crecimiento invasor y los resultados clínicos deficientes asociados con estos tumores (Slamon *et al* (1987) Science 235:177-182). La sobreexpresión de la proteína HER2 se puede determinar usando una evaluación basada en inmunohistoquímica de bloques tumorales fijados (Press MF, *et al* (1993) Cancer Res 53:4960-70).

Trastuzumab (CAS 180288-69-1, HERCEPTIN®, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) es un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa derivado de ADN recombinante que es una versión humanizada de un anticuerpo anti-HER2 murino (4D5) que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de HER2 (documentos US 5677171; US 5821337; US 6054297; US 6165464; US 6339142; US 6407213; US 6639055; US 6719971; US 6800738; US 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). Se ha demostrado que trastuzumab, tanto en ensayos *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). Trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, 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), Suppl 12:60-70; Yarden Y. y Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Macmillan Magazines, Ltd., vol. 2:127-137).

HERCEPTIN® se aprobó en 1998 para el tratamiento de pacientes con cánceres de mama metastásicos con sobreexpresión de HER2 (Baselga *et al*, (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744) que han recibido un tratamiento antineoplásico anterior extenso, 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: 265-74; Romond EH, *et al*. TN 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 (Suppl 1): 52). En 2006, la FDA aprobó HERCEPTIN® (trastuzumab, Genentech Inc.) como parte de un régimen de tratamiento que contenía doxorubicina, ciclofosfamida y paclitaxel para el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de mama con afectación ganglionar positivo para HER2.

Un enfoque alternativo al tratamiento dirigido a anticuerpos es utilizar anticuerpos para la administración de fármacos citotóxicos específicamente para células cancerosas que expresan antígeno. Los conjugados anticuerpo-fármaco, o CAF, son anticuerpos monoclonales a los cuales se han conjugado agentes citotóxicos altamente potentes. Los CAF representan un enfoque novedoso para conferir selectividad tumoral en los tratamientos antitumorales administrados sistémicamente. Utilizando antígenos de superficie que son específicos de tumores y/o están sobreexpresados, los CAF se diseñan para centrarse en la administración de agentes citotóxicos altamente potentes para las células tumorales. El potencial de este enfoque es crear un margen terapéutico más favorable para dichos agentes que el que se podría lograr con su administración como fármacos libres.

Los maitansinoides, derivados del fármaco antimetabólico maitansina, se unen a los microtúbulos de manera similar a 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. DM1 es un maitansinoide que contiene tiol derivado del éster natural ansamitocina P3

(Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, *et al.* (1975) *Science* 189(4207):1002-1005.3; Cassady JM, Chan KK, Floss HG. (2004) *Chem Pharm Bull* 52(1):1-26.4). El éster vegetal relacionado, la maitansina, se ha estudiado como agente quimioterápico en aproximadamente 800 pacientes, administrado a una dosis de 2,0 mg/m² cada 3 semanas como una dosis única o bien durante 3 días consecutivos (Issell BF, Crooke ST. (1978) *Maytansine*. *Cancer Treat Rev* 5:199-207). A pesar de la actividad presintomática, la actividad de la maitansina en la sintomatología fue modesta en dosis que se podían administrar de manera segura. La toxicidad limitante de la dosis (TLD) fue gastrointestinal y consistió en náuseas, vómitos y diarrea (a menudo seguida de estreñimiento). Estas toxicidades fueron dependientes de la dosis pero no dependientes de la posología. Se informó de neuropatía periférica (predominantemente sensorial) y fue más evidente en pacientes con neuropatía preexistente. Se informó de elevaciones pasajeras asintomáticas de la transaminasa hepática, fosfatasa alcalina y bilirrubina total. Las toxicidades inespecíficas, que incluyen debilidad, letargo, disforia e insomnio, fueron comunes. Las toxicidades menos comunes incluyeron flebitis en el sitio de la infusión y mielodepresión leve. El desarrollo adicional del fármaco se abandonó en la década de 1980 debido al estrecho margen terapéutico.

Trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1, trastuzumab emtansina, ado-trastuzumab emtansina, KADCYLA®), un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) novedoso para el tratamiento del cáncer de mama positivo para HER2, está compuesto por el agente citotóxico DM1 (un agente antimicrotubular de maitansinoide que contiene tiol) conjugado a trastuzumab en las cadenas laterales de lisina por medio de un conector MCC, con una carga de fármaco promedio (proporción fármaco con respecto a anticuerpo) de 3,5. Después de unirse a HER2 expresado en células tumorales, el T-DM1 experimenta una internalización mediada por el receptor, dando como resultado la liberación intracelular de catabolitos que contienen DM1 citotóxicos y la muerte celular posterior.

En un estudio de fase I de T-DM1 (TDM3569g), la dosis máxima tolerada (DMT) de T-DM1 administrada por infusión i.v. cada 3 semanas (c3s) fue de 3,6 mg/kg. Una TLD (toxicidad limitante de la dosis) consistió en trombocitopenia pasajera en pacientes tratados con 4,8 mg/kg. El tratamiento con 3,6 mg/kg c3s fue bien tolerado y se asoció con una actividad sintomática significativa. (Krop (2010) *J. Clin. Oncol.* 28(16):2698-2704). Ese mismo estudio también mostró que la dosis semanal de 2,4 mg/kg también fue bien tolerada y tenía actividad antitumoral. (Beeram (2012) *Cancer* 118(23):5733-5740.)

Un estudio de fase II (TDM4374g) demostró que el T-DM1, administrado a 3,6 mg/kg c3s, tenía actividad antitumoral de agente único en una población de pacientes que habían recibido varios tratamientos con anterioridad que tenían cáncer de mama metastásico positivo para HER2. (Krop (2012) 30(26):3234-3241.) Un estudio de fase III (TDM4370g) demostró que el T-DM1, administrado a 3,6 mg/kg c3s, prolongó significativamente la supervivencia sin progresión y la supervivencia global con menos toxicidad en comparación con el tratamiento con lapatinib más capecitabina en pacientes con cáncer de mama terminal positivo para HER2 tratados previamente con trastuzumab y un taxano. (Verma (2012) *New England Journal of Medicine* 367:1783-1791.)

La Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. aprobó ado-trastuzumab emtansina, comercializada con el nombre comercial KADCYLA®, el 22 de febrero de 2013 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2 que previamente recibieron tratamiento con trastuzumab y un taxano.

Inhibidores de Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 regula la muerte celular programada desencadenada por señales de desarrollo y en respuesta a múltiples señales de estrés (Cory. S., y Adams, J.M., *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 647-656; Adams, Genes und Development 17 (2003) 2481-2495; Danial, N.N., y Korsmeyer, S.J., *Cell* 116 (2004) 205-219). Mientras que la supervivencia celular está promovida por el propio Bcl-2 y varios parientes cercanos (Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 y A1), que llevan tres o cuatro regiones conservadas de homología de Bcl-2 (BH), la apoptosis está impulsada por otras dos subfamilias. La señal inicial para la muerte celular se transmite por el grupo diverso de proteínas de solo BH3, incluyendo Bad, Bid, Bim, Puma y Noxa, que tienen en común solo el pequeño dominio de interacción BH3 (Huang y Strasser, *Cell* 103 (2000) 839-842). Sin embargo, Bax o Bak, las proteínas de múltiples dominios que contienen BH1-BH3, se requieren para comprometerse con la muerte celular (Cheng, *et al.*, *Molecular Cell* 8 (2001) 705-711; Wei, M.C., *et al.*, *Science* 292 (2001) 727-730; Zong, W.X., *et al.*, *Genes and Development* 15 148 (2001) 1-1486). Cuando se activan, pueden permeabilizar la membrana externa de las mitocondrias y liberar los factores proapoptogénicos (por ejemplo, el citocromo C) necesarios para activar las caspasas que desmantelan la célula (Wang, K., *Genes and Development* 15 (2001) 2922-2933; (Adams, 2003 *supra*); Green, D.R., y Kroemer, G., *Science* 305 (2004) 626-629).

Las interacciones entre los miembros de estas tres facciones de la familia Bcl-2 determinan si una célula vive o muere. Cuando las proteínas de solo BH3 se han activado, por ejemplo, en respuesta al daño en el ADN, se pueden unir por medio de su dominio BH3 a una ranura en sus parientes de prosupervivencia (Sattler, *et al.*, *Science* 275 (1997) 983-986). Sin embargo, la forma en que las proteínas de solo BH3 y similares a Bcl-2 controlan la activación de Bax y Bak sigue siendo poco conocida (Adams, 2003 *supra*). La mayor atención se ha centrado en Bax. Esta proteína monomérica soluble (Hsu, Y.T., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 13289-13834; Wolter, K.G., *et al.*, *Journal of Cell Biology* 139 (1997) 1281-92) normalmente tiene su dominio de selección de membrana insertado en su ranura, probablemente teniendo en cuenta su localización citosólica (Nechushtan, A., *et al.*, *EMBO Journal* 18 (1999) 2330-2341; Suzuki, *et al.*, *Cell* 103 (2000) 645-654; Schinzel, A., *et al.*, *J. Cell Biol* 164 (2004) 1021-1032). Se

han propuesto varios péptidos/proteínas no relacionados para modular la actividad de Bax, revisados en Lucken-Ardjomande, S., y Martinou, J.C., *J Cell Sci* 118 (2005) 473-483, pero su relevancia fisiológica aún no se ha establecido. De forma alternativa, Bax se puede activar por medio de la implicación directa de determinadas proteínas de solo BH3 (Lucken-Ardjomande, S., y Martinou, J.C., 2005 *supra*), siendo la mejor forma documentada una forma truncada de Bid, tBid (Wei, M.C., *et al.*, *Genes und Development* 14 (2000) 2060-2071; Kuwana, T., *et al.*, *Cell* 111 (2002) 331-342; Roucou, X. *et al.*, *Biochemical Journal* 368 (2002) 915-921; Cartron, P.F., *et al.*, *Mol Cell* 16 (2004) 807-818). Como se analiza en otra parte (Adams 2003 *supra*), el modelo más antiguo, en el que Bcl-2 implica directamente a Bax (Oltvai, Z.N., *et al.*, *Cell* 74 (1993) 609-619), se ha vuelto problemático porque Bcl-2 se une a la membrana mientras que Bax es citosólico y su interacción parece ser altamente dependiente de los detergentes usados para la lisis celular (Hsu, Y.T. y Youle, 1997 *supra*). No obstante, está bien establecido que la región BH3 de Bax puede mediar en la asociación con Bcl-2 (Zha, H. y Reed, J., *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 31482-88; Wang, K., *et al.*, *Molecular und Cellular Biology* 18 (1998) 6083-6089) y que Bcl-2 evita la oligomerización de Bax, aunque no se pueden detectar heterodímeros (Mikhailov, V., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 18361-18374). Por tanto, si las proteínas de prosupervivencia limitan la activación de Bax directa o indirectamente, sigue siendo incierto.

Aunque Bax y Bak parecen ser funcionalmente equivalentes en la mayoría de las circunstancias (Lindsten, T., *et al.*, *Molecular Cell* 6 (2000) 1389-1399; Wei, M.C., *et al.*, 2001 *supra*), se esperarían diferencias sustanciales en su regulación de su localización distinta en células sanas. A diferencia de Bax, que es en gran parte citosólica, Bak reside en complejos en la membrana externa de las mitocondrias y en el retículo endoplásmico de células sanas (Wei, M.C., *et al.*, 2000 *supra*; Zong, W.X., *et al.*, *Journal of Cell Biology* 162 (2003) 59-69). Sin embargo, al recibir señales citotóxicas, tanto Bax como Bak cambian de conformación, y Bax se transloca a las membranas de orgánulos, donde tanto Bax como Bak a continuación forman homooligómeros que se pueden asociar, dando lugar a la permeabilización de la membrana (Hsu, Y.T., *et al.*, *PNAS* 94 (1997) 3668-3672; Wolter, K.G., *et al.*, 1997 *supra*; Antonsson, B., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 11615-11623; Nechushtan, A., *et al.*, *Journal of Cell Biology* 153 (2001) 1265-1276; Wei, M.C., *et al.*, 2001 *supra*; Mikhailov, V., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 5367-5376).

Existen diversos inhibidores de Bcl-2, todos los cuales tienen la misma propiedad de inhibir a los miembros de prosupervivencia de la familia de proteínas Bcl-2 y, por lo tanto, son candidatos prometedores para el tratamiento del cáncer. Dichos inhibidores de Bcl-2 son, por ejemplo, oblimersen, SPC-2996, RTA-402, gosipol, AT-101, mesilato de obatoclax, A-371191, A-385358, A-438744, ABT-737, ABT-263 (navitoclax), AT-101, BL-11, BL-193, GX-15-003, 2-metoxiantimicina A₃, HA-14-1, KF-67544, purpurogalina, TP-TW-37, YC-137 y Z-24, y se describen, por ejemplo, en Zhai, D., *et al.*, *Cell Death and Differentiation* 13 (2006) 1419-1421.

El vínculo entre otras proteínas de la familia Bcl-2 y el cáncer también está bien establecido y ampliamente documentado (Strasser, A. 2011 *EMBO J.* 30, 3667-3683), y también se conocen inhibidores de otros miembros de la familia Bcl. Los inhibidores selectivos de Bcl-X_L A-1155463 y A-1331852 se describen, por ejemplo, en Levenson *et al.*, *Science Translational Medicine* vol. 7, edición 279 279ra40. Los inhibidores de hidrazona de benzotiazol selectivos de Bcl-X_L se divulgan en Sleebs *et al.*, *J. Med. Chem.* 2013, 56, 5514-5540. Para la descripción de otros inhibidores de Bcl-X_L, véase, por ejemplo, Koehler *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5, 662-667; y Tao *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5, 1088-10. Los inhibidores de Mcl-1 y sus usos como tratamientos contra el cáncer se describen, por ejemplo, en Levenson *et al.*, *Cell Death and Disease* (2015) 6, e1590; Bruncko *et al.*, *J. Med. Chem.* 2015, 58, 2180-2194; Petros *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (2014) 1484-1488; Abulwerdi *et al.*, *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 565-5; Abulwerdi *et al.*, *J. Med. Chem.* 2014, 57, 4111-4133; Burke *et al.*, *J. Med. Chem.* 2015, 58, 3794-3805; Friberg *et al.*, *J. Med. Chem.* 2013, 56, 15-30; y belmar *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics* 145 (2015) 76-84. Los inhibidores duales de Mcl-1/Bcl-xL se divulgan en Tanaka *et al.*, *J. Med. Chem.* 2013, 56, 9635-9645.

Sumario de la invención

La invención a la que pertenece la presente memoria descriptiva se define por las reivindicaciones adjuntas a la presente descripción.

Breve descripción de las figuras

Las FIGS. 1A y 1B muestran la expresión de las moléculas de prosupervivencia de la familia Bcl-2 en células de cáncer de mama humanas KPL-4 y BT-474M1 resistentes a T-DM1 (positivas para HER2) en relación con las células originales. La FIG. 1A muestra la expresión de ARNm evaluada por análisis de qRT-PCR TaqMan; la FIG. 1B muestra la expresión de proteínas por análisis de inmunoelectrotransferencia.

La FIG. 2 presenta los resultados de un ensayo de viabilidad celular que muestra que la combinación de T-DM1 + GDC-0199 tiene un efecto sinérgico en células de cáncer de mama humanas resistentes a T-DM1 KPL-4, mientras que no se observa sinergia en las células originales KPL-4.

La FIG. 3 presenta los resultados de un ensayo de activación de caspasa que mide la activación de las caspasas 3 y 7. Los resultados muestran que a las 24 horas de tratamiento farmacológico, las células de cáncer de mama humanas KPL-4 resistentes a T-DM1 se vuelven a sensibilizar a T-DM1 en presencia de GDC-0199, mientras que a las 24

horas, no hay efecto de T-DM1 +/- GDC-0199 en células originales KPL-4.

Las FIGS. 4A y 4B presentan los resultados de un ensayo de activación de caspasa que mide la activación de las caspasas 3 y 7 en células de cáncer de mama humanas KPL-4 resistentes a T-DM1 en relación con las células originales después de 48 horas de tratamiento farmacológico. Los resultados muestran incrementos dependientes de la dosis en la activación de las caspasas 3 y 7 con la adición de GDC-0199 a T-DM1, con un efecto mínimo de T-DM1 solo. En las células originales KPL-4, T-DM1 induce una activación consistente de las caspasas 3 y 7 con un incremento mínimo tras la adición de GDC-0199.

La FIG. 5A presenta los resultados de un ensayo de activación de caspasa que mide la activación de las caspasas 3 y 7 en el clon n.º 17 de la línea celular de cáncer de mama humana KPL-4 resistente a T-DM1 tratado con 1 µg/ml de T-DM1 solo o en combinación con las dosis indicadas de GDC-0199 durante 48 horas. Los resultados muestran incrementos dependientes de la dosis en la activación de las caspasas 3 y 7 con la adición de GDC-0199 a T-DM1, con un efecto mínimo de T-DM1 solo.

La FIG. 5B muestra el efecto de T-DM1 (5 mg/kg administrado una vez), de GDC-0199 (100 mg/kg cada día x 21) o de la combinación sobre el crecimiento del tumor (medido por el volumen del tumor) en xenoinjertos de cáncer de mama humano KPL-4 resistente a T-DM1 del clon n.º 17 en ratones beige IDC. El tratamiento farmacológico de combinación dio como resultado una estasis tumoral, sin actividad del tratamiento con un agente único.

Las FIGS. 6A y 6B muestran los resultados de un ensayo de activación de caspasa que mide la activación de las caspasas 3 y 7 en el clon n.º 8 de la línea celular de mama humana KPL-4 resistente a T-DM1 a concentraciones de T-DM1 de 0,1 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente, solo o en combinación con las concentraciones indicadas de GDC-0199.

La FIG. 6C muestra el efecto de T-DM1 (5 mg/kg c3s x 2), de GDC-0199 (100 mg/kg cada día x 21) o de la combinación sobre el crecimiento del tumor (medido por el volumen del tumor) en xenoinjertos de cáncer de mama humano KPL-4 resistente a T-DM1 del clon n.º 8 en ratones beige IDC.

La FIG. 7A muestra la expresión de Bcl-2 en muestras de tumor de xenoinjerto de KPL-4 resistente a T-DM1 incluidas en parafina y fijadas con formol (clones n.º 8 y n.º 17) determinada por inmunohistoquímica (IHQ), usando el procedimiento de detección con DAB.

La FIG. 7B muestra la expresión de HER2 (ErbB2) en muestras de tumor de xenoinjerto de KPL-4 resistente a T-DM1 incluidas en parafina y fijadas con formol (clones n.º 8 y n.º 17) determinada por inmunohistoquímica (IHQ), usando el procedimiento de detección con DAB.

La FIG. 8 muestra la expresión de la proteína medida por el análisis de inmunoelectrotransferencia de Bcl-2 y HER2 en tumores de xenoinjerto resistentes a T-DM1 KPL-4 del clon n.º 17, tratados con GDC-0199, T-DM1 o T-DM1 + GDC-0199.

La FIG. 9A presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* luminiscente de activación de caspasa 3/7, que prueba el efecto de cinco concentraciones separadas de GDC-0199 (µM) en combinación con 9 concentraciones diferentes de T-DM1 después de 24 horas de tratamiento en células de cáncer de mama MDA-MB-361 HER2+ (células indiferenciadas para T-DM1). Los resultados demuestran una apoptosis potenciada mayor que con T-DM1 solo con todas las combinaciones sometidas a prueba.

La FIG. 9B presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* fluorescente de activación de caspasa 3/7 cinético, que prueba el efecto de tres concentraciones diferentes de GDC-0199 (0,63 µM, 1,25 µM, 2,5 µM), solo y en combinación con T-DM1 (0,1 µg/ml), en células de cáncer de mama MDA-MB-361 HER2+. Los resultados demuestran una activación de caspasa potenciada mayor que con T-DM1 solo con todas las combinaciones sometidas a prueba.

La FIG. 10A presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* luminiscente de activación de caspasa 3/7, que prueba el efecto de cinco concentraciones separadas de GDC-0199 (µM) en combinación con 9 concentraciones diferentes durante 24 horas de tratamiento en células de cáncer de mama HCC1569 HER2+ (células indiferenciadas para T-DM1). Los resultados demuestran que no hay inducción de apoptosis por T-DM1 solo, sino apoptosis potenciada con todas las combinaciones sometidas a prueba.

La FIG. 10B presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* fluorescente de caspasa 3/7 cinético, que prueba el efecto de tres concentraciones diferentes de GDC-0199 (0,63 µM, 1,25 µM, 2,5 µM), solo y en combinación con T-DM1 (0,1 µg/ml), en células de cáncer de mama HCC1569 HER2+. Los resultados demuestran una activación de caspasa potenciada dependiente de la dosis con el tratamiento de combinación.

La FIG. 11 muestra el efecto de T-DM1 (1 mg/kg, 3 mg/kg, 7 mg/kg, i.v. c3sx1) y GDC-0199 (100 mg/kg, v.o., cada día x 21), solo o en combinación, sobre el crecimiento del tumor en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MDA-MB-361 HER2+. Se observó un retraso significativo en el crecimiento del tumor con GDC-0199 combinado con

7 mg/kg de T-DM1.

La FIG. 12 muestra el análisis de inmunoelectrotransferencia de los efectos de T-DM1, con o sin GDC-0199, en los miembros de la familia Bcl-2 (total y fosfo-Bcl-2 y -Bcl-xL, Mcl-1 total y Bim) en las líneas celulares de cáncer de mama HER2+ BT-474, EFM192A, KPL-4, HCC1569, HCC1954, MDA-361, UACC-812, ZR-75-30.

La FIG. 13 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab (SEQ ID NO: 1).

La FIG. 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de trastuzumab (SEQ ID NO: 2).

Descripción detallada de la invención

Ahora se hará referencia en detalle a determinados modos de realización de la invención, en los que se ilustran ejemplos en las estructuras y fórmulas que se acompañan. Si bien la invención se describirá junto con los modos de realización enumerados, se entenderá que no pretenden limitar la invención a esos modos de realización. Por el contrario, la invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se pueden incluir dentro del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. La presente invención no está limitada de ninguna manera a los procedimientos y materiales descritos.

Definiciones

Se usa el término "anticuerpo" en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

El anticuerpo anti-HER2 usado en los conjugados anticuerpo-fármaco en el presente documento es un anticuerpo monoclonal.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara normalmente por técnicas de ADN recombinante. Son especialmente preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica, ahora bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; el documento US 5.202.238 y el documento US 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, una CDR murina se injerta en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferentes corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos

mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "anticuerpo humano" incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374) y se pueden producir por una variedad de técnicas, incluyendo presentación en fagos. En base a dicha tecnología, se pueden producir anticuerpos humanos frente a una gran variedad de dianas. Los ejemplos de anticuerpos humanos se describen por ejemplo en Kellermann, S.A., *et al.*, Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597. Para el uso de la tecnología de presentación en fagos para producir y seleccionar anticuerpos humanos, véase, por ejemplo, Winter *et al.*, Ann Review Immunol, 1994, 12:433-455; y para la producción de anticuerpos totalmente humanos a partir de plataformas de presentación en fagos y ratones transgénicos, véase, por ejemplo, Lonberg, Current Opinion Immunol, 2008, 20(4):450-459.

Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como, por ejemplo, los anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico para los genes o anticuerpos de inmunoglobulina humana expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en forma reordenada.

Como se usa en el presente documento, "que se une específicamente" o "se une específicamente a" se refiere a una unión que es lo suficientemente selectiva para una diana como para distinguirla de una unión a dianas no deseadas o no específicas. En un modo de realización, un anticuerpo que se une específicamente a una diana tendrá una afinidad de unión por esa diana (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Aun en otro modo de realización, la KD es 10^{-10} mol/l o inferior (por ejemplo, 10^{-12} mol/l). La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar, tal como el análisis de curva de Scatchard en células que expresan el antígeno diana.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "molécula de ácido nucleico" incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. En un modo de realización, es ADN bicatenario.

Los "dominios constantes" no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero están implicados en las funciones efectoras (ADCC, unión a complemento y CDC).

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).)

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos de contacto con antígeno ("contactos con antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ejemplares en el presente documento incluyen:

(a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) las CDR que se producen en los residuos aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) los contactos con antígeno que se producen en los residuos aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y

(d) las combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen residuos aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

El término "anticuerpo anti-HER2" de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se fija específicamente al antígeno HER2.

Como se define en el presente documento, los términos "trastuzumab", "HERCEPTIN®" y "huMAb4D5-8" se usan de manera intercambiable. Dicho anticuerpo comprende preferentemente las secuencias de aminoácidos de cadena

ligera y pesada mostradas en la FIG. 13 (SEQ ID NO: 1) y la FIG. 14 (SEQ ID NO. 2), respectivamente.

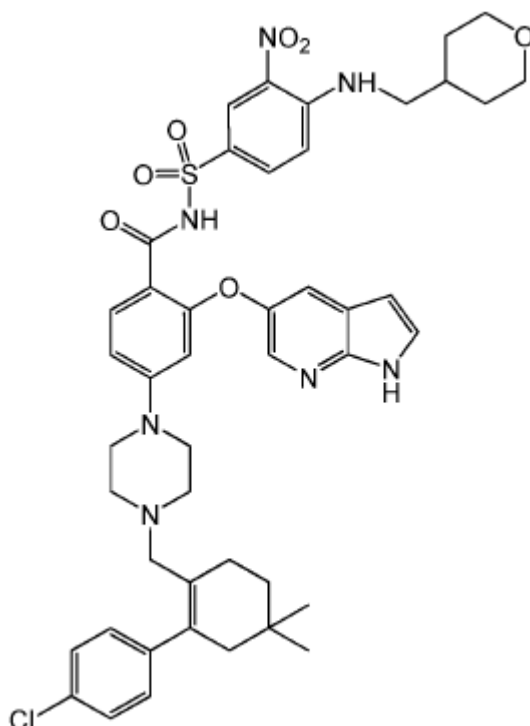
El "epítipo 4D5" o "4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y el trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembranario de HER2 y dentro del dominio IV de HER2. Para detectar anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, se puede realizar una cartografía de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región de aproximadamente el residuo 529 a aproximadamente el residuo 625, inclusive, de HER2).

El "epítipo 2C4" o "2C4" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 2C4. Para detectar anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, se puede realizar una cartografía de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. El anticuerpo 2C4 y el pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en el punto de unión de los dominios I, II y III (Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004)).

Como se define en el presente documento, los términos "T-DM1", "trastuzumab-MCC-DM1", "ado-trastuzumab emtansina", "trastuzumab emtansina" y "KADCYLA®" se usan de manera intercambiable, y se refieren al trastuzumab conectado a través del resto conector MCC al resto de fármaco maitansinoide DM1, incluyendo todas las mezclas de conjugados anticuerpo-fármaco cargados y acoplados de formas diversas, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco se acoplan covalentemente al anticuerpo trastuzumab (documento US 7097840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993).

El término "Bcl-2", como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína Bcl-2 (n.º de ID de Swiss Prot P10415), un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 (Cory, S., y Adams, J.M., *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 647-656; Adams, *Genes und Development* 17 (2003) 2481-2495; Danial, N.N. y Korsmeyer, S.J., *Cell* 116 (2004) 205-219; Petros, A.M., *Biochim Biophys Acta* 1644 (2004) 83-94).

El término "inhibidor selectivo de Bcl-2", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos y moléculas pequeñas que inhiben a los miembros de prosupervivencia de la familia de proteínas Bcl-2. Preferentemente, el inhibidor selectivo de Bcl-2 es 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida, (también conocido como ABT-199 o GDC-0199), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un inhibidor de Bcl-2 de fórmula I, que se describe en la publicación internacional n.º WO2010/0138588 y en la publicación de EE. UU. n.º US2010/0305122).



2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacin-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida

5

Fórmula I.

En el presente documento, un "agente antitumoral" se refiere a un fármaco usado para tratar el cáncer. Los ejemplos no limitantes de agentes antitumorales en el presente documento incluyen agentes de quimioterapia, inhibidores de la dimerización de HER, anticuerpos dirigidos contra HER, anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores, compuestos antihormonales, citocinas, fármacos dirigidos a EGFR, agentes antiangiogénicos, inhibidores de la tirosina cinasa, agentes y anticuerpos inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, anticuerpos que inducen apoptosis, inhibidores de la COX, inhibidores de la farnesiltransferasa, anticuerpos que se unen a la proteína oncofetal CA 125, vacunas contra HER2, inhibidores de Raf o ras, doxorubicina liposómica, topotecán, taxano, inhibidores de la tirosina cinasa dobles, TLK286, EMD-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib y bevacizumab.

Una "quimioterapia" es el uso de un agente quimioterápico útil en el tratamiento del cáncer.

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

Más ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de MEK, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semaphore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina, (sirolímús, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Ionafernib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL),

vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfan y piposulfan; aciridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina una sarcodictina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma11, caliqueamicina omega11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos antibióticos de enediina cromoproteínicos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptoizocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; 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, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de drostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiprurritales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; eflornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; 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; daunorubicina; 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 anteriores.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfáticas. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma no microcítico de pulmón ("CNMP"), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, 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. En un modo de realización preferente, el cáncer es cáncer de mama. En otro modo de realización preferente, el cáncer es cáncer gástrico.

La referencia a un tumor o cáncer como "estadio 0", "estadio I", "estadio II", "estadio III" o "estadio IV", y diversos subestadios dentro de esta clasificación, indica la clasificación del tumor o cáncer usando los procedimientos de agrupación de estadio global o estadificación en números romanos conocidos en la técnica. Aunque el estadio real del cáncer depende del tipo de cáncer, en general, un cáncer en estadio 0 es una lesión *in situ*, un cáncer en estadio I es un tumor localizado pequeño, un cáncer en estadio II y III es un tumor local avanzado que presenta la afectación de los ganglios linfáticos locales y un cáncer en estadio IV representa cáncer metastásico. Los estadios específicos para cada tipo de tumor son conocidos por el médico experto.

El término "cáncer de mama metastásico" quiere decir el estado del cáncer de mama donde las células cancerosas se transmiten desde el sitio original a uno o más sitios en el cuerpo, por los vasos sanguíneos o linfáticos, para formar uno o más tumores secundarios en uno o más órganos además de la mama.

Un cáncer "avanzado" es aquel que se ha diseminado fuera del sitio u órgano de origen, por invasión local o bien

metástasis. En consecuencia, el término cáncer "avanzado" incluye tanto la enfermedad localmente avanzada como la metastásica.

Un cáncer "resistente al tratamiento" es aquel que progresa a pesar de que se esté administrando un agente antitumoral, tal como una quimioterapia, al paciente con cáncer. Un ejemplo de un cáncer resistente al tratamiento es aquel que es resistente al tratamiento con platino.

Un cáncer "recurrente" es aquel que ha vuelto a crecer, en el sitio inicial o bien en un sitio distante, después de una respuesta al tratamiento inicial, tal como una cirugía.

Un cáncer "localmente recurrente" es el cáncer que reaparece después del tratamiento en el mismo lugar que un cáncer tratado previamente.

Un cáncer "operable" o "resecable" es el cáncer que se limita al órgano primario y es adecuado para la cirugía (resección).

Un cáncer "no resecable" o "irresecable" no se puede extirpar (resecar) mediante cirugía.

Los términos "positivo para HER2" y "que expresa HER2" se usan en el presente documento de manera intercambiable. Un cáncer "positivo para HER2" comprende células cancerosas que tienen niveles de HER2 más altos que lo normal. Los ejemplos de cáncer positivo para HER2 incluyen cáncer de mama positivo para HER2 y cáncer gástrico positivo para HER2. Opcionalmente, positivo para HER2 es un cáncer que sobreexpresa HER2, y en determinados modos de realización el cáncer positivo para HER-2 tiene una puntuación de inmunohistoquímica (IHQ) de 2+ o 3+ y/o una proporción de amplificación de hibridación *in situ* (ISH) $\geq 2,0$.

La hibridación *in situ* (ISH) determina el número de copias de *her2* usando una sonda de ADN acoplada a un sistema de detección fluorescente, cromogénico o de plata (es decir, FISH, CISH o SISH), o una combinación de sistemas CISH y SISH (ISH doble de campo claro (BDISH) o ISH de doble hapteno, doble color (DDISH)). La ISH se puede llevar a cabo usando una única sonda para enumerar las copias de *her2* solo por núcleo o como una técnica de doble sonda donde la hibridación de una sonda de centrómero del cromosoma 17 (sonda de enumeración del cromosoma 17, CEP17) permite la determinación de la proporción *her2*:CEP 17. El enfoque de dos sondas se puede realizar como una técnica de doble color, con la hibridación conjunta de las dos sondas en el mismo portaobjetos, o como un ensayo monocromático donde cada sonda se usa en portaobjetos secuenciales. A veces se considera que la proporción *her2*:CEP17 refleja mejor la condición de amplificación de *her2* que el número de copias de *her2* medio, ya que este último también depende de otros parámetros, tales como el índice mitótico del tumor, el espesor del corte, los efectos de truncamiento nuclear, y el número de copias cromosómicas anómalas (aneusomía). La frase "proporción de amplificación de hibridación *in situ* (ISH) $\geq 2,0$ " se refiere a la proporción *her2*:CEP 17 $\geq 2,0$. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, Sauter G, *et al.* Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009; 27:1323-1333, y el artículo de revisión de Hanna *et al.* *Modern Pathology* (2014) 27, 4-18.

En el presente documento, un "paciente" o "sujeto" es un paciente humano. El paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, uno que padece o está en riesgo de padecer uno o más síntomas de cáncer, en particular cáncer gástrico o de mama.

Una "población de pacientes" se refiere a un grupo de pacientes con cáncer. Dichas poblaciones se pueden usar para demostrar la eficacia y/o seguridad estadísticamente significativas de un fármaco, tal como pertuzumab.

Un paciente "recidivado" es uno que tiene signos o síntomas de cáncer después de la remisión. Opcionalmente, el paciente ha recidivado después del tratamiento adyuvante o prequirúrgico.

Una muestra biológica o de cáncer que "presenta expresión, amplificación o activación de HER" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, expresa (incluyendo sobreexpresa) un receptor de HER, tiene el gen HER amplificado y/o demuestra de otro modo la activación o la fosforilación de un receptor de HER.

El término "sinérgico" como 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 únicos. La determinación de una interacción sinérgica entre un conjugado anticuerpo anti-Her2-fármaco, tal como trastuzumab-MCC-DM1, y un inhibidor selectivo de Bcl-2 se puede basar en los resultados obtenidos de los ensayos descritos en el presente documento, o en otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica, utilizando programas estándar para cuantificar la sinergia, la aditividad y el antagonismo entre los agentes antineoplásicos. El programa utilizado preferentemente es el descrito por Chou y Talalay, en "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy", Academic Press, 1987, capítulo 2. Los valores del índice de combinación (IC) menores que 0,8 indican sinergia, los valores mayores que 1,2 indican antagonismo y los valores entre 0,8 y 1,2 indican efectos aditivos. La politerapia puede proporcionar "sinergia" y ser "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos se: (1)

formulan conjuntamente y administran o suministran de forma simultánea en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministran por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministra tratamiento de alternancia, se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran de forma secuencial, por ejemplo, mediante inyecciones diferentes en jeringuillas separadas. En general, durante el tratamiento de alternancia, se administra de forma secuencial una dosificación eficaz de cada ingrediente activo, es decir, en serie en el tiempo, mientras que en la politerapia, las dosificaciones eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

El "tratamiento prequirúrgico" o "tratamiento preoperatorio" en el presente documento se refiere al tratamiento administrado antes de la cirugía. El objetivo del tratamiento prequirúrgico es proporcionar un tratamiento sistémico inmediato, erradicando potencialmente las micrometástasis que, de otro modo, proliferarían si se siguiera la secuencia estándar de cirugía seguida de un tratamiento sistémico. El tratamiento prequirúrgico también puede ayudar a reducir el tamaño del tumor, permitiendo de este modo la resección completa de tumores inicialmente irresecables o preservando porciones del órgano y sus funciones. Además, el tratamiento prequirúrgico permite una evaluación *in vivo* de la eficacia del fármaco, que puede guiar la elección de tratamientos posteriores.

El "tratamiento adyuvante" en el presente documento se refiere al tratamiento administrado después de la cirugía definitiva, donde no se puede detectar evidencia de enfermedad residual, a fin de reducir el riesgo de recidiva de la enfermedad. La meta del tratamiento adyuvante es evitar la recidiva del cáncer y, por lo tanto, reducir la probabilidad de muerte relacionada con el cáncer. El tratamiento adyuvante en el presente documento excluye específicamente el tratamiento prequirúrgico.

"Cirugía definitiva" se usa como ese término se usa dentro de la comunidad médica. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, procedimientos, quirúrgicos o de otro modo, que dan como resultado la extirpación o resección del tumor, incluyendo los que dan como resultado la extirpación o resección de todo el tumor visible de forma macroscópica. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, la resección completa o curativa o la resección macroscópica completa del tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos que se producen en una o más fases, e incluye, por ejemplo, procedimientos quirúrgicos de múltiples fases donde se realizan uno o más procedimientos quirúrgicos u otros procedimientos antes de la resección del tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos para extirpar o resecar el tumor, incluyendo los órganos implicados, partes de los órganos y tejidos, así como los órganos circundantes, tales como los ganglios linfáticos, partes de los órganos o tejidos. La extirpación puede ser incompleta, de modo que células tumorales pueden permanecer a pesar de que no se detecten.

"Supervivencia" se refiere al paciente que sigue vivo e incluye la supervivencia sin enfermedad (SSE), la supervivencia sin progresión (SSP) y la supervivencia global (SG). La supervivencia se puede estimar por el procedimiento de Kaplan-Meier, y cualquier diferencia en la supervivencia se calcula usando la prueba del orden logarítmico estratificada.

"Supervivencia sin progresión" (SSP) es el tiempo desde el primer día de tratamiento hasta la progresión de la enfermedad documentada (incluyendo la progresión del SNC aislada) o la muerte por cualquier causa en el estudio, lo que se produzca primero.

"Supervivencia sin enfermedad (SSE)" se refiere a que el paciente permanezca con vida, sin reaparición del cáncer, por un período de tiempo definido, tal como aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En un aspecto de la invención, la SSE se analiza de acuerdo con el principio de intención de tratar, es decir, los pacientes se evalúan sobre la base de su tratamiento asignado. Los acontecimientos usados en el análisis de la SSE pueden incluir recidiva local, regional y a distancia del cáncer, aparición de un cáncer secundario y muerte por cualquier causa en pacientes sin un acontecimiento previo (por ejemplo, recidiva de cáncer de mama o segundo cáncer primario).

"Supervivencia global" se refiere a que el paciente permanezca con vida durante un período de tiempo definido, tal como aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 10 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En los estudios subyacentes a la invención, el acontecimiento usado para el análisis de supervivencia fue la muerte por cualquier causa.

Por "extender la supervivencia" se quiere decir incrementar la SSE y/o la SG en un paciente tratado en relación con un paciente no tratado, o en relación con un protocolo de tratamiento de control. La supervivencia se vigila durante al menos aproximadamente seis meses, o al menos aproximadamente 1 año, o al menos aproximadamente 2 años, o al menos aproximadamente 3 años, o al menos aproximadamente 4 años, o al menos aproximadamente 5 años, o al menos aproximadamente 10 años, etc., después del inicio del tratamiento o después del diagnóstico inicial.

La "proporción de riesgos instantáneos" en el análisis de supervivencia es un sumario de la diferencia entre dos curvas de supervivencia, que representa la reducción del riesgo de muerte en el tratamiento en comparación con el control, durante un período de seguimiento. La proporción de riesgos instantáneos es una definición estadística de las tasas

de acontecimientos. Para el propósito de la invención, la proporción de riesgos instantáneos se define como la representación de la probabilidad de un acontecimiento en la rama experimental dividida por la probabilidad de un acontecimiento en la rama de control en cualquier punto específico en el tiempo.

- 5 Por "monoterapia" se quiere decir un régimen terapéutico que incluye solo un único agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o tumor durante el transcurso del período de tratamiento.

10 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en los que el objetivo es evitar o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el crecimiento, desarrollo o diseminación de una situación hiperproliferativa, tal como el cáncer. Para los propósitos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejoría o atenuación del estado de la enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede
15 querer decir prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno, así como los propensos a tener la afección o trastorno o en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

20 El término "un procedimiento de tratamiento" o sus equivalentes, cuando se aplican, por ejemplo, al cáncer, se refiere a un procedimiento o modo de acción que se diseña para reducir o eliminar el número de células cancerosas en un paciente o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un procedimiento de tratamiento" del cáncer o de otro trastorno proliferativo no quiere decir necesariamente que las células cancerosas o de otros trastornos se eliminarán realmente, que el número de células o el trastorno se reducirá realmente o que los síntomas de un cáncer o de otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, un procedimiento de tratamiento del cáncer se realizará incluso con una baja
25 probabilidad de éxito, pero que no obstante, se considera que, dados los antecedentes médicos y la expectativa de supervivencia estimada de un paciente, induce un modo de acción beneficioso global.

30 Los términos "administración conjunta" o "que se administra conjuntamente" se refieren a la administración del conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco y el inhibidor selectivo de Bcl-2 como dos formulaciones separadas. La administración conjunta puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden. En otro modo de realización, hay un período de tiempo mientras que ambos (o todos los) agentes activos ejercen de forma simultánea sus actividades biológicas. El conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco y el inhibidor selectivo de Bcl-2 se administran conjuntamente de forma simultánea o bien secuencial (por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua (una para el conjugado anticuerpo-fármaco y finalmente una para el inhibidor de Bcl-2; o el inhibidor de Bcl-2 se administra por vía oral). Cuando ambos agentes terapéuticos se administran conjuntamente de forma secuencial, los agentes se administran en dos administraciones separadas que están separadas por un "período de tiempo específico". El término
35 período de tiempo específico quiere decir cualquier momento desde 1 hora hasta 15 días. Por ejemplo, uno de los agentes se puede administrar dentro de aproximadamente 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día, o 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 hora a partir de la administración del otro agente y, en un modo de realización, el período de tiempo específico es de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día, o de 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 hora.

40 El término "de forma simultánea" significa al mismo tiempo o dentro de un período de tiempo corto, normalmente menos de 1 hora.

45 Un fármaco que se administra "de forma concurrente" con uno o más fármacos se administra durante el mismo ciclo de tratamiento, el mismo día de tratamiento que el uno o más de otros fármacos y, opcionalmente, al mismo tiempo que el uno o más de otros fármacos. Por ejemplo, para los tratamientos contra el cáncer administrados cada 3 semanas, los fármacos administrados de forma concurrente se administran cada uno el día 1 de un ciclo de 3
50 semanas.

Un período de dosificación como se usa en el presente documento quiere decir un período de tiempo, durante el cual cada agente terapéutico se ha administrado al menos una vez. Un ciclo de dosificación es normalmente de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o
55 30 días.

En determinados aspectos un ciclo de dosificación es de 21 días.

60 En determinados aspectos de un procedimiento de tratamiento del cáncer en un paciente como se proporciona en el presente documento, el procedimiento comprende administrar el conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco y el inhibidor selectivo de Bcl-2 durante uno o más ciclos de dosificación al paciente. En un aspecto, el uno o más ciclos de dosificación duran cada uno al menos una semana. En otro aspecto, el uno o más ciclos de dosificación son cada uno de al menos dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, nueve semanas o de más de nueve semanas. En un aspecto cada ciclo de dosificación es de tres semanas.

65 En un aspecto preferente, el conjugado anticuerpo-fármaco se administra como una infusión intravenosa (i.v.) cada

tres semanas (ciclo de 21 días).

En otro aspecto preferente, el conjugado anticuerpo-fármaco es KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansina), que se administra como una infusión i.v. de 3,6 mg/kg cada 3 semanas (ciclo de 21 días).

En algunos aspectos del procedimiento de tratamiento proporcionado en el presente documento, el inhibidor selectivo de Bcl-2 es 2-((1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida (GDC-0199). En determinados aspectos, la cantidad de GDC-0199 administrada al paciente por dosis se incrementa durante el primer ciclo de dosificación desde cantidades iniciales de entre 10 mg a 80 mg hasta cantidades finales de entre 190 mg y 400 mg. En determinados aspectos, la cantidad de GDC-0199 por dosis administrada a los pacientes comienza con 50 mg o 100 mg, y se incrementa a 300 mg por dosis. En algunos aspectos, la cantidad de GDC-0199 en las dosis iniciales administradas al paciente puede estar, por ejemplo, entre 20 mg a 60 mg (por ejemplo, dosis de 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg o 60 mg), seguido de cantidades de dosis de 100 mg, 200 mg, 300 mg o más de GDC-0199.

Un "acontecimiento adverso" es cualquier signo, síntoma o enfermedad desfavorable e involuntaria asociada temporalmente con el uso de un producto (especialidad farmacéutica) en fase de investigación clínica u otro procedimiento intervencionista impuesto por el protocolo, independientemente de su atribución; e incluye: acontecimientos adversos (AA) no observados previamente en el paciente que surgen durante el período de información de AA especificado en el protocolo, incluyendo los signos o síntomas asociados con el cáncer de mama que no estaban presentes antes del período de información de AA; complicaciones que se producen como resultado de procedimientos intervencionistas exigidos por el protocolo (por ejemplo, técnicas cruentas tales como biopsias); si corresponde, los AA que se producen antes de la asignación del tratamiento del estudio asociados con el período de reposo farmacológico del medicamento, período de adaptación sin tratamiento u otro procedimiento intervencionista exigido por el protocolo; afecciones médicas preexistentes (distintas de la afección que se está estudiando) que el investigador considera que han empeorado en gravedad o frecuencia o que han cambiado de índole durante el período de información de AA especificado en el protocolo.

Es evidente que los conjugados anticuerpo-fármaco se administran al paciente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o simplemente "cantidad eficaz") que es la cantidad del compuesto o combinación respectiva que provocará la respuesta médica o biológica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se está buscando por el investigador, veterinario, médico u otro facultativo. La administración de una cantidad eficaz de un agente terapéutico puede ser una administración única o una administración de dosis divididas. La "administración de dosis divididas" quiere decir que una cantidad eficaz es una división en dosis múltiples, preferentemente 2, y administrada dentro de 1 o 2 días. Por ejemplo, si se consideran eficaces 100 mg de un inhibidor selectivo de Bcl-2, se puede administrar en una administración de 100 mg o en dos administraciones de 50 mg. La administración de dosis divididas a veces es deseable al comienzo de un período de dosificación para reducir los efectos secundarios. Cuando una cantidad eficaz se administra en dosificaciones divididas, todavía se considera una administración de una cantidad eficaz. Por ejemplo, cuando 100 mg es la cantidad eficaz de un inhibidor selectivo de Bcl-2 y esa cantidad se administra en dos dosis de 50 mg durante un período de tiempo, por ejemplo, 2 días, solo se administra una cantidad eficaz durante ese período de tiempo.

Una dosis "fija" o "constante" de un agente terapéutico en el presente documento se refiere a una dosis que se administra a un paciente humano sin tener en cuenta el peso (P) o el área de superficie corporal (ASC) del paciente. La dosis fija o constante por lo tanto no se proporciona como una dosis de mg/kg o una dosis de mg/m², sino más bien como una cantidad absoluta del agente terapéutico.

Una dosis de "carga" en el presente documento en general comprende una dosis inicial de un agente terapéutico administrado a un paciente, y va seguida de una o más dosis de mantenimiento del mismo. En general, se administra una única dosis de carga, pero en el presente documento se contemplan múltiples dosis de carga. Normalmente, la cantidad de la(s) dosis de carga administrada(s) supera la cantidad de la(s) dosis de mantenimiento administrada(s) y/o la(s) dosis de carga se administra(n) con más frecuencia que la(s) dosis de mantenimiento, a fin de lograr la concentración en estado estacionario deseada del agente terapéutico antes de lo que se puede lograr con la(s) dosis de mantenimiento.

Una dosis de "mantenimiento" en el presente documento se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente durante un período de tratamiento. Normalmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento espaciados, tal como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, o aproximadamente cada 4 semanas, preferentemente cada 3 semanas.

"Infusión" o "infundir" se refiere a la introducción de una solución que contiene fármaco en el cuerpo a través de una vena para propósitos terapéuticos. En general, esto se logra por medio de una bolsa de infusión intravenosa (i.v.).

Una "bolsa de infusión intravenosa" o "bolsa de infusión i.v." es una bolsa que puede contener una solución que se puede administrar por medio de la vena de un paciente. En un modo de realización, la solución es una solución salina (por ejemplo, aproximadamente un 0,9 % o aproximadamente un 0,45 % de NaCl). Opcionalmente, la bolsa de infusión

i.v. se forma a partir de poliolefina o cloruro de polivinilo.

En el contexto de la presente invención, se pueden usar otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes (por ejemplo, citocinas) en el tratamiento de combinación con conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco e inhibidor de Bcl-2 del cáncer que expresa HER2. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. Preferentemente, el tratamiento de combinación con conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco e inhibidor de Bcl-2 se usa sin dichos agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes.

Dichos agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, tales como ciclofosfamida (CTX; por ejemplo, CYTOXAN®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, LEUKERAN®), cisplatino (CisP; por ejemplo, PLATINOL®) busulfano (por ejemplo, MYLERAN®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C y similares; antimetabolitos, tales como metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo, VEPESID®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo, XELODA®), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos, tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo, ADRIAMYCIN®), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como alcaloides de la vinca, tales como vincristina (VCR), vinblastina y similares; y otros agentes antitumorales, tales como paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y derivados de paclitaxel, los agentes citostáticos, glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo, DECADRON®) y corticoesteroides tales como prednisona, inhibidores nucleosídicos de enzimas tales como hidroxiaurea, enzimas reductoras de aminoácidos tales como asparaginasa, leucovorina y otros derivados del ácido fólico, y agentes antitumorales diversos similares. Los siguientes agentes se pueden usar también como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo, ETHYOL®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo, DOXIL®), gemcitabina (por ejemplo, GEMZAR®), daunorubicina lipo (por ejemplo, DAUNOXOME®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, TAXOTERE®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecán), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo. Preferentemente, el tratamiento de combinación con anticuerpo anti-CD20 de tipo II e inhibidor de Bcl-2 se usa sin dichos agentes adicionales.

El uso de los agentes citotóxicos y antineoplásicos descritos anteriormente, así como de fármacos antineoplásicos específicos para su diana antiproliferativos como inhibidores de proteína-quinasas en regímenes quimioterápicos está en general bien caracterizado en las técnicas de tratamiento contra el cáncer, y su uso en el presente documento está sujeto a las mismas consideraciones de vigilancia de la tolerabilidad y de la eficacia y de control de las vías de administración y de las dosificaciones, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosificaciones reales de los agentes citotóxicos pueden variar dependiendo de la respuesta de las células cultivadas del paciente determinada usando procedimientos de histocultivo. En general, la dosificación se reducirá en comparación con la cantidad usada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosificaciones típicas de un agente citotóxico eficaz pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante y, cuando así lo indiquen las respuestas *in vitro* o las respuestas en modelos animales, se pueden reducir en hasta aproximadamente un orden de magnitud en concentración o cantidad. Por tanto, la dosificación real dependerá del juicio del médico, del estado del paciente y de la eficacia del procedimiento terapéutico en base a la reactividad *in vitro* de las células malignas cultivadas primarias o de la muestra de tejido histocultivado, o de las respuestas observadas en los modelos animales apropiados.

En el contexto de la presente invención, se puede llevar a cabo una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o se puede usar un radiofármaco además del tratamiento de combinación con conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco e inhibidor de Bcl-2. La fuente de radiación puede ser externa o bien interna al paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, el tratamiento se conoce como radioterapia externa (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se llama braquiritradioterapia (BT). Los átomos radioactivos para su uso en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. También es posible marcar el anticuerpo con dichos isótopos radioactivos. Preferentemente, el tratamiento de combinación con anticuerpo anti-CD20 de tipo II e inhibidor de Bcl-2 se usa sin dicha radiación ionizante.

La radioterapia es un tratamiento estándar para controlar tumores y/o metástasis tumorales irresecables o inoperables. Se han visto resultados mejorados cuando la radioterapia se ha combinado con quimioterapia. La radioterapia se basa en el principio de que dosis altas de radiación administradas en un área diana darán como resultado la muerte de células reproductivas tanto en el tumor como en los tejidos normales. El régimen de dosificación de radiación se define en general en términos de dosis absorbida de radiación (Gy), tiempo y fraccionamiento, y se debe definir cuidadosamente por el oncólogo. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de diversas consideraciones, pero las dos más importantes son la ubicación del tumor en relación con otras estructuras u órganos

cruciales del cuerpo y el grado en que se ha diseminado el tumor. Una tanda típica de tratamiento para un paciente sometido a radioterapia será un programa de tratamiento durante un período de 1 a 6 semanas, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrada al paciente en una única fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En un aspecto preferente de la divulgación, hay sinergia cuando los tumores en pacientes humanos se tratan con el tratamiento de combinación de la invención y la radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento del tumor mediante los agentes que comprenden la combinación de la invención se potencia cuando se combina con radiación, opcionalmente con agentes quimioterápicos o antineoplásicos adicionales. Los parámetros de los tratamientos de radiación adyuvantes están, por ejemplo, contenidos en el documento WO 99/60023.

Los conjugados anticuerpo anti-HER2-fármaco se administran a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, por administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. Es preferente la administración intravenosa o subcutánea de los anticuerpos.

Los inhibidores de Bcl-2 se administran a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, por administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal o por vía oral. Es preferente la administración intravenosa, subcutánea u oral de los inhibidores de Bcl-2.

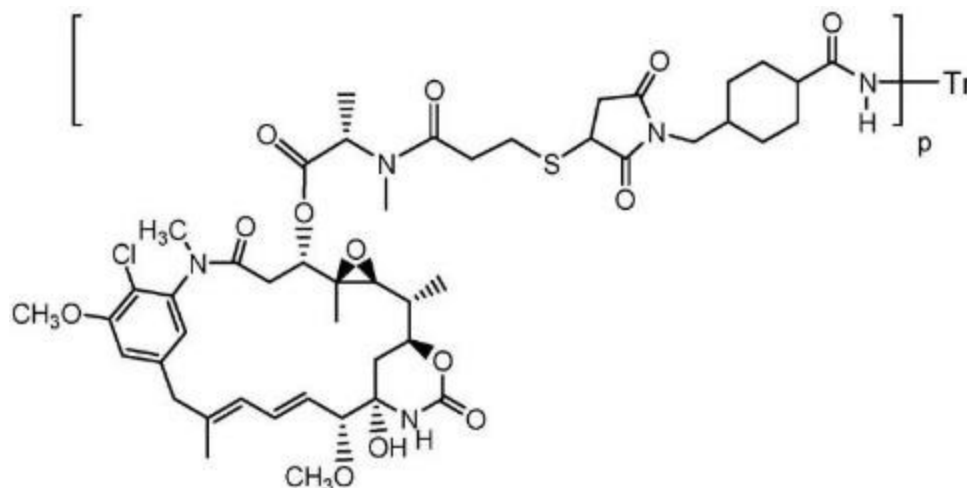
Como se usa en el presente documento, se pretende que un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluya cualquiera y todos los materiales compatibles con la administración farmacéutica, incluyendo disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones de la invención. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos complementarios.

Un "vial" es un recipiente adecuado para contener un líquido o una preparación liofilizada. En un modo de realización, el vial es un vial de un único uso, por ejemplo, un vial de 20 cm³ de un único uso con un tapón.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

Trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1; KADCYLA®, ado-trastuzumab emtansina)

La presente divulgación incluye combinaciones terapéuticas que comprenden trastuzumab-MCC-DM1 que tiene la estructura:



Fórmula II

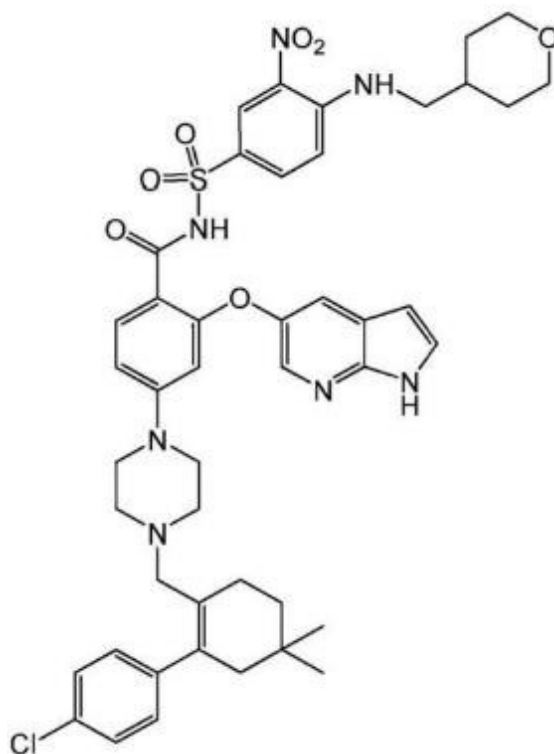
donde Tr es trastuzumab, y p es un número entero de 1 a 8. La proporción de fármaco con respecto a anticuerpo o la carga de fármaco se representa por p en la estructura anterior de trastuzumab-MCC-DM1. El valor de carga del fármaco p es de 1 a 8. Trastuzumab-MCC-DM1 incluye todas las mezclas de conjugados anticuerpo-fármaco cargados y acoplados de forma diversa, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco se acoplan covalentemente al anticuerpo trastuzumab.

Trastuzumab se produce por un cultivo en suspensión de células de mamífero (ovario de hámster chino, CHO). El protoncogén HER2 (o c-erbB2) codifica una proteína receptora transmembranaria de 185 kDa, que está relacionada estructuralmente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. La sobreexpresión de la proteína HER2 se observa en un 25 %-30 % de los cánceres de mama primarios y se puede determinar usando una evaluación basada en inmunohistoquímica de bloques tumorales fijados (Press MF, *et al* (1993) Cancer Res 53:4960-70. Trastuzumab es un anticuerpo que tiene residuos de unión a antígeno de, o derivados de, el anticuerpo 4D5 murino (ATCC CRL 10463, depositado en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 según el Tratado de Budapest el 24 de mayo de 1990). Los anticuerpos 4D5 humanizados ejemplares incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como en el documento US 5821337.

El conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MCC-DM1, comprende un resto de fármaco maitansinoide DM1 (documento US 5208020; documento US 6441163) y se puede preparar a partir de productos de fermentación de ansamitocina (documento US 6790954; documento US 2005/0170475).

Inhibidores selectivos de Bcl-2

En la invención, el inhibidor selectivo de Bcl-2 de la presente invención es 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahydro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida, (también conocida como ABT-199 o GDC-0199), un inhibidor de Bcl-2 de fórmula I, que se describe en la publicación internacional n.º WO2010/0138588 y en la publicación de EE. UU. n.º US2010/0305122).



2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahydro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida

Fórmula I.

Otros inhibidores selectivos de Bcl-2 incluyen, por ejemplo, oblimersen, SPC-2996, RTA-402, gosipol, AT-101, mesilato de obatoclax, A-371191, A-385358, A-438744, ABT-737, ABT-263, AT-101, BL-11, BL-193, GX-15-003, 2-metoxiantimicina A₃, HA-14-1, KF-67544, purpurogalina, TP-TW-37, YC-137 y Z-24, descritos, por ejemplo, en Zhai, D., *et al.*, Cell Death and Differentiation 13 (2006) 1419-1421.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen combinaciones de trastuzumab-MCC-DM1, un inhibidor selectivo de Bcl-2 y uno o más vehículos, deslizantes, diluyentes o excipientes

farmacéuticamente aceptables.

Trastuzumab-MCC-DM1 y los inhibidores selectivos de Bcl-2 pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares, y se pretende que la invención abarque tanto las formas solvatadas como las no solvatadas.

Trastuzumab-MCC-DM1 y los inhibidores selectivos de Bcl-2 también pueden existir en diferentes formas tautoméricas, y todas las formas de este tipo están abarcadas dentro del alcance de la invención. El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles por medio de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protonación (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen las interconversiones por medio de la migración de un protón, tales como las isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen las interconversiones por la reorganización de algunos de los electrones de enlace.

Las composiciones farmacéuticas engloban tanto la composición global como las unidades de dosificación individuales que comprenden más de un (por ejemplo, dos) agente farmacéuticamente activo que incluyen trastuzumab-MCC-DM1 y un inhibidor selectivo de Bcl-2 seleccionado de las listas de los agentes adicionales descritos en el presente documento, junto con cualquier excipiente, diluyente, vehículo o deslizante farmacéuticamente inactivo. La composición global y cada unidad de dosificación individual pueden contener cantidades fijas de los agentes farmacéuticamente activos mencionados anteriormente. La composición global es el material que aún no se ha formado en unidades de dosificación individual. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, pastillas, cápsulas y similares. De forma similar, el procedimiento descrito en el presente documento de tratamiento de un paciente mediante la administración de una composición farmacéutica de la presente invención también pretende englobar la administración de la composición global y las unidades de dosificación individual.

Las composiciones farmacéuticas también abarcan compuestos marcados isotópicamente de la presente invención que son idénticos a los enumerados en el presente documento, salvo por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o del número de masa normalmente encontrado en la naturaleza. Se contemplan todos los isótopos de cualquier átomo o elemento particular como se especifica. Los isótopos ejemplares que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro y yodo, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I y ^{125}I . Determinados compuestos marcados isotópicamente de la presente invención (por ejemplo, los marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución tisular de compuestos y/o sustratos.

Los isótopos de tritio (^3H) y carbono 14 (^{14}C) son útiles por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio (es decir, ^2H), puede ofrecer determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, semivida *in vivo* incrementada o requisitos de dosificación reducida), y, por ende, puede ser preferente en algunas circunstancias. Los isótopos emisores de positrones, tales como ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F son útiles para los estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor por el sustrato. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención se pueden preparar en general por los siguientes procedimientos análogos a los divulgados en los esquemas y/o en los ejemplos a continuación en el presente documento, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente con un reactivo marcado isotópicamente.

Trastuzumab-MCC-DM1 y los inhibidores selectivos de Bcl-2 se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar para su uso en una combinación terapéutica para el tratamiento terapéutico (incluyendo el tratamiento profiláctico) de trastornos hiperproliferativos en mamíferos, incluyendo los seres humanos. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende trastuzumab-MCC-DM1 en asociación con uno o más vehículos, deslizantes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los vehículos, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como carbohidratos, ceras, polímeros solubles en agua y/o hinchables, materiales hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El vehículo, diluyente o excipiente particular usado dependerá de los medios y el propósito para los cuales se aplica el compuesto de la presente invención. Los disolventes en general se seleccionan en base a los disolventes reconocidos por los expertos en la técnica como seguros (GRAS) para que se administren a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tales como el agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Los 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 humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, deslizantes, coadyuvantes tecnológicos, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes saborizantes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación elegante del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o composición farmacéutica del mismo) o para ayudar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

Las formulaciones se pueden preparar usando procedimientos convencionales de disolución y mezcla. Por ejemplo, el principio activo (es decir, un compuesto de la presente divulgación o forma estabilizada del compuesto (por ejemplo, complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente de complejación conocido) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes descritos anteriormente. El compuesto típicamente se formula en formas de dosificación farmacéutica para proporcionar una dosificación fácilmente controlable del fármaco y para posibilitar el cumplimiento por parte del paciente del régimen prescrito.

La composición (o formulación) farmacéutica para su aplicación se puede envasar en una variedad de maneras dependiendo del procedimiento usado para administrar el fármaco. En general, un artículo para su distribución incluye un recipiente en el que se ha depositado la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Los recipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como frascos (plástico y vidrio), sobres, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El recipiente también puede incluir un ensamblaje a prueba de manipulaciones para evitar el acceso indiscreto al contenido del envase. Además, en el recipiente se ha depositado una etiqueta que describe el contenido del recipiente. La etiqueta también puede incluir advertencias apropiadas.

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

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

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

Las formulaciones farmacéuticas se dosificarán y administrarán de una forma, es decir, cantidades, concentraciones, horarios, tanda, vehículos y vía de administración, consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos de cabecera. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto que se va a administrar se registrará por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar el trastorno mediado por el factor de coagulación. Dicha cantidad está preferentemente por debajo de la cantidad que es tóxica para el huésped o hace al huésped significativamente más susceptible al sangrado.

Los diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo, etanol o alcohol bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, 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; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, incluyendo Tween 80, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG), incluyendo PEG400. Los ingredientes farmacéuticos activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmelacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, (1995) Mack Publ. Co., Easton, PA.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para las vías de administración detalladas en el presente documento. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Las técnicas y formulaciones en general se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences 18.^a Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Dichos procedimientos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme

y estrecha el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si es necesario, dando forma al producto.

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

En un aspecto preferente, trastuzumab-MCC-DM1 se formula como un polvo liofilizado en viales de un único uso que contienen 100 mg por vial o 160 mg por vial, y se administra a una dosis de 3,6 mg/kg como una infusión intravenosa cada 3 semanas.

Las composiciones farmacéuticas del agente activo anti-Bcl-2 solo, por ejemplo, el inhibidor de Bcl-2, dependen de sus propiedades farmacéuticas; por ejemplo, para compuestos químicos pequeños tales como, por ejemplo, ABT-737, ABT-199 o ABT-263, una formulación podría ser, por ejemplo, la siguiente:

a) Formulación de comprimido (granulación por vía húmeda):

Elemento	Ingredientes	mg/comprimido			
1.	Compuesto de fórmula (I)	5	25	100	500
2.	Lactosa anhidra DTG	125	105	30	150
3.	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4.	Celulosa microcristalina	30	30	30	150
5.	Estearato de magnesio	1	1	1	1
	Total	167	167	167	831

Procedimiento de fabricación:

1. Mezclar los elementos 1, 2, 3 y 4 y granular con agua purificada.
2. Secar los gránulos a 50 °C.
3. Hacer pasar los gránulos a través de un equipo de molienda adecuado.
4. Añadir el elemento 5 y mezclar durante tres minutos; comprimir en una prensa adecuada.

b) Formulación de cápsulas:

Elemento	Ingredientes	mg/cápsula			
1.	Compuesto de fórmula (I)	5	25	100	500
2.	Lactosa hidratada	159	123	148	---
3.	Almidón de maíz	25	35	40	70
4.	Talco	10	15	10	25
5.	Estearato de magnesio	1	2	2	5
	Total	200	200	300	600

Procedimiento de fabricación:

1. Mezclar los elementos 1, 2 y 3 en un mezclador adecuado durante 30 minutos.
2. Añadir los elementos 4 y 5 y mezclar durante 3 minutos.
3. Rellenar en una cápsula adecuada.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden hacer modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión de moléculas de prosupervivencia de la familia Bcl-2 en células de cáncer de mama resistentes a T-DM1

Preparación de líneas celulares resistentes a T-DM1

Inicialmente, las células KPL-4 y BT-474M1 se hicieron resistentes a T-DM1 por cultivo continuo en presencia de T-DM1, empezando a una concentración muy baja de 10 ng/ml, que se incrementó gradualmente a 2 µg/ml. Las células obtenidas son los "grupos resistentes" que se mantuvieron en el cultivo en 2 µg/ml de T-DM1. Para obtener clones resistentes de forma estable, cada grupo (KPL-4 y BT-474M1) se sometió a clonación y separación de células sueltas. Los clones se mantuvieron sin T-DM1, de modo que se pudieron identificar los clones que tenían resistencia estable en ausencia de T-DM1.

Análisis TaqMan

El ARN total se preparó usando el kit Qiagen RNeasy Mini. El ADN genómico se extrajo mediante DNase I. La expresión génica se cuantificó usando PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR o TaqMan). Se usó la mezcla maestra universal de una etapa de TaqMan (Applied Biosystems) para todas las reacciones. La reacción se realizó en un formato estándar de placa de 96 pocillos con el sistema de qPCR en tiempo real ABI 7500. Se usaron 100 ng de ARN total como molde en cada reacción. Para el análisis de los datos, el Ct sin procesar se normalizó con respecto al gen constitutivo HP1BP3.

Los resultados del análisis TaqMan se presentan en la FIG. 1A. La figura muestra que la expresión del ARNm de Bcl-2 se incrementó en las líneas celulares KPL-4 resistentes a T-DM1 y BT-474M1 resistentes a T-DM1 (normalizadas con respecto al gen constitutivo HP1BP3) en relación con las células de KPL-4 y BT-474M1 no resistentes, originales.

El análisis de inmunoelectrotransferencia se realizó como sigue: Las células se lisaron en tampón de elución FLAG corregido (CFEB) (Tris 19,17 mM (pH 7,5), MgCl₂ 916,7 µM, NaCl 92,5 mM y Triton X-100 al 0,1 %) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche); en algunos casos se añadió urea 6 M. Se cuantificaron los lisados aclarados y cantidades iguales de proteínas se redujeron, alquilaron, separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF (Invitrogen) siguiendo procedimientos estándar. La inmunoelectrotransferencia se realizó como se recomienda por los respectivos fabricantes de anticuerpos. El análisis de inmunoelectrotransferencia mostrado en la FIG. 1B confirma que Bcl-2 está sobreexpresado en las líneas celulares KPL-4 y BT-474 resistentes a T-DM1.

Ejemplo 2

Ensayo de proliferación celular, líneas celulares de cáncer de mama KPL-4 originales y resistentes a T-DM1

El ensayo de proliferación celular se realizó durante 3 días usando el reactivo Cell-Titer Glo. Las células de cáncer de mama originales KPL-4 y las células de cáncer de mama resistentes a T-DM1 KPL-4, preparadas como se describe en el ejemplo 1, se trataron con T-DM1, GDC-0199 o una combinación de T-DM1 y GDC-0199 a proporciones fijas. La sinergia se analizó usando el análisis de efecto de la dosis combinada de fármacos de Chou y Talalay con el programa informático CalcuSyn para obtener un índice de combinación "IC" (Chou y Talalay (1984) Adv. Enzyme Regul. 22:27-55). Los valores de IC de menos de 1 indican sinergia, mientras que IC = 1 indicó aditividad.

Condiciones de ensayo: Las células se mantuvieron en F-12 de Ham: DMEM con alto contenido en glucosa (1:1)

complementado con suero fetal bovino termoinactivado al 10 % y L-glutamina 2 mM. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (4000 células por pocillo para las células originales KPL-4; 8000 células por pocillo para las células resistentes a T-DM1 KPL-4) y se dejaron adherir durante la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. A continuación, se extrajo el medio y se reemplazó por medio de cultivo recién preparado que contenía T-DM1, GDC-0199, o bien la combinación de ambos. Se añadió Cell Titer-Glo (Promega Corp.) a los pocillos 3 días después de la administración del fármaco y se midió la señal luminiscente usando el lector de placas EnVision Multilabel (PerkinElmer). Los valores del índice de combinación (IC) se generaron usando el programa informático CalcuSyn (Biosoft, Inc)

Como se muestra en la FIG. 2, la combinación de T-DM1 y GDC-0199 tiene un efecto antiproliferativo sinérgico en las células de cáncer de mama resistentes a T-DM1 KPL-4.

Ejemplo 3

Ensayo de luminiscencia de activación de caspasa 3/7, líneas celulares de cáncer de mama KPL-4 originales y resistentes a T-DM1

Como se señaló anteriormente, la familia de proteínas Bcl-2 regula la muerte celular programada desencadenada por señales de desarrollo y en respuesta a múltiples señales de estrés. Cuando se activan, pueden permeabilizar la membrana externa de las mitocondrias y liberar los factores proapoptogénicos (por ejemplo, el citocromo C) necesarios para activar las caspasas que desmantelan la célula (Wang, K., *Genes and Development* 15 (2001) 2922-2933; (Adams, 2003 *supra*); Green, D.R., y Kroemer, G., *Science* 305 (2004) 626-629). Por tanto, la activación de las caspasas, tales como las caspasas 3 y 7, indica inducción de la apoptosis.

En el presente experimento, se realizó el ensayo de luminiscencia de activación de caspasa 3/7 usando el reactivo Caspase-Glo® (Promega) siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron de la misma manera que los ensayos de viabilidad, excepto que los tiempos de incubación del fármaco fueron de 24 horas y se usó Caspase-Glo 3/7 (Promega) para medir la apoptosis.

Como se muestra en la FIG. 3, panel derecho, las células de cáncer de mama (HER2+) KPL-4 resistentes a T-DM1 se volvieron a sensibilizar para T-DM1 cuando se trataron durante 24 horas con una combinación de T-DM1 + GDC-0199, como se muestra por la apoptosis incrementada (activación de caspasa 3/7 incrementada). La misma combinación no mostró ningún efecto en las células originales. Cabe señalar que los resultados se evaluaron 24 horas después del tratamiento, lo que es demasiado temprano para la apoptosis inducida por T-DM1 solo en la línea celular original (panel izquierdo).

Las FIGS. 4A y 4B presentan los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* con luminiscencia de activación de caspasa 3/7 que mide la activación de las caspasas 3 y 7 en células de cáncer de mama humanas resistentes a T-DM1 KPL-4 en relación con las células originales usando diferentes concentraciones de T-DM1 y GDC-0199, respectivamente. Se observa una apoptosis incrementada en las células resistentes a T-DM1 KPL-4 tras la adición de concentraciones en incremento de GDC-0199 (1, 2,5 o 5 µM) a 0,1 o bien 1 µg/ml de T-DM1. Por el contrario, T-DM1 induce una apoptosis consistente en las células originales KPL-4, que no se potencia adicionalmente por la adición de GDC-0199.

La FIG. 5A presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* con luminiscencia de activación de caspasa 3/7 que mide la activación de las caspasas 3 y 7 en el clon n.º 17 de la línea celular de cáncer de mama humana KPL-4 resistente a T-DM1 tratada con T-DM1, GDC-0199 o T-DM1 + GDC-0199. De manera similar a las observaciones con el grupo de células resistentes a T-DM1 KPL-4, la inducción de apoptosis en el clon n.º 17 se incrementó tras la adición de concentraciones en incremento de GDC-0199.

Las FIGS. 6A y 6B muestran los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* con luminiscencia de activación de caspasa 3/7 que mide la activación de las caspasas 3 y 7 en el clon n.º 8 de la línea celular de mama humana KPL-4 resistente a T-DM1 tratada con 0,1 µg/ml y 1 µg/ml de concentraciones de T-DM1, respectivamente, solo o en combinación con las concentraciones indicadas de GDC-0199.

Como se muestra en las FIGS. 4A, 4B, 5A, 6A y 6B, los resultados obtenidos con diferentes clones de líneas celulares de cáncer de mama KPL-4 resistentes a T-DM1 confirman la actividad proapoptótica potenciada de la combinación de T-DM1 + GDC-0199 en diversas concentraciones.

Ejemplo 4

Estudios de xenoinjerto, líneas celulares de cáncer de mama resistentes a T-DM1 KPL-4

Para todos los estudios de xenoinjerto, se implantaron tres millones de células de cáncer de mama KPL-4 resistentes a T-DM1 en los cuerpos adiposos mamarios n.º 2/3 de ratones hembra IDCG-beige. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 200 mm³, los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento (n=10 ratones

por grupo): 5 mg/kg de T-DM1 c3s, 100 mg/kg de GDC-0199 cada día, combinación de los dos o vehículo. Los resultados de estos estudios de xenoinjerto para xenoinjertos de diversos clones de las células de cáncer de mama KPL-4 resistentes a T-DM1 se muestran en las FIGS. 5B y 6C. Los resultados indican un efecto antitumoral potenciado cuando se usaron T-DM1 y GDC-0199 en combinación, en relación con la actividad del agente único.

Ejemplo 5

Estudios de IHQ, tumores de xenoinjerto de KPL-4 resistente a T-DM1

Los tumores de xenoinjerto FFPE (incluidos en parafina y fijados con formol) se seccionaron para el análisis de la expresión de Bcl-2 y HER2 (ErbB2) por inmunohistoquímica (IHQ), usando el procedimiento de detección con DAB. El anticuerpo de Bcl-2 SP66 se obtuvo de Ventana. Las secciones de amígdalas humanas sirvieron como controles positivos para Bcl-2. El anticuerpo anti-HER2 4D5 se obtuvo de Ventana. Las líneas celulares de cáncer de mama humanas sirvieron como controles positivos (SK-BR-3 como 3+; MDA-MB-361 como 2+; MBA-MB-231 como negativo).

La FIG. 7A muestra la expresión de Bcl-2 en muestras de tumor de xenoinjerto de KPL-4 resistente a T-DM1 incluidas en parafina y fijadas con formol (clones n.º 8 y n.º 17) determinada por inmunohistoquímica (IHQ), usando el procedimiento de detección con DAB, como se describe anteriormente.

La FIG. 7B muestra la expresión de HER2 (ErbB2) en muestras de tumor de xenoinjerto de KPL-4 resistente a TDM-1 incluidas en parafina y fijadas con formol (clones n.º 8 y n.º 17) determinada por inmunohistoquímica (IHQ), usando el procedimiento de detección con DAB, como se describe anteriormente.

Resultados del anticuerpo anti-Bcl-2: los grupos con vehículo de cada clon mostraron una baja frecuencia similar de células reactivas a Bcl-2, más a menudo ubicadas en el perímetro de los lobulillos tumorales (no mostrado). La frecuencia y la intensidad de la señal de Bcl-2 en los márgenes del lobulillo tumoral en los grupos tratados con T-DM1 se incrementaron o no cambiaron.

Resultados del anticuerpo anti-HER2: los tumores tratados con vehículo y T-DM1 en todos los clones mostraron una frecuencia muy alta de IHQ 3+ de HER2. En algunos tumores tratados con T-DM1, hubo regiones de tinción de HER2 más débil (clon n.º 17), más a menudo adyacentes a las bandas estromales que rodean los lobulillos tumorales (no mostrado).

Los resultados de IHQ para Bcl-2 demuestran que la expresión de Bcl-2 se mantiene en los clones n.º 8 y n.º 17 resistentes a T-DM1 cuando se hacen crecer como tumores de xenoinjerto (FIG. 7A; véase también el ejemplo 6, que muestra muy poca expresión de Bcl-2 en células originales KPL-4 por inmunoelectrotransferencia). La expresión de Bcl-2 en el clon n.º 17 tratado con T-DM1 es más alta que el control con vehículo correspondiente. La FIG. 7B representa la expresión de HER2 como se evalúa por IHQ.

A diferencia de la expresión de HER2 relativamente más baja observada en células cultivadas *in vitro*, los clones n.º 8 y n.º 17, tanto en los tumores tratados con vehículo como con T-DM1, muestran una alta expresión de HER2 al nivel 2+ y 3+. Se determinó que todos los tumores del clon n.º 8 eran un 85-95 % de HER2+ o 3+, con una frecuencia muy baja de células tumorales 2+ o 1+. Los tumores del clon n.º 17 fueron más variables, con un 35-75 % de células 3+ para HER2 y un 20-65 % 2+ para células HER2 en el grupo de vehículo.

Ejemplo 6

Estudios de xenoinjerto, tumores de mama resistentes a T-DM1 KPL-4

La FIG. 8 muestra los datos de expresión de inmunoelectrotransferencia de Bcl-2, HER2, Bcl-xL y Pgp en tumores de xenoinjerto del clon n.º 17 resistente a T-DM1 KPL-4 tratados con GDC-0199, T-DM1 o T-DM1 + GDC 0199. (Los números de tres dígitos encima de los carriles 4-19 indican tumores de xenoinjerto individuales). Los datos de expresión muestran que la expresión de HER2 y Bcl-2 se mantiene en todos los grupos, en comparación con las células correspondientes cultivadas *in vitro* en cultivo celular.

Ejemplo 7

Ensayos de activación de fluorescencia y luminiscencia de caspasa 3/7, líneas celulares de cáncer de mama sensibles a T-DM1

El ensayo de luminiscencia de activación de caspasa 3/7 se realizó como se describe en el ejemplo 3.

El ensayo de apoptosis *in vitro* de fluorescencia de activación de caspasa 3 se realizó usando los reactivos y el equipo IncuCyte™ para medir la activación de caspasa a lo largo del tiempo (análisis cinético) siguiendo esencialmente las instrucciones de fabricación.

La FIG. 9A presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* de luminiscencia de caspasa 3/7, que prueba el efecto de cinco concentraciones separadas de GDC-0199 (μM) en combinación con 9 concentraciones diferentes de T-DM1 sobre la actividad de la caspasa en células de cáncer de mama MDA-MB-361 HER2+, que son sensibles a T-DM1 (indiferenciadas). Los resultados demuestran la activación de las caspasas 3 y 7 con T-DM1, que se potencia de manera dependiente de la dosis con concentraciones en incremento de GDC-0199.

La FIG. 9B presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* de fluorescencia de caspasa 3, que prueba el efecto de tres concentraciones diferentes de GDC-0199 (0,63 μM , 1,25 μM , 2,5 μM), solo y en combinación con T-DM1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$), sobre la actividad de la caspasa en células de cáncer de mama MDA-MB-361 sensibles (indiferenciadas) a T-DM1 HER2+. Los resultados demuestran que GDC-0199 potencia la activación de la caspasa por encima de la inducida por T-DM1 solo de manera dependiente de la dosis y el tiempo, y por lo tanto da como resultado una apoptosis potenciada con todas las combinaciones.

La FIG. 10A presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* de luminiscencia de caspasa 3/7, que prueba el efecto de cinco concentraciones separadas de GDC-0199 (μM) en combinación con 9 concentraciones diferentes de T-DM1 sobre la actividad de la caspasa en células de cáncer de mama HCC1569 HER2+ indiferenciadas para T-DM1. Los resultados demuestran que T-DM1 solo no induce apoptosis, pero la adición de GDC-0199 da como resultado una actividad de la caspasa potenciada y, por consiguiente, una apoptosis potenciada en todas las combinaciones.

La FIG. 10B presenta los resultados de un ensayo de apoptosis *in vitro* de fluorescencia de caspasa 3, que prueba el efecto de tres concentraciones diferentes de GDC-0199 (0,63 μM , 1,25 μM , 2,5 μM), solo y en combinación con T-DM1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$), sobre la actividad de la caspasa en células de cáncer de mama HCC1569 HER2+. Los resultados demuestran que GDC-0199 potencia la activación de la caspasa por encima de la inducida por T-DM1 solo de manera dependiente de la dosis y el tiempo, y por lo tanto da como resultado una apoptosis potenciada con todas las combinaciones.

Estos resultados muestran que la combinación T-DM1/GDC-0199 también es eficaz en líneas celulares indiferenciadas para T-DM1 (es decir, no resistentes a T-DM1).

Ejemplo 8

Estudios de xenoinjerto, tumores de mama de MDA-MB-361 sensibles (indiferenciados) a TDM-1

Diez millones de células de cáncer de mama MDA-MB-361 se implantaron en el cuerpo adiposo mamario derecho de ratones NOD/IDCG hembra un día después de la implantación de microesferas de 17β -estradiol de liberación durante 60 días. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 200-300 mm^3 , los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento ($n=10$ ratones por grupo) y se les administraron T-DM1 (1, 3 o 7 mg/kg i.v. una vez), GDC-0199 (100 mg/kg cada día x 21) o una combinación de T-DM1 y GDC-0199 como se muestra en la FIG. 11. Los resultados indican una actividad antitumoral potenciada de GDC-0199 con 7 mg/kg de T-DM1, en relación con la actividad del agente único.

Ejemplo 9

Análisis de inmunoelectrotransferencia: efectos de T-DM1 +/- GDC-0199 sobre las proteínas miembros de la familia Bcl-2 en líneas celulares de cáncer de mama HER2+

El efecto del tratamiento con T-DM1 (1,25 $\mu\text{g/ml}$) solo o en combinación con GDC-0199 (1,25 μM) se estudió en diversas líneas celulares de cáncer de mama HER2+ indiferenciadas para T-DM1. Los resultados se muestran en la FIG. 12. Cuatro de las ocho líneas celulares de cáncer de mama HER2+ sometidas a prueba (BT-474, HCC1569, MDA-361 y ZR-75-30) expresaron Bcl-2; las ocho líneas celulares de cáncer de mama expresaron los otros miembros de la familia Bcl-2 evaluados -Bcl-xL y Mcl-1. Tres de las líneas celulares (BT-474, MDA_361 y ZR-75-30) mostraron fosforilación de Bcl-2 después del tratamiento con T-DM1, un efecto conocido de la exposición a agentes antimetabólicos tales como el T-DM1. Como se muestra en las FIG. 9A, 9B, 10A y 10B, MDA-MB-361 y HCC1569 mostraron una apoptosis potenciada cuando se trataron con una combinación de T-DM1 y GDC-0199.

T-DM1 (KADCYLA®) presenta beneficios clínicos significativos en el tratamiento del cáncer para los pacientes, tales como pacientes con cáncer de mama, que han progresado en tratamientos dirigidos contra HER2 anteriores, tales como en el tratamiento con trastuzumab (HERCEPTIN®). La Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. aprobó KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansina), para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2 que recibieron previamente tratamiento con trastuzumab y un taxano. Los datos presentados aquí demuestran que el tratamiento de combinación con un inhibidor de Bcl (por ejemplo, Bcl-2) y T-DM1 mejora significativamente la eficacia de T-DM1 administrado como un agente único. Los resultados también demuestran que dicho tratamiento de combinación con T-DM1 y un inhibidor de Bcl-2 es eficaz tanto en el tratamiento de los cánceres positivos para HER2 sensibles (indiferenciados) a T-DM1 (por ejemplo, cánceres de mama) como de los cánceres

positivos para HER2 (por ejemplo, cánceres de mama) resistentes al tratamiento con T-DM1.

5 Aunque se ha descrito la invención anterior con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplos para propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la vista de las enseñanzas de la presente invención que se pueden realizar determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> GENENTECH, INC.
 F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
 <120> POLITERAPIA CON UN CONJUGADO ANTICUERPO ANTI-HER2-FÁRMACO Y UN INHIBIDOR DE BCL-2
 10 <130> GNE-0416-WO
 <140>
 <141>
 15 <150> 62/189.610
 <151> 07/07/2015
 <160> 2
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 214
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético
 <400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 30 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

ES 2 731 377 T3

370		375		380													
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
385					390					395					400		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		
				405					410					415			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
			420					425					430				
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
	435						440					445					
Gly																	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer positivo para HER2 en un ser humano que necesite del mismo, que comprende administrar a dicho ser humano una cantidad eficaz de trastuzumab-MCC-DM1 y 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 10 2. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer gástrico o cáncer de mama positivo para HER2.
3. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 2, en el que el cáncer gástrico o
- 15 4. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 2, en el que el cáncer de mama positivo para HER2 tiene una puntuación de inmunohistoquímica (IHQ) de 2+ o 3+ y/o una proporción de amplificación de hibridación *in situ* (ISH) $\geq 2,0$.
- 20 4. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer positivo para HER2 es resistente al tratamiento con dicho trastuzumab-MCC-DM1 administrado como un agente único.
5. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer positivo para HER2 es sensible al tratamiento con dicho trastuzumab-MCC-DM1 administrado como un agente único.
- 25 6. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho trastuzumab-MCC-DM1 y dicha 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se van a administrar conjuntamente.
- 30 7. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho trastuzumab-MCC-DM1 y dicha 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se van a administrar en una formulación o en alternancia.
- 35 8. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho trastuzumab-MCC-DM1 y dicha 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se van a administrar de forma simultánea.
- 40 9. Trastuzumab-MCC-DM1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho trastuzumab-MCC-DM1 y dicha 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se van a administrar consecutivamente.
- 45 10. Una combinación de trastuzumab-MCC-DM1 y 2-(1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-5-iloxi)-4-(4-((2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-enil)metil)piperacina-1-il)-*N*-(3-nitro-4-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metilamino)fenilsulfonil)benzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 50 11. La combinación de la reivindicación 10, que es una composición farmacéutica.
12. La combinación de la reivindicación 11, en la que el cáncer es cáncer positivo para HER2.
- 55 13. La combinación de la reivindicación 12, en la que el cáncer es cáncer gástrico o cáncer de mama positivo para HER2.
14. La combinación de la reivindicación 12, en la que el cáncer es resistente al tratamiento con dicho conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco o dicho trastuzumab-MCC-DM1, cuando se administra como un agente único.
- 60 15. La combinación de la reivindicación 12, en la que el cáncer es sensible al tratamiento con dicho conjugado anticuerpo anti-HER2-fármaco o dicho trastuzumab-MCC-DM1, cuando se administra como un agente único.

FIG. 1A

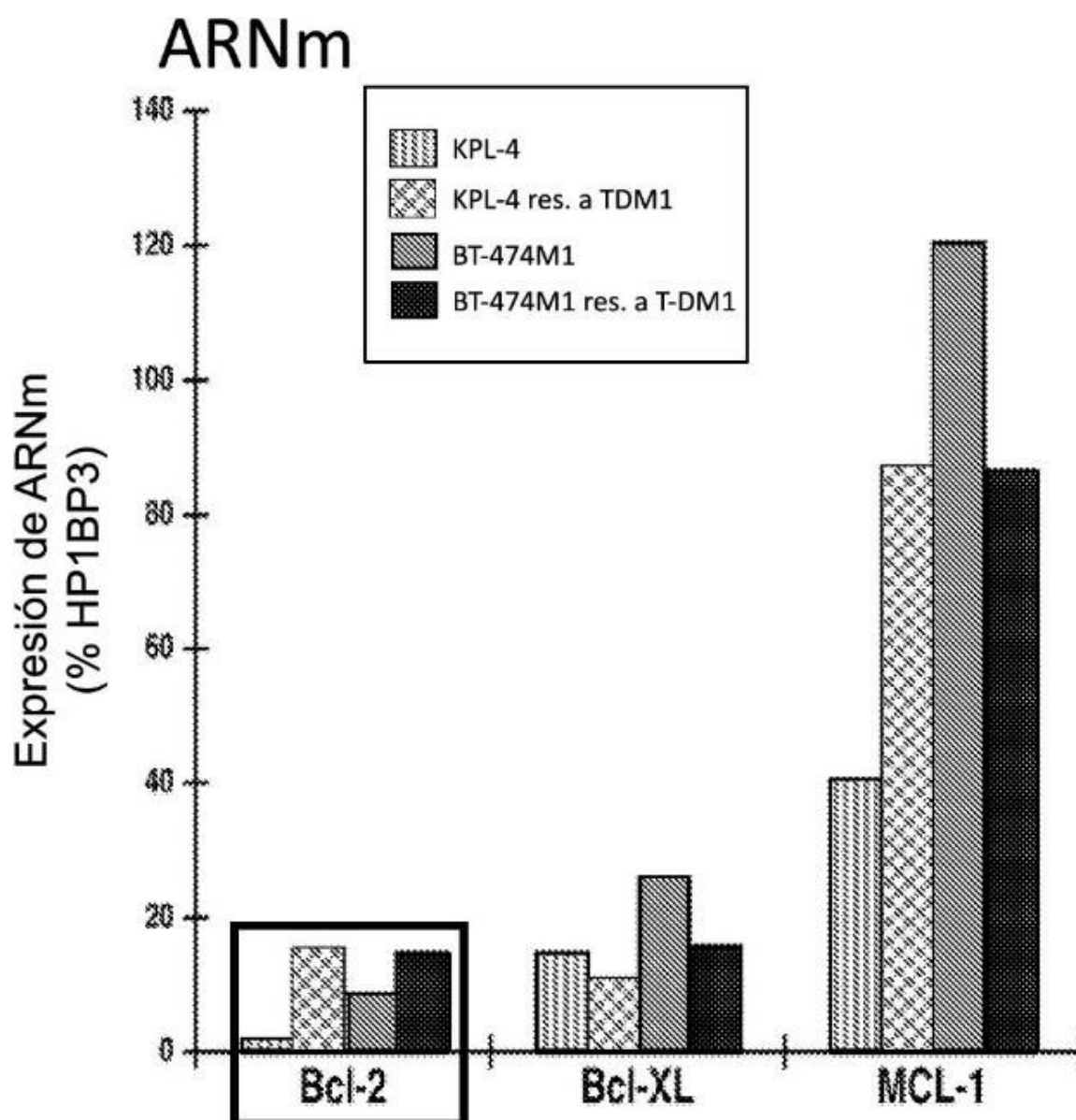


FIG. 1B

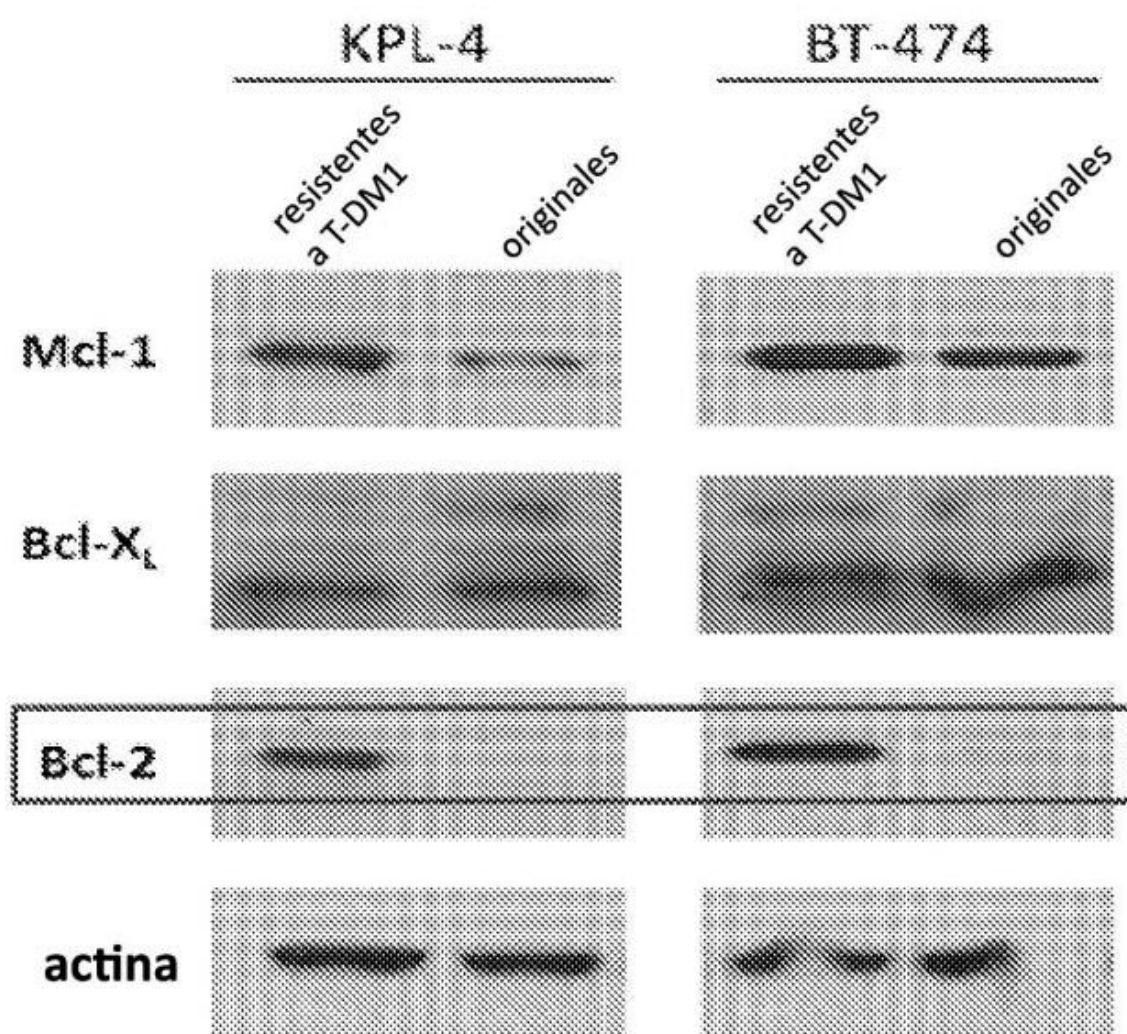


FIG. 2

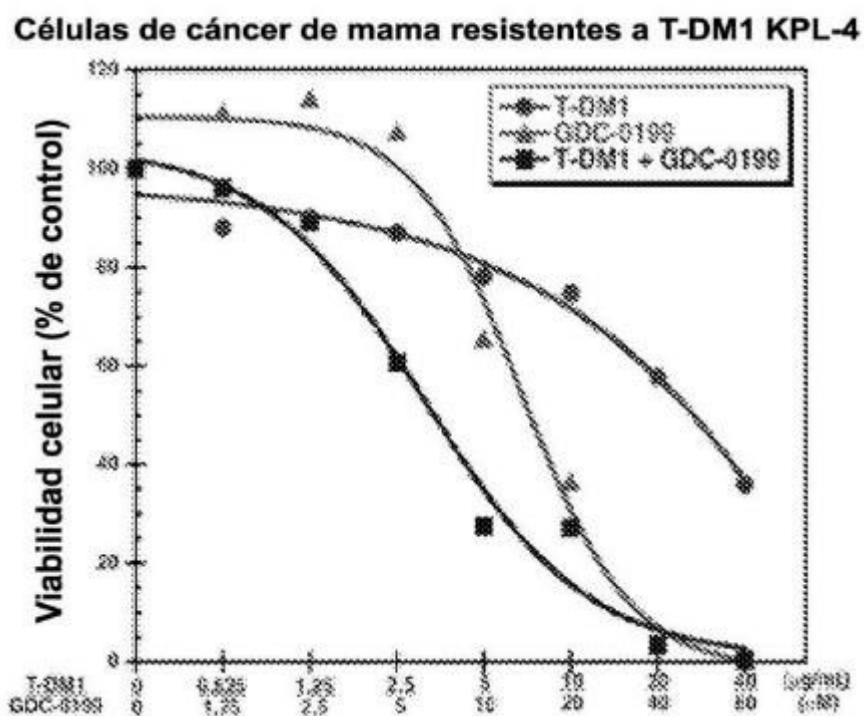
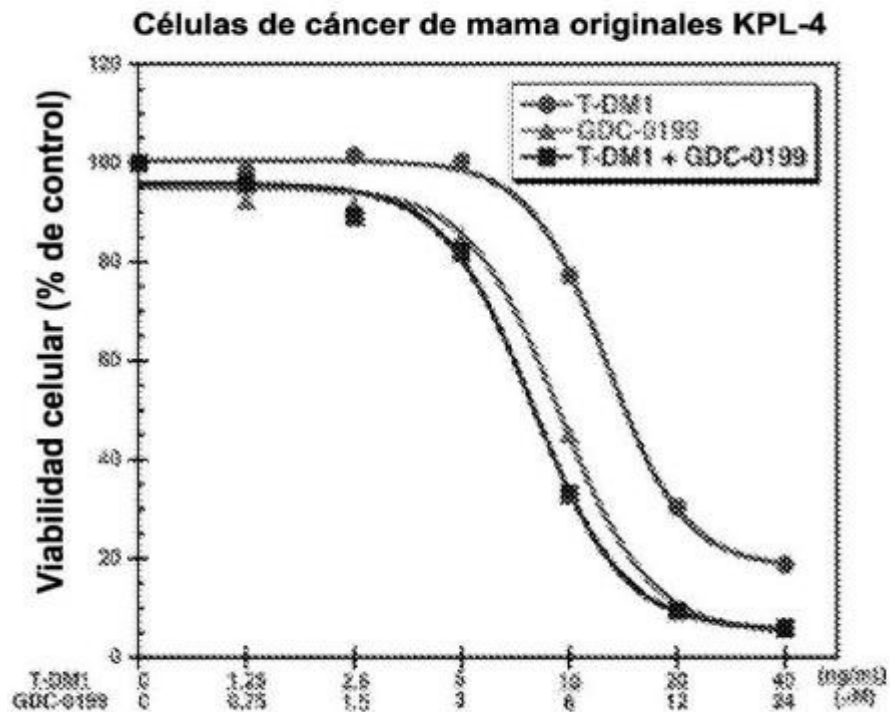


FIG. 3

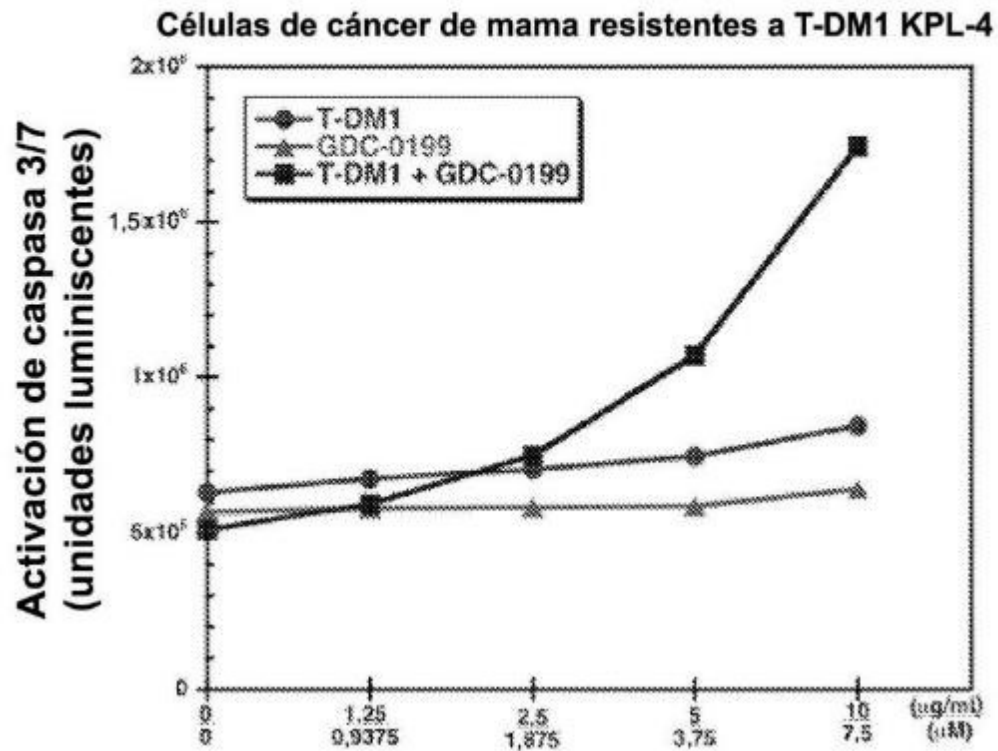
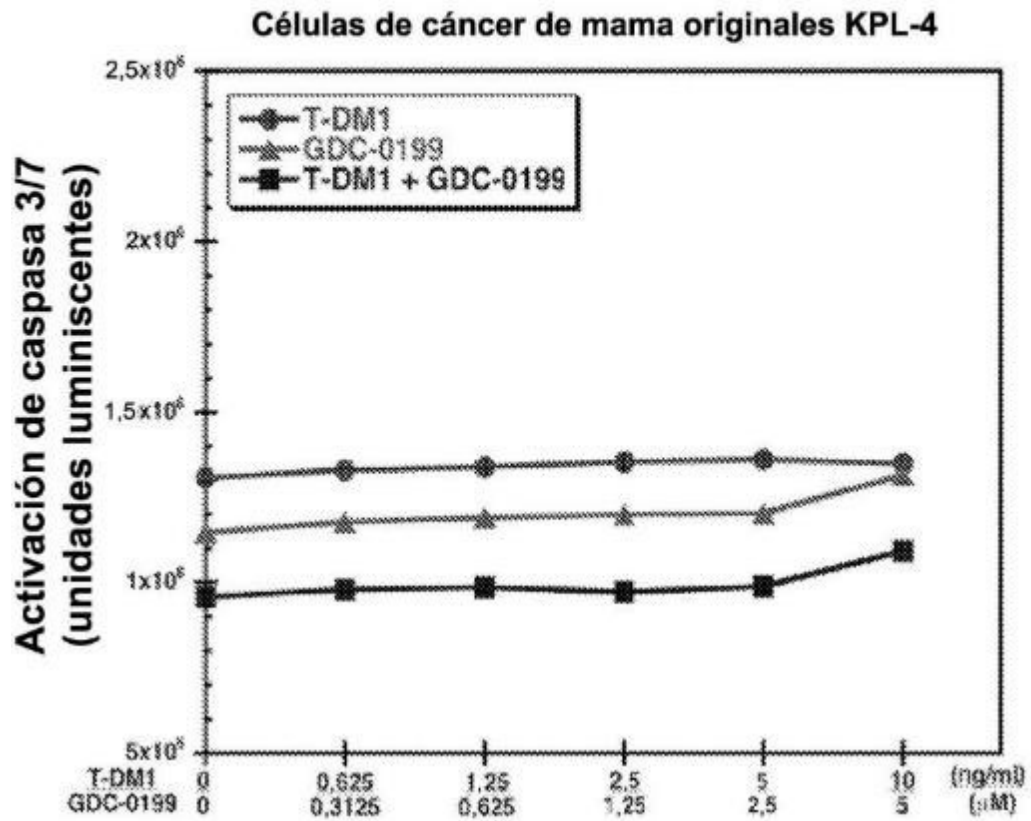


FIG. 4A

0,1 µg/ml de T-DM1

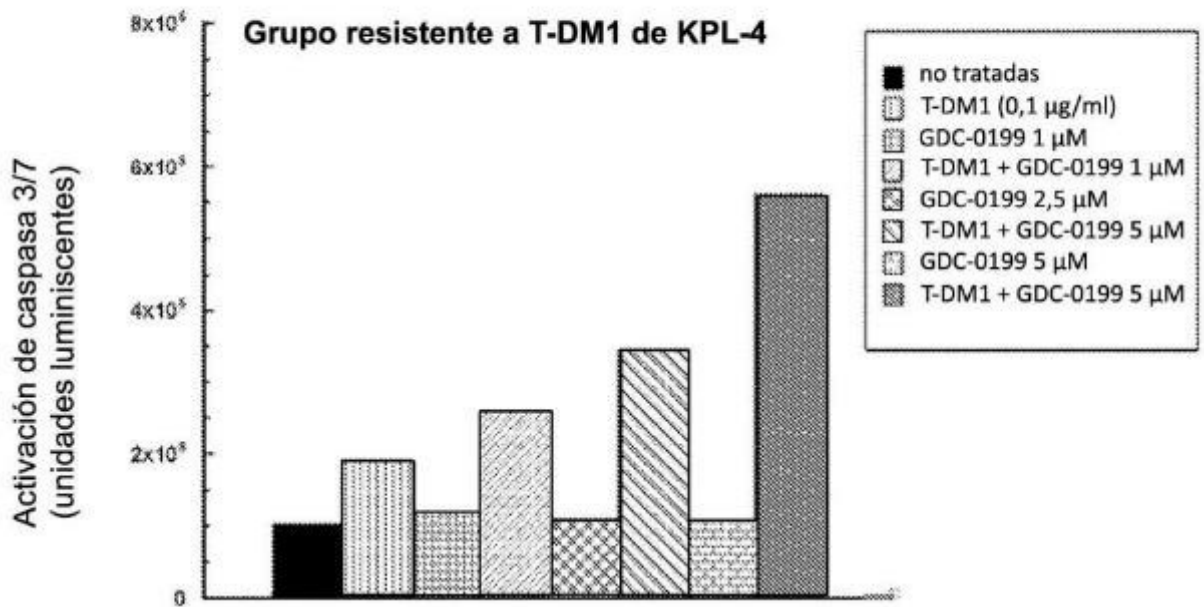
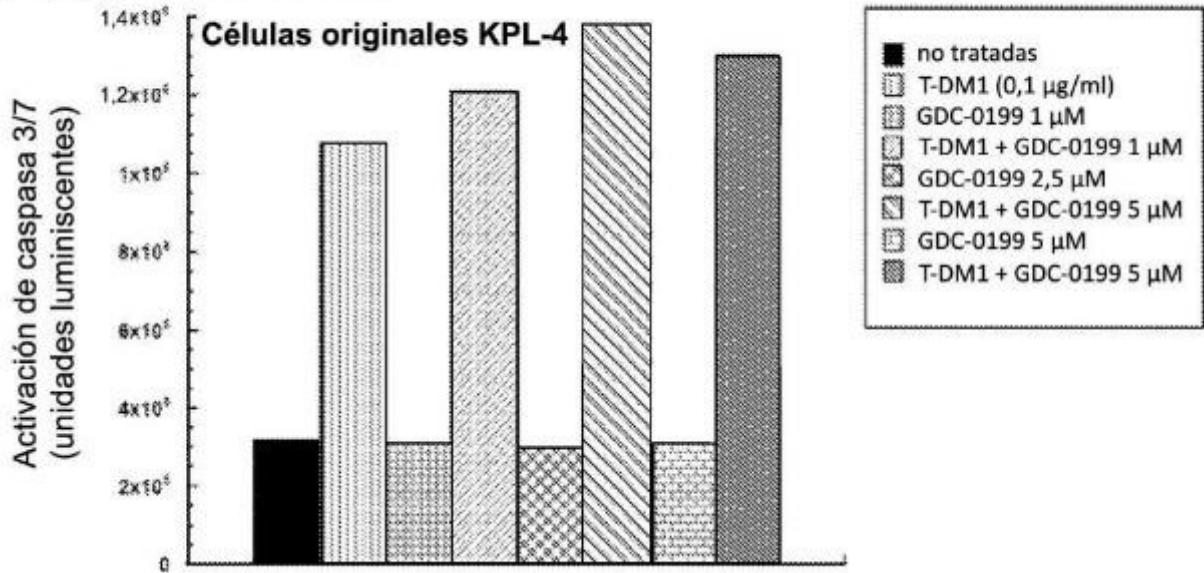


FIG. 4B

1 $\mu\text{g/ml}$ de T-DM1

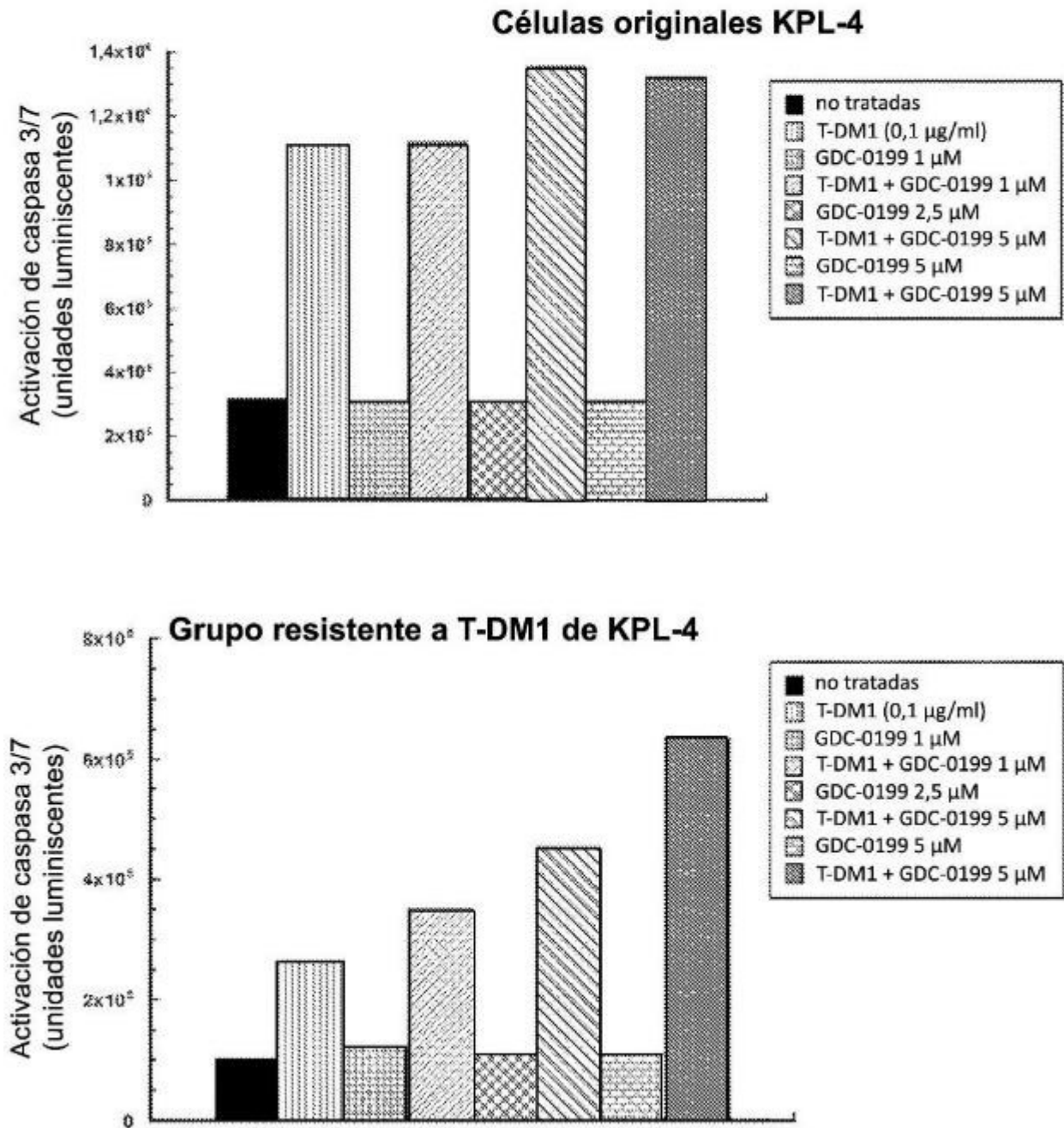


FIG. 5A

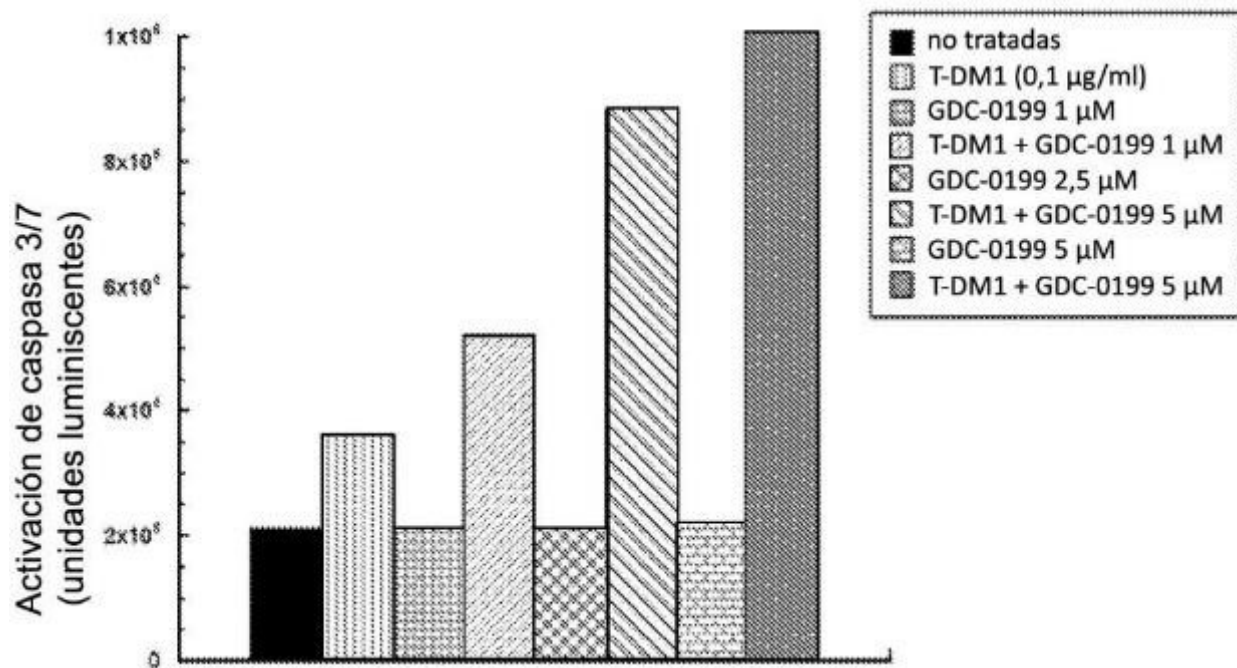


FIG. 5B

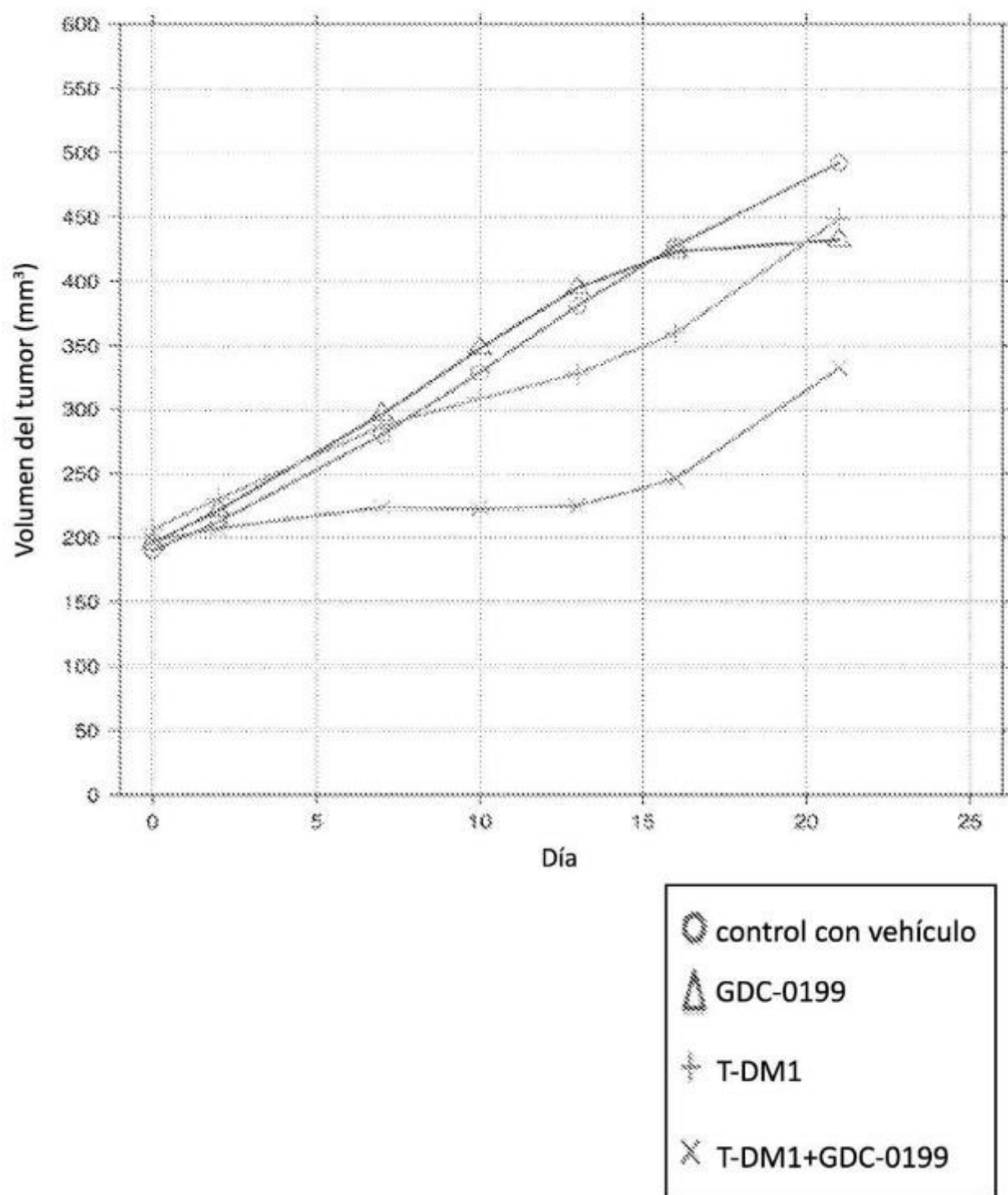


FIG. 6A

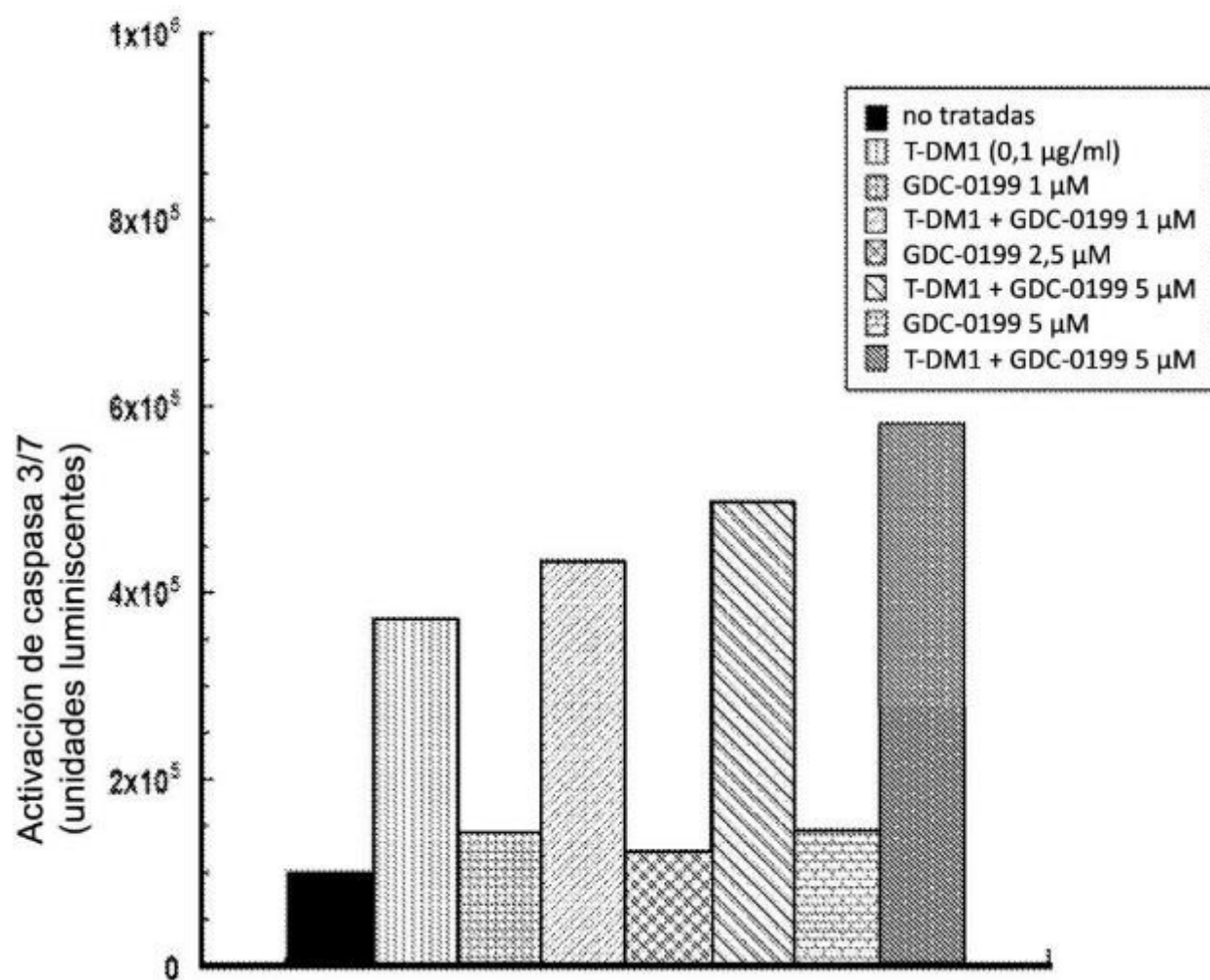


FIG. 6B

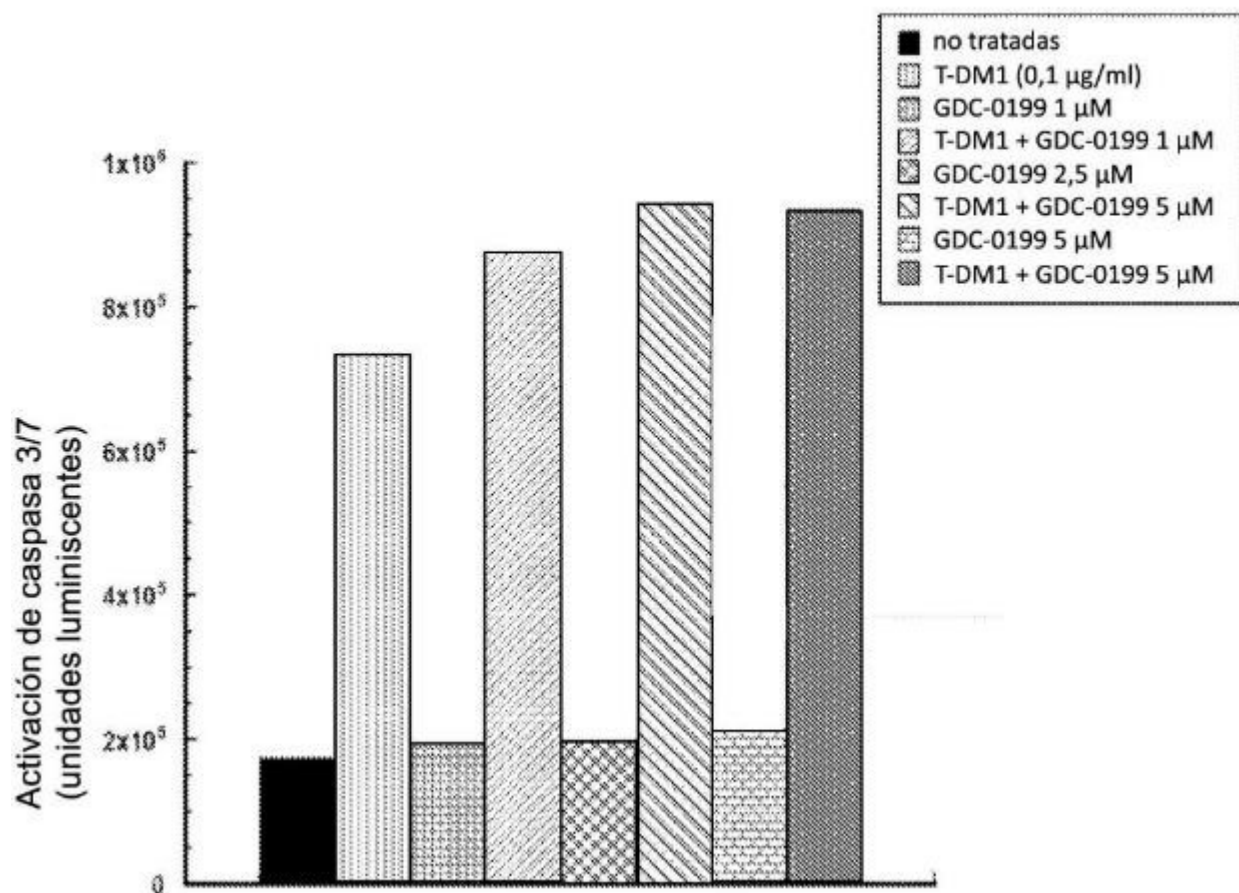
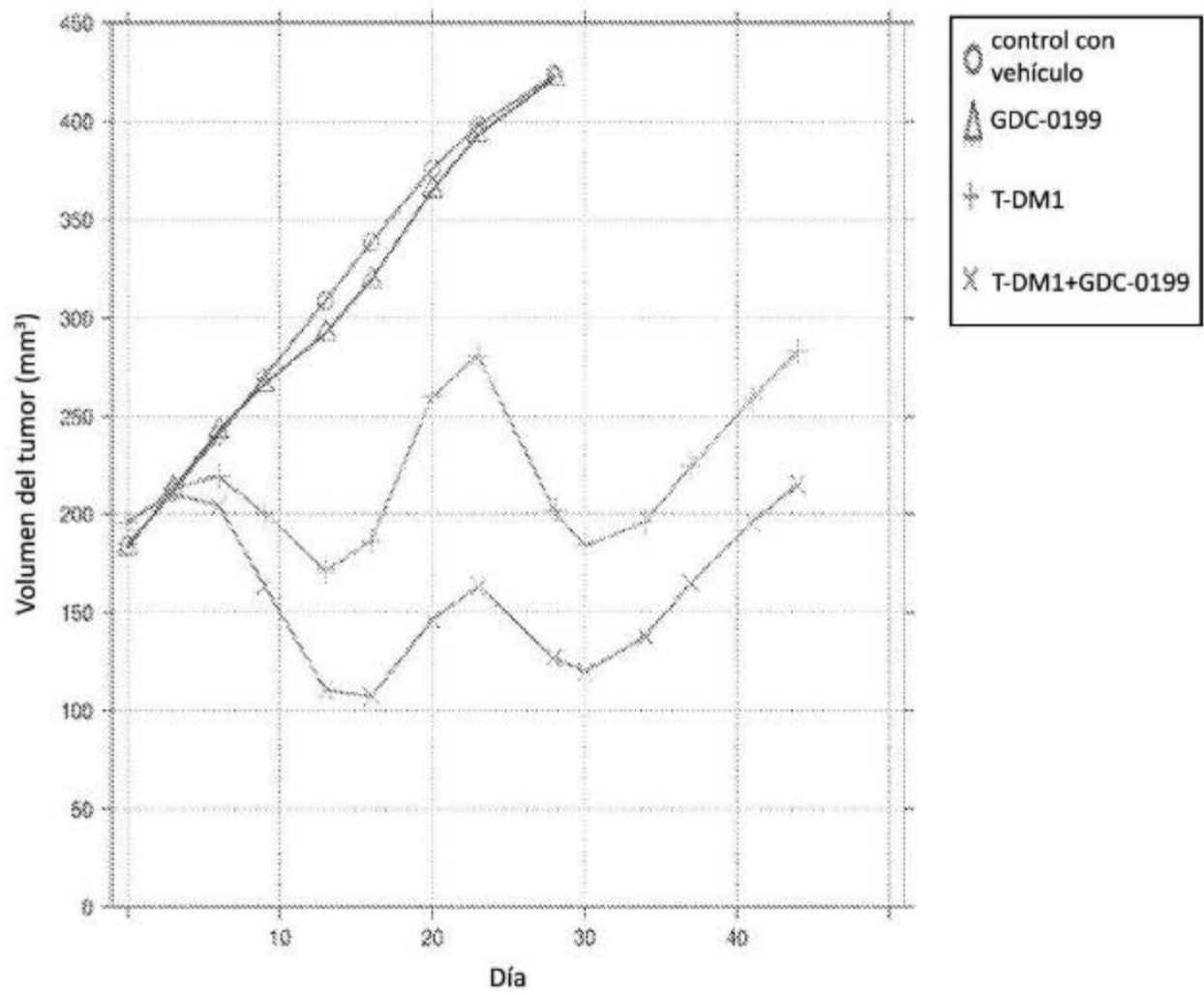


FIG. 6C



<u>Grupo</u>	<u>Puntuación H</u>	<u>comentarios</u>
• Clon 7 con vehículo	15, 15, 15	Un 10% de las células son 1+/2+
• Clon 7 con T-DM1	30, 30	Un 20 % de las células son 1+/2+
• Clon 8 con vehículo	35, 10, 15	30 % 1+/2+; 10 % débilmente 1+; 10 % 1+/2+
• Clon 8 con T-DM1	15, 20, 40	13 % 1+/2+; 15 % 1+/2+; 35 % 1+/2+
• Clon 17 con vehículo	15, 10, 20	10 % 1+/2+; 10 % 1+; 15 % 1+/2+
• Clon 17 con T-DM1	40, 25, 25	30 % 1+/2+; 20 % 1+/2+; 20 % 1+/2+

FIG. 7A

<u>Grupo</u>	<u>Puntuación H</u>	<u>comentarios</u>
• Clon 7 con vehículo	295, 290, 290	95 % 3+/5 % 2+; 90 % 3+/10 % 2+; 90 % 3+/10 % 2+
• Clon 7 con T-DM1	290, 270	Un 90 % de células 3+/10 % 2+; 80 % 3+/10 % 2+/10 % 1+
• Clon 8 con vehículo	295, 290, 295	95 % 3+/5 % 2+; 90 % 3+/10 % 2+; 95 % 3+/10 % 2+
• Clon 8 con T-DM1	295, 295, 280	95 % 3+/5 % 2+; 95 % 3+/5 % 2+; 85 % 3+/10 % 2+/5 % 1+
• Clon 17 con vehículo	270, 235, 270	75 % 3+/20 % 2+/5 % 1+; 35 % 3+/65 % 2+; 75 % 3+/20 % 2+/5 % 1+
• Clon 17 con T-DM1	275, 260, 290	75 % 3+/25 % 2+; 70 % 3+/20 % 2+/10 % 1+; 90 % 3+/10 % 2+

FIG. 7B

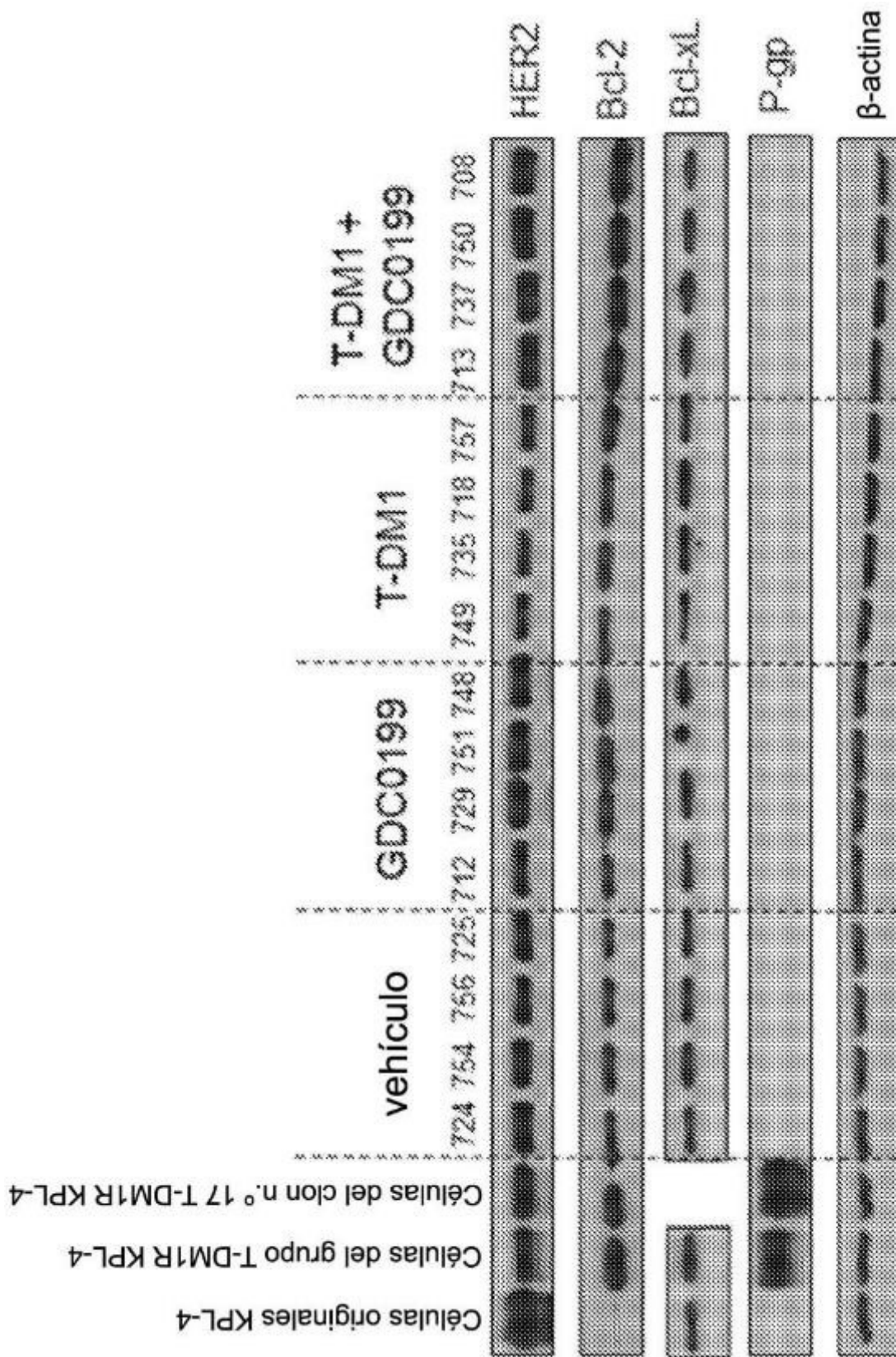


FIG. 8

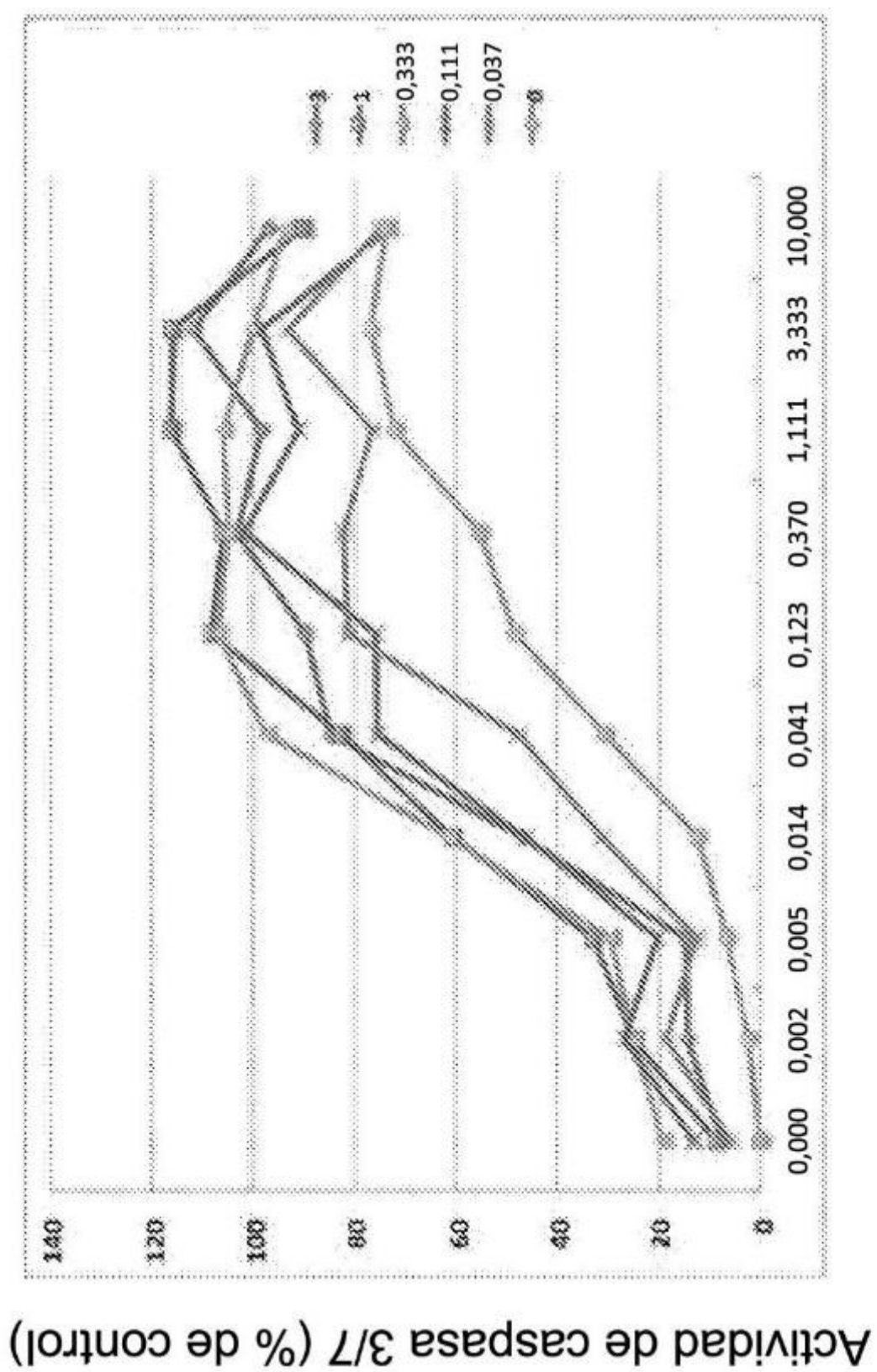
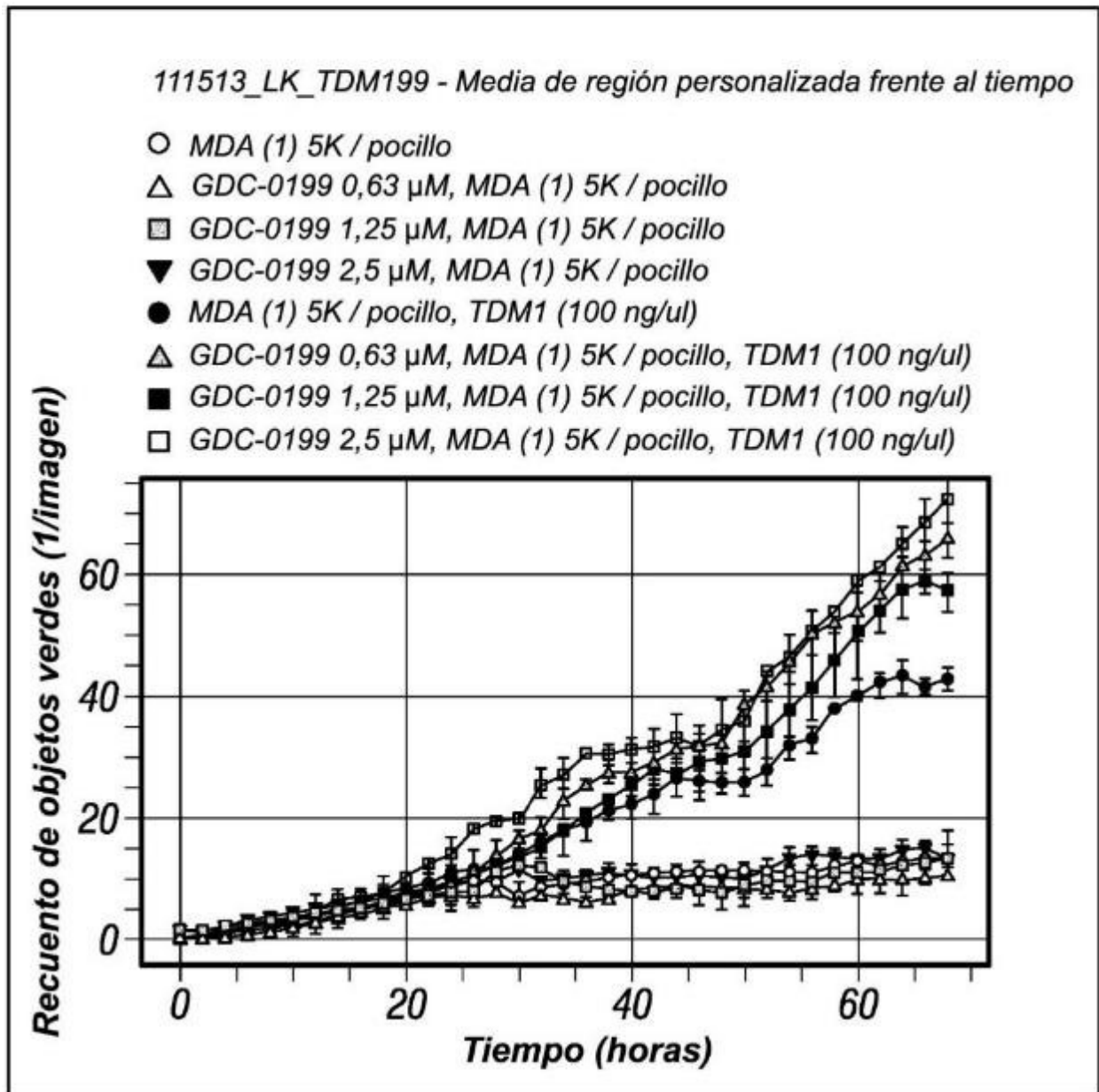


FIG. 9A

FIG. 9B



0,1 μ g/ml de T-DM1

GDC-0199 (μ M): 0,63 △
 1,25 ■
 2,5 □

FIG. 10A

Actividad de caspasa 3/7 (% de control)

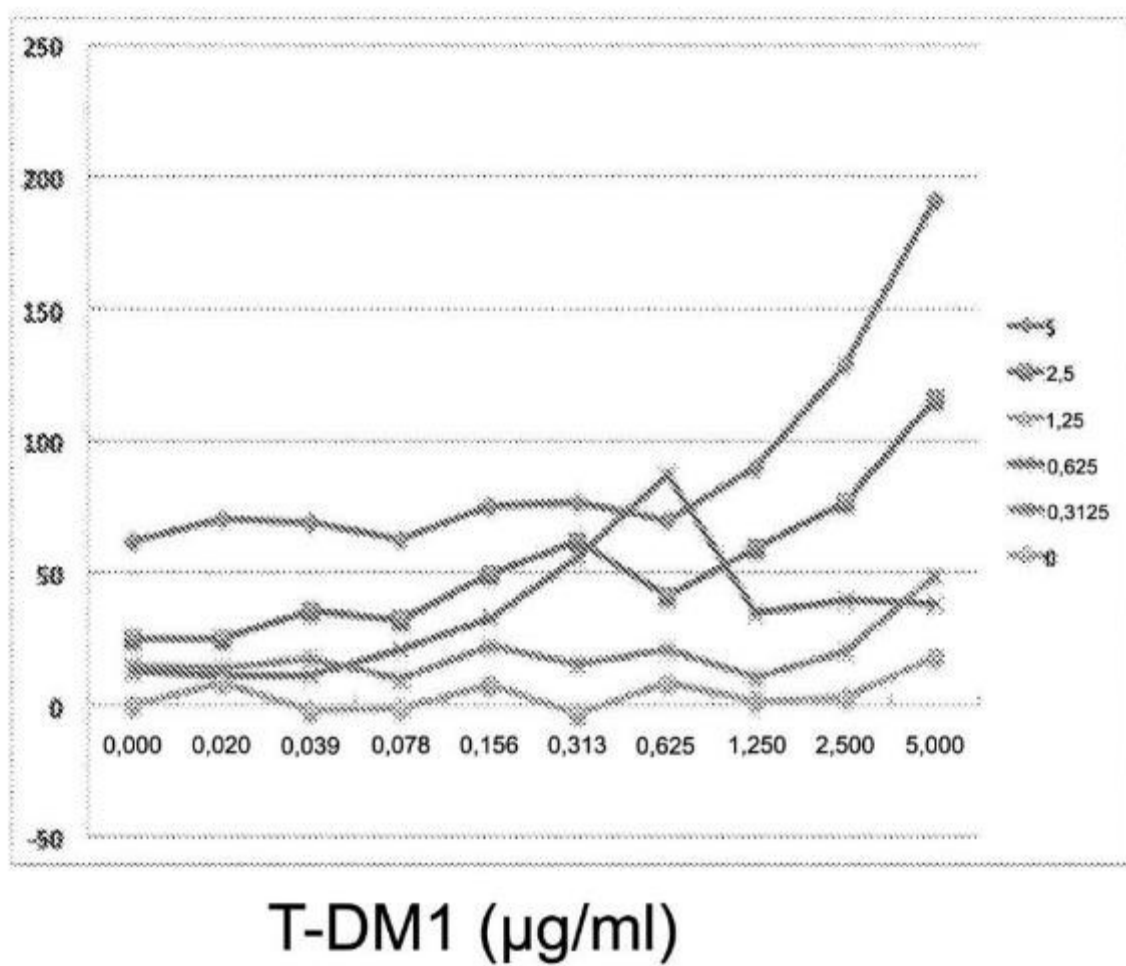
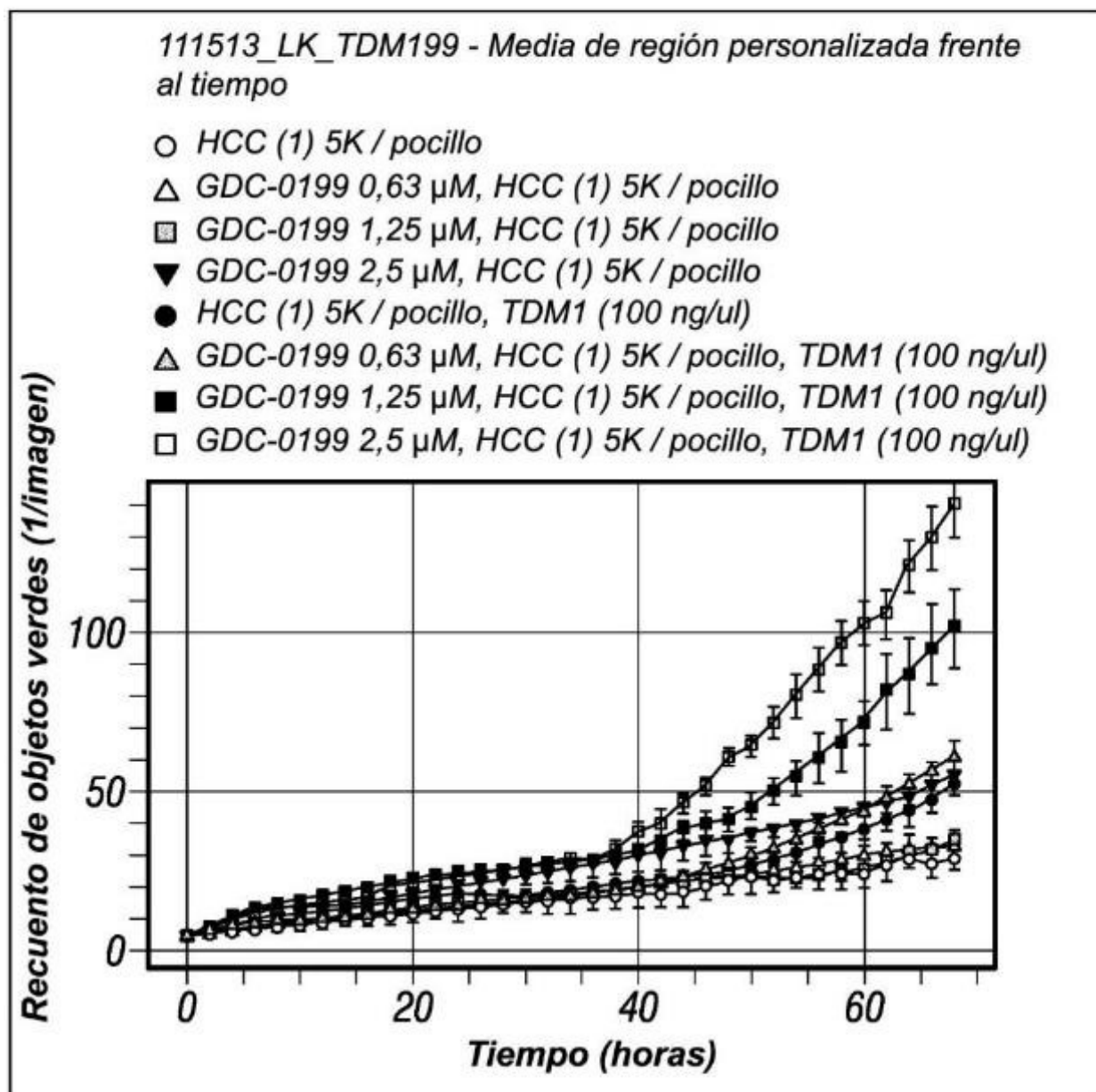


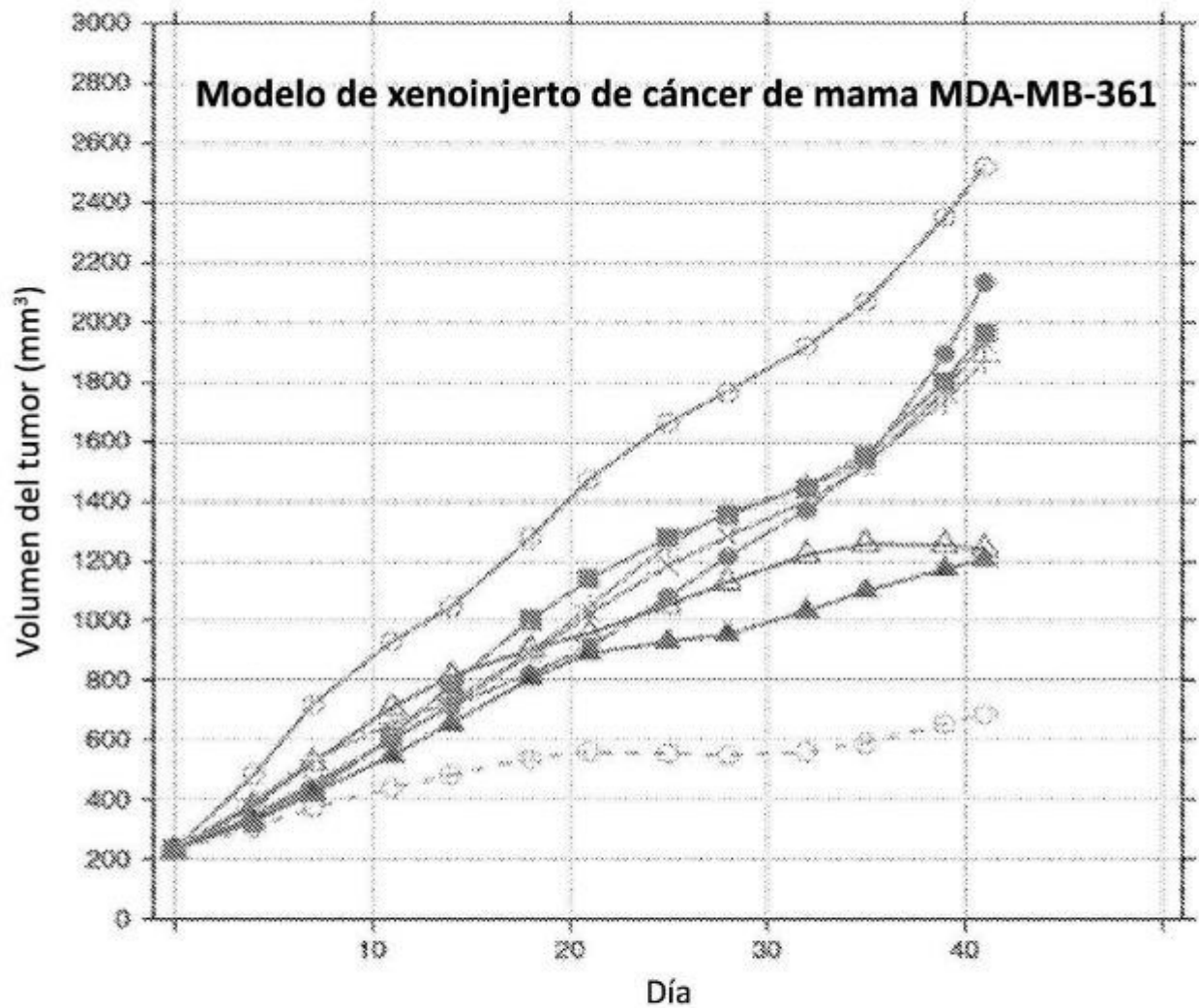
FIG. 10B



0,1 μ g/ml de T-DM1

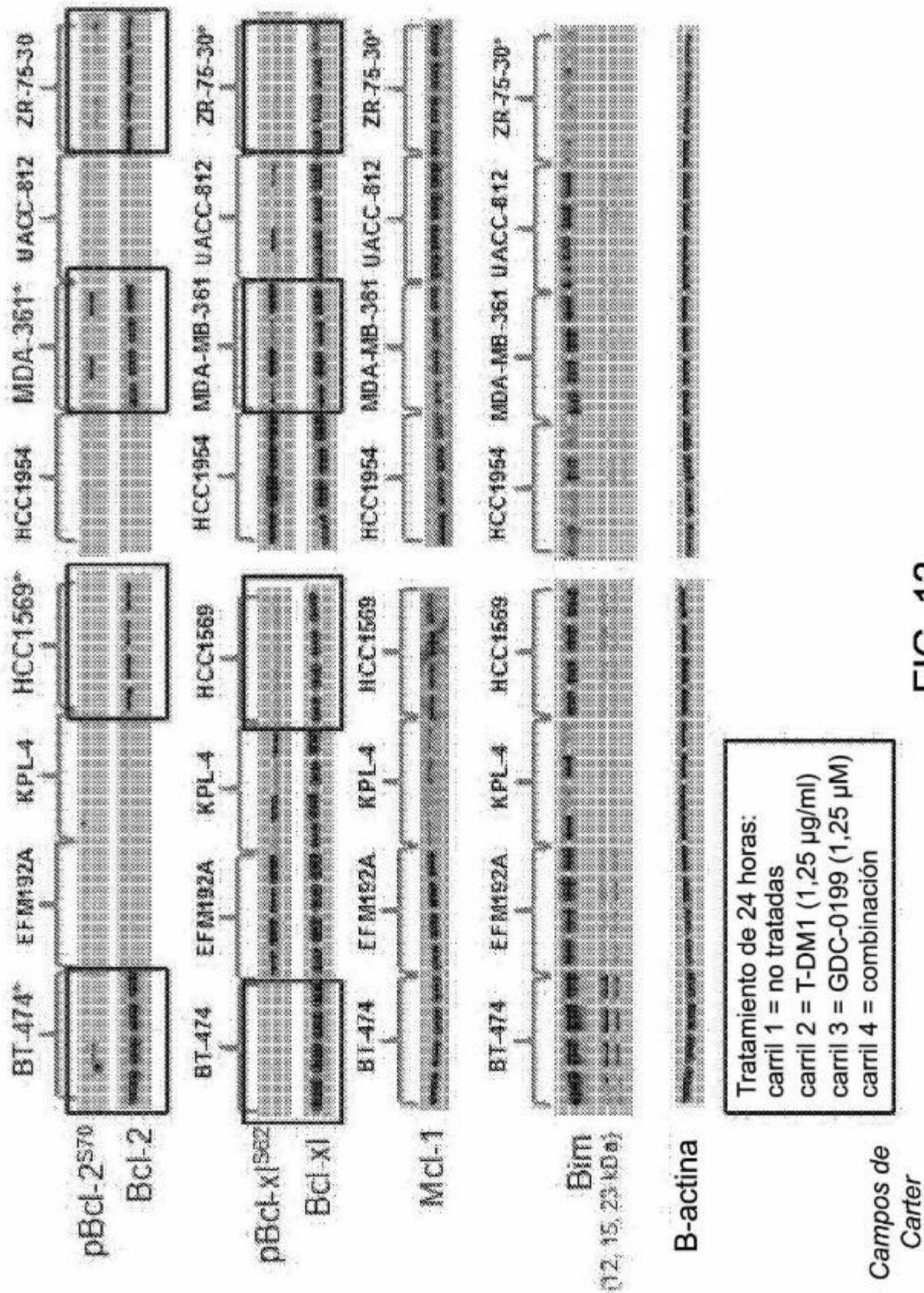
GDC-0199 (μ M): 0,63 △
 1,25 ■
 2,5 □

FIG. 11



Grupos de dosis

- 1-SB n.º 7 i.v. c3sx1; ABT Phosal n.º 1 v.o. c.d.x21
- 2-GDC-0199 100 mg/kg, v.o. c.d.x21
- 3-trastuzumab-DM1 1 mg/kg, i.v. c3sx1
- 4-trastuzumab-DM1 3mg/kg
- 5-trastuzumab-DM1 7 mg/kg
- 6-GDC0199 100 mg/kg + trastuzumab-DM1 1mg/kg
- 7-GDC-0199 100 mg/kg + trastuzumab-DM1 3mg/kg
- 8-GDC-0199 100 mg/kg + trastuzumab-DM1 7 mg/kg



1 15 30 45
 [DIQMTQSPSSLSASVGVGDRVTITCRASQDVTAVAWYQQKPGKAPK
 46 60 75 90
 LLIYSAFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 91 105 120 135
 HYTTPPTFGQGTKVEIK|RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
 136 150 165 180
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSLT
 181 195 210 214
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC

FIG. 13

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSNIKDTYIHWVVRQAPGKGL 45
 15 30
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90
 60 75
 91 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSSFPLAPSS 135
 105 120
 136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVLQSS 180
 150 165
 181 GLYSSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
 195 210
 226 THTCPPCPAPELLGGPSSVFLFPPKPKDITLMISRTPFVTCVVDVS 270
 240 255
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSITRYRVSVLTVLHQD 315
 285 300
 316 WLNQGEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
 330 345
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG 405
 375 390
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQQGNVFSCSVMH EALHNH Y TQKSLSLSPG 449
 420 435

FIG. 14