

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 640**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/EP2013/070741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13773731 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2903616**

54 Título: **Uso de masitinib en combinación con gemcitabina para tratamiento de un subgrupo de pacientes que sufren de cáncer pancreático**

30 Prioridad:

04.10.2012 EP 12306214

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**AB SCIENCE (100.0%)
3, avenue George V
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MOUSSY, ALAIN;
KINET, JEAN-PIERRE y
PIQUEMAL, DAVID**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 656 640 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

Uso de masitinib en combinación con gemcitabina para tratamiento de un subgrupo de pacientes que sufren de cáncer pancreático.

5 La presente invención se relaciona con un método para tratar pacientes afectados con cáncer, en donde dichos
 10 pacientes son tratados con un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, en
 particular masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico. El inhibidor de
 15 tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y el al menos un agente antineoplásico opcional,
 son administrados en un régimen de dosificación que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva. La
 presente invención también se relaciona con métodos para predecir la respuesta terapéutica a dicho
 20 tratamiento en un paciente dado y en consecuencia la identificación de subpoblaciones de pacientes adecuados
 en base a estos factores predictores; a veces referidos como biomarcadores predictivos. Un método está
 basado en el marcador clínico de intensidad de dolor. El segundo método está basado en biomarcadores
 predictivos de expresión génica evaluados mediante expresión de ARN en muestras de células de sangre
 periférica recolectadas antes del tratamiento con un compuesto de la invención (es decir un inhibidor de tirosina
 25 quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib). Ventajosamente, la presente
 invención se relaciona con un método para tratar pacientes que padecen cáncer pancreático en donde dichos
 pacientes son tratados con un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y en
 particular masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico, y en particular
 30 gemcitabina.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El rol de mastocitos en el microentorno tumoral, tumorigénesis y dolor por cáncer.

A lo largo del proceso de tumorigénesis, progresión de la enfermedad y metástasis, el microentorno del tejido
 hospedante local es un participante activo y determina el grado de proliferación de células cancerosas,
 angiogénesis, invasión y supervivencia. El rol de mastocitos en la tumorigénesis de cánceres no está bien
 25 comprendido, sin embargo es hipotéticamente posible que la activación de mastocitos facilite el crecimiento y
 expansión de algunos cánceres mediante la producción de moléculas que aumentan la invasividad tumoral.
 Por ejemplo, los mastocitos han sido directamente ligados al desarrollo de tumorigénesis de cáncer pancreático
 en modelos murinos, mostrando que elevados niveles de infiltración de mastocitos dentro del microentorno
 tumoral eran predictivos de pobres resultados clínicos, aunque el mecanismo exacto mediante el cual los
 30 mastocitos contribuyen al desarrollo de cáncer pancreático no estaba claro [Chang DZ y col., Clin Cancer Res
 2011;17:7015-7023]. Por lo tanto, la inhibición de la función de mastocitos puede demostrar ser de beneficio
 terapéutico en la contención del crecimiento de cánceres para los cuales existe suficiente involucramiento de
 mastocitos.

Sin embargo, exactamente cuáles cánceres se beneficiarían a partir de tener como objetivo la actividad de
 35 mastocitos es en gran medida desconocido o controversial. Existen datos conflictivos sobre si los mastocitos
 benefician u obstaculizan la tumorigénesis, dependiendo de las condiciones estromales locales y si los
 mediadores liberados facilitan la proliferación de células tumorales o inducen la apoptosis de células malignas
 [(Theoharides TC, y col. Trends Immunol 2004;25:235-41); (Samoszuk M, y col., BMC Cancer 2005;21:121);
 (Almholt K, y col., Recent Results Cancer Res 2003;162:31-42); Gooch JL, y col., Cancer Res 1998; 15:4199-
 40 205]]. Más aún, consistente con los roles duales de los mastocitos en inhibir o promover el crecimiento tumoral,
 altos números de mastocitos han demostrado representar un buen indicador de diagnóstico en cáncer de
 mama, carcinoma de células pulmonares no pequeñas, y cáncer ovárico [(Galinsky DS, y col., Crit Rev Oncol

Hematol 2008;68:115-30); (Ribatti D, y col., Int Rev Cell Mol Biol 2009;275:89-131)] pero están asociados con un pobre pronóstico en cáncer de piel (tanto melanoma como tumores de células de Merkel no melanoma) [Grimbaldeston MA, y col., Br J Dermatol 2004;150:895-903]; (Grimbaldeston MA, y coll., J Invest Dermatol 2000;115:317-20)], carcinoma oral de células escamosas, diversos tipos de linfoma, y cáncer de próstata
 5 [(Galinsky DS, y col., Crit Rev Oncol Hematol 2008;68:115-30); (Ribatti D, y col., Int Rev Cell Mol Biol 2009;275:89-131)]. También permanece sin clarificación si la densidad de mastocitos o el grado de activación de mastocitos representa la consideración clave en los síntomas relacionados con mastocitos, estando estos dos aspectos no necesariamente correlacionados entre sí [Hermine O, y col., PLoS ONE. 2008;3:e2266].

Los mastocitos están asociados con dolores relacionados con diversas enfermedades y está surgiendo como
 10 que tienen un rol en el dolor por cáncer. Los mastocitos han sido vinculados a la patogénesis de dolor en condiciones para las cuales el dolor es un síntoma predominante pero es considerado como fuera de proporción para el objetivo de hallazgos patológicos, es decir indicando que las anomalías anatómicas no pueden solas responsabilizarse por el dolor; los ejemplos incluyen pancreatitis crónica, cistitis intersticial y síndrome de intestino irritable. Cada una de estas condiciones ha sido asociada con un número incrementado
 15 de mastocitos en el páncreas, vejiga o colon, respectivamente, comparando con aquellos pacientes sin dolor relacionado a enfermedades. Aunque la etiología del dolor por cáncer permanece sin clarificación, el entendimiento actual indica que dentro del microentorno canceroso, el cáncer y células inmunes producen y secretan mediadores que activan y sensibilizan nociceptores aferentes primarios. Schmidt y col., revisaron los mecanismos del dolor por cáncer [Schmidt BL, y col., Mol Interv. 2010 Jun;10(3):164-78], resumiendo los
 20 síntomas experimentados por el paciente con cáncer como una consecuencia de los cambios celulares, tisulares y sistémicos que ocurren durante la proliferación, invasión y metástasis, teniendo también el sistema de respuesta inmune un claro rol en el dolor por cáncer.

Así, aunque existe evidencia para involucramiento indirecto, diverso, de mastocitos en tumorigénesis (es decir en oposición a los mastocitos en sí mismos siendo células cancerosas proliferantes) y también en dolor por
 25 cáncer, su naturaleza heterogénea y dispar precluye cualquier estrategia clara de cómo la diana en la actividad de mastocitos podría tener un impacto terapéutico para pacientes con cáncer; un impacto preferiblemente manifestado como un aumento del tiempo de supervivencia. Esto es igualmente cierto para aquellos cánceres que tienen una asociación establecida con incrementado involucramiento de mastocitos, tal como cáncer pancreático.

30 *Dolor por cáncer y control farmacoterapéutico del dolor*

La etiología del dolor por cáncer es compleja y permanece pobremente comprendida. El dolor por cáncer puede ser severo y debilitante, reduciendo drásticamente la calidad de vida en pacientes que ya tienen una expectativa de vida atenuada. Considerando en particular el cáncer pancreático, el dolor abdominal y de
 35 espalda es una complicación significativa con casi 75% de pacientes con cáncer pancreático no extirpable que sufren de dolor en el momento del diagnóstico, aumentando a más del 90% de pacientes con la enfermedad avanzada [Hameed M, y col, Cancers 2011. 3, 43-60]. El dolor en el cáncer pancreático puede ser visceral, somático o neuropático en origen y es producido por tejido dañado, inflamación, obstrucción de conductos e infiltración. El dolor nociceptivo visceral es causado por daño a las vísceras abdominales superiores, estructuras que son particularmente sensibles al estiramiento, isquemia e inflamación, lo cual típicamente
 40 produce un dolor poco localizado, difuso. El dolor somático y neuropático pueden surgir de la extensión del tumor dentro del peritoneo circundante, retroperitoneo, huesos y en este último caso, nervios tales como el plexo lumbosacro.

Comúnmente se utilizan analgésicos opioides para gestionar el dolor por cáncer, siendo su mecanismo de acción la acción directa sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, esto puede también conducir a efectos secundarios no deseados, tales como constipación, somnolencia, mareos, problemas respiratorios y dependencia física o mental. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado un enfoque estandarizado para regímenes de drogas analgésicas administradas para el control de dolor crónico por cáncer en forma de una "escala analgésica" [Disponible en línea: www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/ (accesible el 13 de marzo de 2012)]. Este modelo recomienda que si ocurre dolor, debe haber una pronta administración oral de drogas en el siguiente orden: "no opioides tal como paracetamol para dolor suave; luego, si es necesario, opioides suaves como codeína para dolor moderado; luego opioides fuertes tales como morfina para dolor moderado a severo, hasta que el paciente esté libre de dolor. Para calmar temores y ansiedad, deben utilizarse drogas adyuvantes. Para mantener libre de dolor deben ser administradas drogas en un programa regular, esto es cada 3-6 horas en vez de según demanda". Este enfoque en etapas está basado en la severidad del dolor antes que en el proceso fisiopatológico del dolor, aunque se ha recomendado que para incrementar la eficacia de las modalidades terapéuticas disponibles, deben también ser tenidos en consideración los múltiples tipos de procesos generadores de dolor en cáncer (visceral, somático y neuropático) [Hameed M, y col., *Cancers* 2011, 3, 43-60].

Evaluación de dolor por cáncer y calidad de vida en pacientes con cáncer

Con el objeto de evaluar y registrar el dolor por cáncer, el médico debe seleccionar apropiados instrumentos y procedimientos de evaluación. Sin embargo, no existe actualmente ninguna herramienta de evaluación de dolor por cáncer universalmente aceptada ni consenso incluso respecto a qué debería evaluar dicha herramienta. Como consecuencia, hay una gran diversidad de dimensiones e ítems utilizados en las herramientas existentes, que pueden afectar la validez de la evaluación del dolor en general y también hacen dificultosas las comparaciones entre estudios. Las herramientas de evaluación del dolor pueden ser unidimensionales o multidimensionales. En base a las revisiones en la literatura y opiniones de grupos de trabajo expertos, se acepta generalmente que las herramientas unidimensionales de ítem único están entre las herramientas de evaluación más frecuentemente utilizadas en pacientes con cáncer. Más aún, para una simple evaluación de cambios en la intensidad de dolor y para evaluación de la intensidad de dolor en entornos clínicos, las herramientas basadas en la Escala Visual Analógica (VAS, por sus siglas en inglés) han demostrado ser psicométricamente satisfactorias [Jensen, MP, y col., *J Pain* 2003;4(1): 2e21]. Las herramientas de evaluación de dolor unidimensionales incluyen la escala de valoración numérica (0 es "sin dolor" y 10 es "el peor dolor imaginable"); una escala de descriptores verbales ("sin dolor", "dolor suave", "dolor moderado", "dolor severo"); o una escala de análogos visuales (una línea de 100 mm con anclas tales como "sin dolor" a la izquierda y "el peor dolor imaginable" a la derecha) sobre la cual el paciente indica el lugar en la línea que mejor representa la intensidad del dolor). Cada escala tiene sus fortalezas y debilidades; sin embargo, la mayoría de las mediciones auto-reportadas de intensidad de dolor están fuertemente relacionadas entre sí y pueden ser utilizadas de manera intercambiable en muchas situaciones, especialmente cuando se han dado instrucciones claras y una oportunidad para practicarlas.

El dolor subjetivo puede ser categorizado en al menos cuatro factores específicos: intensidad de dolor, afectación del dolor, alivio del dolor y calidad del dolor [Jensen, MP, y col., en: Chapman CR, Foley KM, eds.: *Current and Emerging Issues in Cancer Pain: Research and Practice*. Nueva York, NY: Raven Press, 1993, págs. 193-218]. La intensidad del dolor refleja cuánto sufre una persona, y es el factor más importante del dolor para el propósito de la descripción de la presente invención. Para un paciente, la valoración de la intensidad del dolor es una tarea de estimación. Los pacientes son usualmente capaces de proveer estimaciones de la

intensidad del dolor relativamente rápido y las mediciones de la intensidad del dolor tienden a estar estrechamente relacionadas entre sí estadísticamente. La intensidad del dolor puede en consecuencia ser vista como una dimensión bastante homogénea que es relativamente fácil de medir para la mayoría de la gente. Los tres métodos más comúnmente utilizados para evaluar la intensidad del dolor son la Escala de Valoración Verbal, la Escala Visual Analógica (VAS, por sus siglas en inglés) y la Escala de Valoración Numérica. Mediciones menos utilizadas comúnmente incluyen la Escala de Valoración de Comportamiento, la Escala de Imágenes, la Escala de Cajas, y la Escala Diferencial de Descriptores [Jensen, MP, y col., En: Chapman CR, Foley KM, eds.: Current and Emerging Issues in Cancer Pain: Research and Practice. Nueva York, NY: Raven Press, 1993, págs. 193-218].

Las Escalas Visuales Analógicas son probablemente el instrumento más frecuentemente utilizado para evaluar la intensidad del dolor en el escenario de investigación de resultados relacionados con tratamientos. Las VAS consisten en una línea, usualmente de 10 cm de longitud, cuyos extremos están marcados como los extremos del dolor (por ejemplo, “sin dolor” hasta “dolor tan malo como podría ser”). Si una VAS tiene puntos específicos a lo largo de la línea que están marcados con adjetivos o números que denotan intensidad, la misma es referida como una Escala de Valoración Gráfica de Intensidad de Dolor. Los pacientes son simplemente interrogados para indicar qué punto a lo largo de la línea representa mejor su intensidad de dolor. Usualmente, el evaluador del dolor permite que el paciente practique utilizando la medición para estar seguro de que la tarea de evaluación es comprendida. La distancia desde el extremo sin dolor hasta la marca hecha por el paciente es el puntaje de intensidad de dolor de ese paciente. Existe mucha evidencia que soporta la validez de las VAS de la intensidad de dolor. Las VAS están directamente correlacionadas con otras mediciones auto-reportadas de intensidad de dolor, así como el comportamiento observado al dolor [ver Jensen, 1993 y referencias contenidas allí]. Como las VAS están usualmente medidas en milímetros, tienen un gran número de categorías de respuestas, es decir la escala puede ser considerada como teniendo 101 puntos, haciéndola potencialmente más sensible a cambios en la intensidad de dolor que las mediciones con números limitados de categorías de respuestas. La investigación indica que las VAS de intensidad de dolor son usualmente (pero no siempre) más sensibles a cambios de tratamientos que las Escalas de Valoración Verbales de 4 o 5 puntos.

Las herramientas de evaluación de dolor multidimensionales (también referidas a veces como cuestionarios de evaluación de dolor) proveen una medida de dolor clínico que captura sus componentes sensoriales, afectivos y otros cualitativos que se extiende más allá de la medición básica de intensidad de dolor. Teóricamente, las herramientas multidimensionales deben ser más confiables y en consecuencia potencialmente más sensibles para detectar cambios en el dolor asociados con el tiempo o con el tratamiento; sin embargo, son más complejas y largas para completar que las herramientas unidimensionales. Adicionalmente, como las herramientas de evaluación de dolor o de calidad de vida (QOL, por sus siglas en inglés) multidimensionales fueron generalmente diseñadas para evaluar cambios en la QOL relacionados con la salud en un escenario de ensayo clínico, sus puntajes son sólo informativos cuando se utilizan en un escenario comparativo, es decir brazos de tratamiento comparativos, y en consecuencia, un puntaje individual único no es considerado como informativo. Los ejemplos de herramientas de evaluación de dolor o de calidad de vida (QOL) multidimensionales principales utilizadas en evaluación de dolor por cáncer incluyen: el cuestionario de calidad de vida núcleo de 30 ítems de la Organización Europea para Investigación y Tratamiento de Cáncer (EORTC QLQ C-30, por sus siglas en inglés); el Inventario Breve de Dolor (BPI, por sus siglas en inglés) y el Cuestionario de Dolor de McGill.

Considerando el cáncer pancreático en particular, entonces la herramienta multidimensional EORTC es discutiblemente la más aplicable, aunque esto aún debe ser demostrado en la práctica. El EORTC QLQ C-30

es un cuestionario auto-reportado de 30 ítems desarrollado para evaluar la calidad de vida de pacientes con cáncer [Aaronson, NK y col., J Natl Cancer Inst 85(5):365-76, 1993]. De manera significativa, está suplementado por módulos específicos para enfermedades, incluyendo un módulo específico para cáncer pancreático (QLQ-PAN26), el cual incluye 26 ítems relacionados con síntomas de la enfermedad, efectos secundarios del tratamiento y asuntos emocionales. El cuestionario QLQ-C30 ha sido validado pero el módulo QLQ-PAN26 aún no está validado y aún necesita ser sometido a ensayos psicométricos en un gran grupo internacional de pacientes.

En general, la complejidad y carga agregadas para el paciente asociadas con la implementación de herramientas multidimensionales contrarrestan sus ventajas cuando el objetivo es medir la intensidad de dolor por cáncer o clasificar pacientes de acuerdo con este parámetro. Así, las herramientas unidimensionales siguen siendo la opción disponible de evaluación de dolor más apropiada para el propósito de describir el dolor en la presente invención.

Perfilado e identificación de la expresión génica de subpoblaciones de tratamiento

Las alteraciones en el genoma que conducen a una variedad de aberraciones cromosómicas son una característica de todos los tumores malignos. Además de las mutaciones génicas, el crecimiento del tumor también está sostenido por un nivel alterado de expresión génica. El perfilado de la expresión génica es la medida de la expresión (es decir actividad) de miles de genes simultáneamente, para crear una imagen global de la función celular o una "huella digital" genética de una muestra fisiológica/patológica particular. En el contexto de cáncer, el perfilado de expresión génica ha sido utilizado para clasificar tumores con más precisión; adicionalmente, la comparación de perfiles de expresión puede identificar subpoblaciones en las cuales los genes son regulados positivamente o negativamente en forma consistente. Por lo tanto, la información derivada del perfilado de expresión génica tiene el potencial de realizar un diagnóstico objetivo, para identificar genes que se correlacionan con la supervivencia, para proveer una evaluación de riesgo de lesiones pre-malignas, y para predecir respuestas a ciertos tratamientos. En este último ejemplo, se pueden contestar preguntas de significancia clínica directa tal como la probabilidad de un paciente de responder a una droga, dada la huella digital genética de dicho paciente.

Visión general del cáncer pancreático

El páncreas contiene células exocrinas (involucradas en la producción de enzimas importantes para la digestión de alimentos) y células endocrinas (que producen hormonas tales como la insulina). Tanto las células exocrinas como las endocrinas pueden formar tumores, pero aquellos formados por el páncreas exocrino son mucho más comunes y están asociados con un muy mal pronóstico. La gran mayoría de tumores pancreáticos exocrinos son adenocarcinomas. Los tumores del páncreas endocrino (también conocidos como tumores de células de islotes) son mucho menos comunes y mayormente benignos en naturaleza.

El cáncer del páncreas exocrino (referido de aquí en adelante como cáncer pancreático) es un trastorno que amenaza seriamente la vida. En la mayoría de los casos, los estadios tempranos de la enfermedad son asintomáticos y menos del 20% de los cánceres pancreáticos son tratables con cirugía. De aquellos pacientes que son sometidos a resección tumoral, sólo el 20% sobrevive 5 años. El diagnóstico temprano de cáncer pancreático es difícil porque los síntomas pueden variar y no son específicos. Los síntomas son primariamente causados por el efecto de la masa antes que por la disrupción de las funciones exocrinas o endocrinas y dependen del tamaño y ubicación del tumor, así como de la presencia de metástasis. Los cánceres que comienzan en la cabeza del páncreas están cercanos al conducto biliar común. Estos cánceres pueden comprimir el conducto mientras aún son bastante pequeños, lo cual puede posiblemente conducir a

ictericia y permiten que estos tumores sean detectados en una etapa temprana. Los cánceres que comienzan en el cuerpo o cola del páncreas no comprimen el conducto hasta que se han extendido a través del páncreas. En ese momento, el cáncer puede también haberse extendido más allá del páncreas, frecuentemente al hígado, lo cual también conduce a ictericia. Todos los síntomas comúnmente asociados a cáncer pancreático pueden tener otras múltiples causas, complicando adicionalmente el diagnóstico con la consecuencia de que el cáncer pancreático es frecuentemente diagnosticado en un estadio avanzado. Más aún, los cánceres pancreáticos invasivos y metastásicos responden poco a los tratamientos existentes en quimioterapia y radioterapia, estando los altos niveles de antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9), y un estado ≥ 2 del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) asociados con un mal pronóstico. La tasa de mortalidad permanece obstinadamente elevada durante las décadas pasadas, teniendo los pacientes que reciben tratamiento estándar una mediana de supervivencia después del diagnóstico de 3-6 meses y 9-12 meses para pacientes con enfermedad metastásica y localmente avanzada, respectivamente. La tasa de supervivencia global de 5 años está por debajo del 5%.

Tratamiento de cáncer adenocarcinoma pancreático

El tratamiento de cáncer pancreático depende del estadio del cáncer, como se describe en la Tabla 1. Cuando la enfermedad está confinada al páncreas y claramente separada de los vasos sanguíneos del entorno (es decir es local y extirpable), el tratamiento de elección es la cirugía con quimioterapia y/o radiación posoperatorias. Cuando la enfermedad encierra o comprime los vasos sanguíneos del entorno o se ha extendido dentro de estructuras adyacentes (es decir avanzada localmente y no extirpable), se proponen quimioterapia y/o radiación. En raros casos, cuando el paciente responde bien al tratamiento, el tumor puede subsiguientemente ser extirpado quirúrgicamente. Cuando la enfermedad se ha extendido a órganos distantes (es decir metastásica), se propone la quimioterapia. En la mayoría de los casos, estos tratamientos no representan una cura.

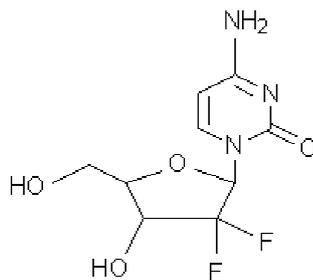
Tabla 1: Estadios y tratamiento de cáncer pancreático

Estadio	Descripción	Casos de cáncer pancreático	Opciones de tratamiento	Mediana de supervivencia
Local o extirpable	La enfermedad está confinada al páncreas y está claramente separada de los vasos sanguíneos del entorno	15%	Cirugía; también pueden ofrecerse quimioterapia y/o radiación posoperatorias	11-18 meses
Localmente avanzado o no extirpable	La enfermedad encierra o comprime vasos celulares del entorno o se ha extendido directamente dentro de estructuras adyacentes	40%	Quimioterapia (lo más común en base a gemcitabina) y/o radiación. En muy raras instancias, los cánceres que responden bien al tratamiento inicial pueden subsiguientemente ser extirpados quirúrgicamente	10-12 meses
Metastásico	Evidencia de expansión extrapancreática a órganos distantes (hígado, pulmones, etc.)	45%	Quimioterapia (lo más común basada en gemcitabina); ensayos de investigación	5-7 meses

5 Puede utilizarse quimioterapia en pacientes con cáncer no extirpable avanzado (localmente avanzado o metastásico) y en pacientes con enfermedad localizada después de cirugía o incluso como tratamiento neoadyuvante para encoger el tumor antes de cirugía. Durante décadas, 5-fluorouracilo (5-FU) fue el agente quimioterapéutico más ampliamente utilizado en cáncer pancreático metastásico hasta que un estudio aleatorio

10 mostró un beneficio en los síntomas y prolongación de la supervivencia de la gemcitabina (Gemzar®, Lilly France) respecto de 5-fluorouracilo (5-FU). La gemcitabina, un análogo nucleosídico de la citidina, ahora está establecido como el tratamiento sistémico estándar para pacientes con adenocarcinoma pancreático localmente

15 avanzado, no extirpable o metastásico. Sin embargo, la eficacia de la gemcitabina como un único agente sigue siendo modesta, con una mediana de supervivencia de aproximadamente 6 meses en ensayos aleatorios y una supervivencia de 12 meses de aproximadamente 20%. El antimetabolito gemcitabina (CAS número 95058-81-4; (4-amino-1-[3,3-difluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)tetrahydrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2-ona) reemplaza a la citidina durante la replicación de ADN dando por resultado apoptosis en las células cancerosas. La gemcitabina tiene la siguiente fórmula:



Hasta la fecha, numerosos ensayos clínicos han explorado la combinación de gemcitabina con compuestos citotóxicos o con diana biológica, sin embargo los resultados han sido casi universalmente desalentadores, mostrando poco o ningún beneficio comparados con la monoterapia de gemcitabina. Las causas de cáncer

5 pancreático no son bien comprendidas pero conforme se van descubriendo diferencias entre células de cáncer pancreático y células normales, nuevas drogas están tratando de explotar esas diferencias mediante el ataque solamente de dianas específicas. Así, la atención está siendo dirigida crecientemente hacia el rol de los factores de crecimiento. Varios factores de crecimiento y sus receptores son sobreexpresados durante la progresión del cáncer pancreático, tal como el factor de crecimiento epitelial (EGF, por sus siglas en inglés), el

10 factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). La expresión desregulada de tirosina quinasas citoplásmicas también ha sido asociada con mal pronóstico y quimiorresistencia. En particular, la resistencia a la gemcitabina en cáncer pancreático está a menudo asociada con elevada expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés), una

15 proteína involucrada en la metástasis; y elevada expresión y actividad de las quinasas de la familia de Src (SFK, por sus siglas en inglés), incluyendo SRC y Lyn, también han sido informadas en numerosas líneas celulares de cáncer y tejidos tumorales humanos. Más aún, la evidencia indica que el reclutamiento de células inflamatorias, incluyendo infiltración mediante mastocitos, facilita el crecimiento y expansión de cáncer mediante la producción de moléculas que aumentan la invasividad del tumor.

20 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) es la diana de varias drogas bajo desarrollo, incluyendo erlotinib (Tacerva®), cuya combinación con gemcitabina ha sido aprobada como tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer pancreático no extirpable. Se halló que esta combinación extendió modestamente la supervivencia en un ensayo clínico, con una SG mediana (6,24 meses) 2 semanas más que para la monoterapia con gemcitabina (5,91 meses), y una tasa de supervivencia de 1 año del 23% (ver 17% para brazo de tratamiento con monoterapia de gemcitabina; $p=0,023$) [Moore MJ, y col., J Clin Oncol. 2007 mayo 20; 25(15):1960-6].

Se llevó a cabo un ensayo aleatorio multicentro fase 2/3 para determinar la eficacia y seguridad de un régimen de quimioterapia de combinación de cuatro drogas (FOLFIRINOX) (consistente de leucovorin calcio, fluorouracilo, clorhidrato de irinotecan y oxaliplatino) comparado con gemcitabina como terapia de primera línea

30 en pacientes con cáncer pancreático metastásico [Conroy T, y col., N Engl J Med. 2011 mayo 12, 364(19):1817-25]. Cada una de las drogas en esta combinación está aprobada por la FDA para tratar cáncer o trastornos relacionados con cáncer. Los pacientes que recibieron el régimen Folfirinox vivieron aproximadamente 4 meses más que los pacientes tratados con el estándar corriente de cuidados, gemcitabina (11,1 meses comparado con 6,8 meses). La tasa de respuesta objetiva fue 31,6% en pacientes tratados con Folfirinox versus 9,4% en pacientes tratados con gemcitabina. Globalmente, Folfirinox fue asociado con una ventaja de supervivencia pero también con una notable toxicidad incrementada. Más aún, existe una cantidad de posibles desviaciones de la población para este diseño de estudio, así como posibles efectos de confusión a partir del

35

diseño del estudio, al no ser ciego. Por ejemplo, el diseño de estudio seleccionó sólo aquellos pacientes con un buen estado de desempeño (estado ECOG de 0 o 1), y a causa de un riesgo aumentado de toxicidad inducida por irinotecan fueron excluidos aquellos pacientes con un elevado nivel de bilirrubina (típicamente manifestado como ictericia y un signo de diagnóstico común en pacientes con cáncer pancreático en la cabeza del páncreas). La implicancia de estas restricciones en la gestión del tratamiento y la mayor toxicidad de Folfirinox, comparado con gemcitabina, hacen precluir efectivamente el uso de Folfirinox para una considerable proporción de la población global de cáncer pancreático, incluyendo aquellos con el peor pronóstico que no pueden tolerar este régimen. Como tal, Folfirinox es apropiado como una opción de primera línea para pacientes con cáncer pancreático metastásico que son menores de 76 años y que tienen buen estado de desempeño, sin isquemia cardíaca y niveles de bilirrubina casi normales.

(Re)sensibilización in vitro por masitinib de células de cáncer pancreático hacia gemcitabina

Previamente descubrimos que la combinación de masitinib y gemcitabina (Gemzar®, Eli Lilly and Company), un análogo nucleosídico, inhibe el crecimiento de adenocarcinoma pancreático humano. Nuestros estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que masitinib:

- Sensibilizó diversas líneas celulares cancerosas hacia gemcitabina [Thamm DH, y col. 2011 The Veterinary Journal, doi:10.1016/j.tvjl.2011.01.001]
- Sensibilizó líneas celulares de cáncer pancreático refractarias a gemcitabina [Humbert M, y col. (2010) PLoS ONE 5(3): e9430. Doi:10.1371/ journal.pone.0009430].
- Demostró actividad antiproliferativa de la combinación de masitinib más gemcitabina en un modelo murino Nog-SCID de cáncer pancreático humano [Humbert M, y col. (2010) PLoS ONE 5(3): e9430. Doi:10.1371/journal.pone.0009430].

Estos resultados soportaron la hipótesis de que masitinib puede aumentar la actividad antiproliferativa de gemcitabina *in vivo*, posiblemente a través de quimiosensibilización. Esta teoría fue reforzada adicionalmente mediante resultados de un estudio fase 2 humano, en el cual pacientes con cáncer pancreático avanzado que recibieron una combinación de masitinib (9 mg/kg/día) más gemcitabina mostraron una mejorada mediana de tiempo para la progresión comparados con pacientes tratados con gemcitabina sola para la población global [Mitry E, y col., 2010. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 66, 395].

OBJETIVOS DE LA INVENCION

La invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo para el tratamiento de cáncer.

La invención también tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo que mejore los métodos del arte previo para el tratamiento de cáncer.

La invención tiene por objetivo proveer un tratamiento eficiente para cáncer a una dosis, ruta de administración e ingesta diaria apropiadas.

La invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de cómo predecir la respuesta terapéutica a dicho tratamiento en un paciente dado y en consecuencia identificar subpoblaciones de pacientes adecuados en base a estos factores predictores.

Uno de dichos factores predictores está basado en el marcador clínico de intensidad de dolor. Así, la invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo que mejora los métodos del

arte previo para el tratamiento de cáncer que está asociado con dolor o el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad.

Otro factor predictor está basado en el perfilado de expresión génica mediante análisis de la expresión de ARN en muestras de células de sangre periférica. Así, la invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo que mejora los métodos del arte previo para el tratamiento de cáncer en pacientes que albergan un gen o combinaciones de expresión génica, específicos (es decir una huella digital genética/transcriptómica).

A pesar de los intentos para desarrollar regímenes de quimioterapia de combinación basados en gemcitabina, el cáncer pancreático continúa siendo un tumor quimiorresistente y altamente agresivo. El tratamiento de cáncer pancreático avanzado continúa siendo un desafío principal en términos de efecto paliativo inducido por quimioterapia en síntomas relacionados con la enfermedad y tiempo de supervivencia. El régimen Folfirinox ofrece una columna vertebral alternativa para desarrollar terapias de combinación, aunque una alta toxicidad probablemente limitará su uso para la mayoría de los pacientes. El continuo mal pronóstico y la falta de tratamientos efectivos para cáncer pancreático, y especialmente cáncer pancreático que está asociado con dolor, resalta una necesidad médica no satisfecha de estrategias de tratamientos más eficientes que mejoren la gestión clínica de pacientes que sufren cáncer pancreático sin aumentar significativamente la toxicidad. Considerando la limitada expectativa de vida de pacientes que sufren cáncer pancreático, las mejoras tanto en tiempo de supervivencia como en calidad de vida son objetivos altamente significativos. Más aún, un tratamiento capaz de mejorar simultáneamente ambos aspectos sería de particular valor.

Así, la invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo que mejore los métodos del arte previo para el tratamiento de cáncer pancreático adenocarcinoma avanzado.

La invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo que mejore los métodos del arte previo para el tratamiento de cáncer pancreático adenocarcinoma avanzado que está asociado con dolor o el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento de dolor relacionado con la enfermedad.

La invención tiene por objetivo solucionar el problema técnico de proveer un ingrediente activo que mejore los métodos del arte previo para el tratamiento de cáncer pancreático adenocarcinoma avanzado en pacientes que albergan un gen o factores de expresión génica específicos (es decir una huella digital genética/transcriptómica).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para el tratamiento de cáncer en un paciente humano en donde dicho método comprende administrar a un paciente humano que lo necesita, un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico.

Mediante "agente antineoplásico", en la presente se refiere a un medicamento para tratamiento de cánceres. Por ejemplo, los compuestos descritos en: Actualité Pharmaceutiques n°302 (Oct 1992) en páginas 38 a 39 y 41 a 43; o en el listado de la Food and Drug Administration de Estados Unidos (USFDA) de drogas aprobadas para oncología; o en el listado List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings del National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 2012 (DHHS Número de Publicación 2012-150); el contenido de los cuales está incorporado como referencia y está seleccionado de, un agente alquilante, un

agente antimicótico, un agente antimetabólico, un agente anti-topoisomerasa I, un análogo de platino, un agente antibiótico, un agente hormonal, un agente anti-angiogénico, un agente genotóxico, un agente citotóxico, un agente biológico, o un inhibidor de tirosina quinasa adicional.

En particular, dichos agentes antineoplásicos incluyen, pero no están limitados a: abarelix, acetato de abiraterona, aldesleuquina, altretamina, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, azacitidina, clorhidrato de bendamustina, bevacizumab, bexarotene, bicalutamida, leomicina, bortezomib, brentuximab vedotin, busulfan, cabazitaxel, Campath, Camptosar, capecitabina, carboplatino, carfilzomib, carmustina, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina (2CDA), clofarabina, crizotinib, ciclofosfamida, citarabina (ARA-C), arabinósido de citosina, dacarbazina, dactinomicina, dasatinib, daunorubicina, decitibina, degarelix, denileuquina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, mesilato de eribulina, erlotinib, fosfato de estramustina, etopósido, everolimus, exemestano, floxuridina, fludarabina, fluoro-5-uracilo (5-fluorouracilo), fluorouridina-desoxiribosa, flutamida, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, hidroxurea, ibritumomab tiuxetan, idarubicina, ifosfamida, imatinib, ipilimumab, irinotecan, ixabepilona, lapatinib, letrozol, leucovorin, acetato de leuprolida, lomustina, mecloretamina, megestrol, melphalan, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nelarabina, nilotinib, nilutamida, Nolvadex, ofatumumab, oxaliplatino, paclitaxel, panitumumab, pazopanib, pegaspargasa, peginterferon alfa-2b, pemetrexed, pentostatin, pertuzumab, plerixafor, pralatrexato, procarbazona, Proleukin, romidepsin, sapacitabina, sipuleucel-T, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, temsirolimus, tenipósido, testolactona, tezacitabina, tioguanina, tiotepa, topotecan, citrato de toremifeno, trastuzumab, triptorelina, troxacitabina, valrubicina, Valstar, vandetanib, vemurafenib, vinblastina, sulfato de vincristina, vinorelbina, vismodegib, vorinostat, xeloda, ziv-aflibercept, ácido zoledrónico, FOLFOX (oxaliplatino + 5 fluorouracilo + ácido folínico), FOLFIRI (irinotecan + 5 fluorouracilo + ácido folínico), FOLFIRINOX (oxaliplatino + irinotecan + 5 fluorouracilo + ácido folínico), y cualquier combinación de estos agentes antineoplásicos.

Mediante "tratamiento de cáncer", la presente se refiere a pacientes en necesidad de tratamiento de cáncer seleccionado de, pero no limitado a: leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia mielógena aguda (AML, por sus siglas en inglés), carcinoma adrenocortical, cáncer anal, linfoma de células B, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer óseo, glioma del bulbo raquídeo, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), leucemia mielógena crónica (CML, por sus siglas en inglés), cáncer colorrectal (RC, por sus siglas en inglés), cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer ocular, cáncer de vesícula, cáncer gástrico (de estómago), tumor estromal gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), glioblastoma multiforme (GBM), tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, carcinoma hepatocelular (hígado) (HCC, por sus siglas en inglés), linfoma de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer laríngeo, mastocitosis, melanoma, mielofibrosis, síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés), mieloma múltiple, carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón (células pequeñas), melanoma, carcinoma nasofaríngeo, tumores neuroendocrinos, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de los senos paranasales y cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer peneano, cáncer faríngeo, adenoma pituitario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales (riñón) (RCC, por sus siglas en inglés), cáncer de glándulas salivares, cáncer de piel (no melanoma), cáncer del intestino delgado, linfoma linfocítico pequeño (SSL, por sus siglas en inglés), sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, linfoma de células T, cáncer testicular, cáncer de garganta, cáncer de tiroides, cáncer de mama triple negativo, cáncer uretral y cáncer uterino.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se define arriba en donde un inhibidor de tirosina quinasa o un inhibidor de mastocitos es un inhibidor de actividad quinasa seleccionado de las tirosina quinasas de: c-Kit, PDGFR, Lyn, Fyn, y DDR1.

5 En una forma de realización particular, el inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit es masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal mesilato.

Por "factor predictor" o "biomarcador", la presente se refiere a una característica única o grupo de características que es evaluado como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. En relación con la presente invención, la expresión "factor predictor" o "biomarcador" se refiere también a los términos, biomarcador predictivo, biomarcador de
10 pronóstico, marcador molecular, marcador genético, conjunto predictor génico, huella digital genética, huella digital transcripcional, impresión genética, firma genética, marcador tumoral, marcador de cáncer, marcador biológico, marcador bioquímico, e indicador biológico.

De acuerdo con una forma de realización, la presente invención se relaciona con el método como se define arriba, en donde dicho paciente es inicialmente seleccionado para tratamiento en base al factor predictor de
15 intensidad de dolor.

Así, en una forma de realización, la presente invención se relaciona con un método de tratamiento de cáncer que está asociado con dolor o que requiere administración de analgésicos opioides para tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, en un paciente humano, en donde se administra un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente
20 aceptable del mismo, a un paciente en necesidad del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico.

En otra forma de realización, la presente invención se relaciona con el método como se define arriba en donde dicho paciente sufre de cáncer que está asociado con dolor o que requiere la administración de analgésicos opioides para tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, y en donde se define "dolor" como al menos
25 una ocurrencia reportada de una intensidad de dolor no-cero, según se determina utilizando una herramienta de evaluación de intensidad de dolor (apropiada). Está implícito en consecuencia, que de acuerdo con el factor predictor de intensidad de dolor, y en ausencia de cualquier otro factor predictor independiente, no es aconsejable dicho tratamiento de un paciente que sufre cáncer que no está asociado con dolor o donde el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con enfermedad.

30 En aún otra forma de realización, la presente invención se refiere al método como se define anteriormente en donde dicho paciente padece cáncer que está asociado con dolor o que requiere administración de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, y en donde "dolor" se define como anteriormente de acuerdo con una herramienta de evaluación de la intensidad del dolor (apropiada), que incluye pero no se limita a: Escala de Valoración Verbal, la Escala Visual Analógica, la Escala de Valoración Numérica,
35 la Escala de Valoración de Comportamiento, la Escala de Imágenes, la Escala de Cajas, y la Escala Diferencial de Descriptores, el cuestionario de calidad de vida de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento de Cáncer (EORTC QLQ-PAN26), el Inventario Breve de Dolor (BPI) y el Cuestionario de Dolor de McGill.

40 En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente donde dicho paciente padece cáncer que está asociado con dolor que requiere administración de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, y donde el "dolor" se define como al menos una ocurrencia reportada de un puntaje de intensidad del dolor en Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 5 (por

ejemplo, VAS > 5 mm medido en una escala de 100 mm, o 5%); o un puntaje de intensidad de dolor VAS mayor que 10 (por ejemplo, VAS > 10 mm medido en una escala de 100 mm, o 10%); o incluso un puntaje de intensidad de dolor VAS mayor que 20 (por ejemplo, VAS > 20 mm medido en una escala de 100 mm, o 20%).

5 En otra forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente donde dicho paciente padece cáncer que está asociado con dolor o que requiere administración de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, y en el que el "dolor" se define como al menos una ocurrencia reportada de una medida equivalente de dicho umbral de intensidad del dolor de dicha VAS, o al menos una ocurrencia reportada de dolor moderado a intolerable de acuerdo con una clasificación de intensidad del dolor de una herramienta de evaluación de dolor multidimensional o categórica.

10 En otra forma de realización, la presente invención se relaciona con el método como se definió anteriormente en donde dicho paciente padece cáncer pancreático que está asociado con dolor o que requiere la administración de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, y en donde el dolor está definido como al menos una ocurrencia reportada de un puntaje de intensidad de dolor de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 20 (por ej. VAS > 20 mm medido en una escala de 100 mm, o 20%).

15 De acuerdo con una forma de realización, la presente invención se refiere el método como se definió anteriormente, en donde dicho paciente es inicialmente seleccionado para tratamiento en base a factores predictores de expresión génica.

De acuerdo con una forma de realización, dichos factores predictores de expresión génica son derivados de una muestra de sangre de un paciente, preferiblemente en una muestra de sangre periférica completa de dicho paciente. La sangre periférica es sangre que circula a través del corazón, arterias, capilares y venas. La expresión "sangre completa" se usa en oposición a una fracción de sangre, obtenida mediante separación de componentes particulares de la sangre. Un ejemplo de fracción son células mononucleares de sangre periférica. En consecuencia, en una forma de realización particular dichos factores predictores de expresión génica son derivados de muestras de células de sangre periférica recolectadas antes de tratamiento con dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Así, en una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para tratamiento de cáncer, en donde un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico, es administrado a un paciente que lo necesita, en donde dicho paciente tiene una regulación positiva o regulación negativa en sangre periférica de al menos uno de los siguientes genes: ACOX-1, TNFRSFS10B, RPS23, ABCC3, LYN, HIF1ALPHA, ABCC1, IGJ, UBE2H, o PARP-2, u homólogos de los mismos.

35 La regulación positiva o regulación negativa de un dado gen en un paciente dado es cuantificada en términos de un Valor Umbral del Ciclo Delta (Delta Cycle Threshold, DCt), el cual es el nivel de expresión génica con respecto a uno o más genes de referencia. Dichos genes de referencia, o genes constitutivos (*housekeeping*), están caracterizados por un nivel constante de expresión y en consecuencia sirven como un control interno. Los valores DCt (Umbral de Ciclo Delta) son inversamente proporcionales al nivel de expresión génica; en consecuencia en el caso de genes regulados positivamente un valor de DCt menor indica un gran nivel de expresión, mientras que en el caso de genes regulados negativamente un valor de DCt mayor indica un menor nivel de expresión. Se entiende que están implícitas leves modificaciones en los límites del Umbral de Ciclo Delta definidos, por ejemplo en el rango de $\pm 10\%$ o incluso $\pm 25\%$, reflejando el hecho de que el umbral óptimo

puede estar situado en proximidad de aquellos límites ensayados y que la población de pacientes estudiados fue solo una cohorte representativa de la población global de cáncer.

El término “homólogos” está definido como una secuencia polinucleotídica que tiene un grado de identidad de al menos 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, y aún más preferiblemente 99% de la secuencia
 5 génica (longitud completa). El grado de identidad se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias. La identidad puede ser determinada comparando una posición en cada secuencia que pueda ser alineada con propósitos de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Pueden utilizarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento para determinar la homología de dos secuencias, incluyendo FASTA y BLAST.

10 En otra forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde dicho paciente tiene una regulación positiva o regulación negativa concomitantes de al menos dos genes seleccionados de: ACOX-1, TNFRSF10B, RPS23, ABCC3, LYN, HIF1A, ABCC1, IGJ, UBE2H, y PARP-2. Por ejemplo, las combinaciones génicas duales incluyen, pero no están limitadas a: la regulación génica concomitante de genes ACOX-1 y TNFRSF10B; la regulación negativa concomitante del gen RPS23 y
 15 regulación positiva del gen ACOX-1; la regulación positiva concomitante de genes ABCC3 y LYN; la regulación positiva concomitante de genes HIF1A y TNFRSF10B; la regulación negativa concomitante de genes ABCC1 y IGJ; la regulación negativa concomitante de genes UBE2H y PARP-2. Individualmente, estos pares de genes regulados están referidos como “factores predictores de expresión génica”, y colectivamente son referidos como la “huella digital genética” o “huella digital transcripcional”. Seis pares de genes regulados componen la “huella
 20 digital genética/transcripcional”. Los pacientes identificados por tener al menos un factor predictor de expresión génica son considerados como albergadores de la “huella digital genética/transcripcional”. Está implícito que en ausencia de cualquier otro factor predictor independiente, no es aconsejable dicho tratamiento de cualquier paciente que carece de dicha huella digital genética/transcripcional.

25 En una forma de realización, la regulación positiva concomitante de genes ACOX-1 y TNFRSF10B corresponde a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 3,81 para ACOX-1 y menores que, o iguales a, 7,63 para TNFRSF10B; más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 3,36 para ACOX-1 y menores que, o iguales a, 6,71 para TNFRSF10B; y aún más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 3,05 para ACOX-1 y menores que, o iguales a, 6,1 para TNFRSF10B.

30 En una forma de realización, la regulación negativa concomitante del gen RPS23 y la regulación positiva del gen ACOX-1 corresponde a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 0,26 para RPS23 y menores que, o iguales a, 3,81 para ACOX-1; más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 0,32 para RPS23 y menores que, o iguales a, 3,36 para ACOX-1; y aún más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 0,35 para RPS23 y menores que,
 35 o iguales a, 3,05 para ACOX-1.

40 En una forma de realización, la regulación positiva concomitante de genes ABCC3 y LYN corresponde a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 5,38 para ABCC3 y menores que, o iguales a, 2,06 para LYN; más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 4,73 para ABCC3 y menores que, o iguales a, 1,82 para LYN; y aún más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 4,3 para ABCC3 y menores que, o iguales a, 1,65 para LYN.

ES 2 656 640 T3

En una forma de realización, la regulación positiva concomitante de genes HIF1A y TNFRSF10B corresponde a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 4,94 para HIF1A y menores que, o iguales a, 7,06 para TNFRSF10B; más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 4,35 para HIF1A y menores que, o iguales a, 6,22 para TNFRSF10B; y aún más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 3,95 para HIF1A y menores que, o iguales a, 5,65 para TNFRSF10B.

En una forma de realización, la regulación negativa concomitante de genes ABCC1 y IGJ corresponde a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 2,63 para ABCC1 y menores que, o iguales a, 5,29 para IGJ; más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,15 para ABCC1 y menores que, o iguales a, 6,35 para IGJ; y aún más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,5 para ABCC1 y menores que, o iguales a, 7,05 para IGJ.

En una forma de realización, la regulación negativa concomitante de genes UBE2H y PARP-2 corresponde a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 2,78 para UBE2H y mayores que 5,33 para PARP-2; más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,33 para UBE2H y mayores que 6,39 para PARP-2; y aún más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,7 para UBE2H y mayores que 7,1 para PARP-2.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer, en donde el inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico, es administrado a un paciente que lo necesita, en donde dicho paciente tiene regulación positiva en sangre periférica del gen ACOX-1, u homólogos del mismo.

En una forma de realización, la regulación positiva del gen ACOX-1 corresponde a un valor del Umbral de Ciclo Delta del paciente menor que, o igual a, 3,81; más preferiblemente menor que, o igual a, 3,36; y aún más preferiblemente menor que, o igual a, 3,05.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente en donde masitinib es administrado en una dosis diaria de 4,5 a 12,0 mg/kg/día, siendo la forma de realización preferida para pacientes con cáncer una dosis diaria de partida de 6,0 a 7,5 mg/kg/día.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente en donde la dosis de masitinib es escalada en incrementos de 1,5 mg/kg/día hasta alcanzar un máximo de 12,0 mg/kg/día.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente en donde dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es administrado oralmente.

En una forma de realización, la presente invención se refiere el método como se definió anteriormente en donde dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es administrado dos veces al día.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente que comprende una administración a largo plazo de una cantidad efectiva de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, durante más de 3 meses.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es administrado en combinación con el al menos un agente antineoplásico, como un régimen neoadyuvante, adyuvante, concomitante o concurrente.

5 En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un agente antineoplásico son administrados en forma separada, simultánea o secuencial en el tiempo.

10 En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, para tratamiento de cáncer pancreático, en donde en donde dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, es administrado en combinación con al menos un agente antineoplásico seleccionado a partir de medicamentos comerciales para el tratamiento de cáncer.

15 En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde dicho paciente padece un cáncer pancreático de adenocarcinoma no extirpable o cáncer pancreático de adenocarcinoma metastásico.

20 En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde dicho paciente con cáncer pancreático lo necesita, como se define mediante cualquiera del factor predictor de expresión génica o del factor predictor de intensidad de dolor, y en donde dicho al menos un agente antineoplásico es seleccionado de: gemcitabina (Gemzar®; Lilly), erlotinib (Tarceva®; Roche), paclitaxel (Taxol®, Abraxane®; Bristol-Myers Squibb), Folfirinox, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, cisplatino, oxaliplatino, irinotecan, leucovorin, y cualquier combinación de estos agentes antineoplásicos.

En una forma de realización, dicho al menos un agente antineoplásico es gemcitabina.

25 En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde se utiliza un producto que consiste en gemcitabina y masitinib o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables de los mismos.

30 En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en donde masitinib es administrado diariamente en una dosis de partida de $6,0 \pm 1,5$ mg/kg/día con una dosis máxima permisible de 9,0 mg/kg/día, y gemcitabina es administrada en una dosis semanal de 1000 ± 250 mg/m² de área superficial del paciente durante hasta siete semanas consecutivas como partida, seguido de una semana sin tratamiento, seguidas por ciclos de dosis semanal de 1000 ± 250 mg/m² durante 3 semanas, cada 28 días.

De acuerdo con otra forma de realización, la presente invención se refiere a un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit para uso en un método de tratamiento de un cáncer como se definió anteriormente, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico.

35 De acuerdo con otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o kit que comprende un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit para uso en un método de tratamiento de un cáncer como se definió anteriormente, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico.

40 De acuerdo con otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit para preparación de un medicamento, o una composición

farmacéutica para el tratamiento de un cáncer como se definió anteriormente, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un plan de gestión terapéutica para el tratamiento de cáncer, en particular de cáncer pancreático en un paciente humano, en donde dicho plan comprende la
5 identificación de pacientes tratables en base al factor predictor de expresión génica definido.

En una forma de realización, el plan de gestión terapéutica de expresión génica mencionado arriba es aplicado a pacientes con cáncer pancreático; en donde si un paciente alberga al menos un factor predictor de expresión génica, y en consecuencia está clasificado como perteneciente a la subpoblación “huella digital genética/transcripcional” definida, entonces dicho paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina
10 quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina. Si un paciente no alberga al menos un factor predictor de expresión génica, y en consecuencia está clasificado como perteneciente a la subpoblación “huella digital no genética/transcripcional” definida, entonces dicho paciente es tratado con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente
15 gemcitabina.

En otra forma de realización, el plan de gestión terapéutica de expresión génica mencionado arriba es aplicado a pacientes con cáncer distinto de cáncer pancreático; en donde si un paciente alberga al menos un factor predictor de expresión génica, entonces dicho paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación
20 con al menos un agente antineoplásico. Si un paciente no alberga al menos un factor predictor de expresión génica entonces dicho paciente es tratado con al menos un agente antineoplásico.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un plan de gestión terapéutica para el tratamiento de cáncer, en particular de cáncer pancreático en un paciente humano, basado en el factor predictor definido de intensidad de dolor, en donde dicho plan de gestión comprende:

- 25 a) determinar si dicho paciente padece cáncer que está asociado con dolor o requiere administración de al menos un analgésico opioide para tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, con la intensidad de dolor preferiblemente definida como una ocurrencia reportada de un puntaje de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 5 mm en una escala de 100 mm; y opcionalmente
- 30 b) determinar si dicho dolor relacionado con la enfermedad está definido como una ocurrencia reportada de un puntaje de intensidad de dolor de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que un valor predeterminado para dicho cáncer en una escala de 100 mm, y en particular para cáncer pancreático con un puntaje de intensidad de dolor de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 20 mm en una escala de 100 mm.

En una forma de realización dicho valor predeterminado de dicho dolor relacionado con la enfermedad es 20
35 mm en una escala de 100 mm.

En una forma de realización, el plan de gestión terapéutica de intensidad de dolor mencionado anteriormente es aplicado a pacientes con cáncer pancreático; en donde, si el resultado de la etapa (a) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina. Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es negativo, entonces el
40 paciente es tratado con al menos una droga con diana en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y particularmente erlotinib, en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina; o con al menos un inhibidor mitótico, y particularmente

paclitaxel, en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina; o con al menos una combinación de drogas que incluye fluorouracilo, leucovorin, irinotecan, u oxaliplatino, y particularmente Folfirinox. Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es positivo, entonces el paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina.

En otra forma de realización, el plan de gestión terapéutica de intensidad de dolor mencionado anteriormente es aplicado a pacientes con cáncer distinto de cáncer pancreático; en donde, si el resultado de la etapa (a) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos un agente antineoplásico. Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos un agente antineoplásico. Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es positivo, entonces el paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un plan de gestión terapéutica global para el tratamiento de cáncer, en particular de cáncer pancreático en un paciente humano, en donde dicho plan de gestión comprende la identificación de pacientes tratables en base a la aplicación secuencial del plan de gestión terapéutica de expresión génica y plan de gestión terapéutica de intensidad de dolor. Así, en el plan de gestión terapéutica de intensidad de dolor mencionado arriba, la etapa (a) puede ser precedida por la etapa (a') que consiste en la identificación de pacientes que albergan al menos un factor predictor de expresión génica, como se describió anteriormente.

En una forma de realización, el plan de gestión terapéutica global mencionado anteriormente es aplicado a cáncer pancreático, en donde: si el resultado de la etapa (a') es positivo, entonces el paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina; si el resultado de la etapa (a') es negativo, entonces se invoca la etapa (a) del plan de gestión terapéutica de intensidad de dolor para cáncer pancreático. Específicamente, dicho plan de gestión comprende:

- a) determinar si dicho paciente padece cáncer pancreático que está asociado con dolor o requiere administración de al menos un analgésico opioide para tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, con la intensidad de dolor preferiblemente definida como una ocurrencia reportada de un puntaje de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 5 mm en una escala de 100 mm; y opcionalmente
 - b) determinar si dicho dolor relacionado con la enfermedad está definido como una ocurrencia reportada de un puntaje de intensidad de dolor de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 20 mm en una escala de 100 mm.
- Si el resultado de la etapa (a) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina.
 - Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos una droga con diana en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y particularmente erlotinib, en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina; o con al menos un inhibidor mitótico y particularmente paclitaxel, en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y

especialmente gemcitabina; con al menos una combinación de drogas que incluyen fluorouracilo, leucovorin, irinotecan, u oxaliplatino, y particularmente Folfirinox.

- Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es positivo, entonces el paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un análogo nucleosídico, en particular un análogo de citidina, y especialmente gemcitabina.

En otra forma de realización, el plan de gestión terapéutica global mencionado anteriormente es aplicado a pacientes con cáncer distinto de cáncer pancreático, en donde, si el resultado de la etapa (a') es positivo, entonces el paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico. Si el resultado de la etapa (a') es negativo, entonces se invoca la etapa (a) del plan de gestión terapéutica de intensidad de dolor. Específicamente, dicho plan de gestión comprende:

- a) determinar si dicho paciente padece cáncer que está asociado con dolor o requiere administración de al menos un analgésico opioide para tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, con la intensidad de dolor preferiblemente definida como una ocurrencia reportada de un puntaje de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 5 mm en una escala de 100 mm; y opcionalmente
- b) determinar si dicho dolor relacionado con la enfermedad está definido como una ocurrencia reportada de un puntaje de intensidad de dolor de la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que un valor predeterminado para dicho cáncer en una escala de 100 mm.

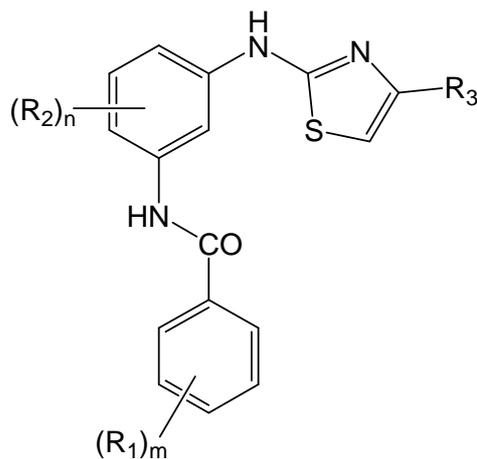
- Si el resultado de la etapa (a) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos un agente antineoplásico.
- Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es negativo, entonces el paciente es tratado con al menos un agente antineoplásico.
- Si el resultado de la etapa (a) es positivo y el resultado de la etapa (b) es positivo, entonces el paciente es tratado con al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, y especialmente masitinib, opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico.

La Figura 3 ilustra los planes de gestión de tratamiento asociados con los factores predictores individuales de intensidad de dolor y expresión génica para pacientes con cáncer pancreático, así como el plan de gestión global de tratamiento que toma ambos factores predictores en consideración.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Las tirosina quinazas son proteínas de tipo receptor o de tipo no receptor, que transfieren el fosfato terminal de ATP a residuos tirosina de proteínas, activando o inactivando de ese modo las vías de traducción de la señal. Estas proteínas son conocidas por estar involucradas en mucho mecanismos celulares, los cuales en caso de disrupción, conducen a trastornos tales como proliferación celular anormal y migración así como inflamación. Un inhibidor de tirosina quinasa es una droga que inhibe las tirosina quinazas, interfiriendo de ese modo con los procesos de señalización dentro de las células. El bloqueo de dichos procesos puede detener el crecimiento y división celular.

En una forma de realización, el inhibidor de tirosina quinasa de la invención tiene la siguiente fórmula [A]:



[A]

en donde R_1 y R_2 son seleccionados independientemente de hidrogeno, halógeno, un alquilo lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo que contiene desde 1 a 10 átomos de carbono, trifluorometilo, alcoxi, ciano, dialquilamino, y un grupo solubilizante,

m es 0-5 y n es 0-4;

el grupo R_3 es uno de los siguientes:

(i) un grupo arilo tal como fenilo o una variante sustituida del mismo que lleva cualquier combinación, en una posición cualquiera del anillo, de uno o más sustituyentes tales como halógeno, grupos alquilo que contienen desde 1 a 10 átomos de carbono, trifluorometilo, ciano y alcoxi;

(ii) un grupo heteroarilo tal como un grupo 2-, 3- o 4-piridilo, que puede llevar adicionalmente cualquier combinación de uno o más sustituyentes tales como halógeno, grupos alquilo que contienen desde 1 a 10 átomos de carbono, trifluorometilo y alcoxi;

(iii) un grupo heterocíclico aromático de anillo de cinco miembros tal como por ejemplo 2-tienilo, 3-tienilo, 2-tiazolilo, 4-triazolilo, 5-tiazolilo, que puede adicionalmente llevar cualquier combinación de uno o más sustituyentes tales como halógeno, un grupo alquilo que contiene desde 1 a 10 átomos de carbono, trifluorometilo y alcoxi;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los inhibidores de tirosina quinasa de fórmula [A] pueden preferiblemente ser utilizados como inhibidores c-Kit.

A menos que se especifique de otra manera, las expresiones siguientes utilizadas en la presente están definidas como sigue:

Como se utiliza en la presente, la expresión "grupo arilo" significa un radical aromático monocíclico o policíclico que comprende átomos de carbono e hidrogeno. Los ejemplos de grupos arilo adecuados incluyen, pero no están limitados a, fenilo, tolilo, antraceno, fluorenilo, indenilo, azuleno y naftilo, así como grupos moleculares carbocíclicos benzo-fusionados tales como 5,6,7,8-tetrahidronaftilo. Un grupo arilo puede estar insustituido o sustituido con uno o más sustituyentes. En una forma de realización, el grupo arilo es un anillo monocíclico, en donde el anillo comprende 6 átomos de carbono, referido en la presente como "(C₆)arilo".

Como se utiliza en la presente, la expresión "grupo alquilo" significa un hidrocarburo de cadena recta saturada o ramificada no cíclica que tiene 1 a 10 átomos de carbono. Los alquilos de cadena recta saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-

decilo; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo, isopentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,3-dimetilpentilo, 2,4-dimetilpentilo, 2,3-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,2-dimetilhexilo, 3,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilhexilo, 4,4-dimetilhexilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, 2-etilhexilo, 3-etilhexilo, 4-etilhexilo, 2-metil-2-etilpentilo, 2-metil-3-etilpentilo, 2-metil-4-etilpentilo, 2-metil-2-etilhexilo, 2-metil-3-etilhexilo, 2-metil-4-etilhexilo, 2,2-dietilpentilo, 3,3-dietilhexilo, 2,2-dietilhexilo, 3,3-dietilhexilo y lo similar. Los grupos alquilo incluidos en los compuestos de esta invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

Como se utiliza en la presente, el término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo que está unido a otro grupo molecular mediante un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupo alcoxi incluyen metoxi, isopropoxi, etoxi, tert-butoxi y lo similar. Los grupos alcoxi pueden estar sustituidos opcionalmente con uno o más sustituyentes.

Como se utiliza en la presente, el término "heteroarilo" o términos similares significa un anillo heteroaromático monocíclico o policíclico que comprende átomos de carbono como miembros de anillo y uno o más heteroátomos como miembros de anillo (tales como, por ejemplo oxígeno, azufre o nitrógeno). Típicamente, un grupo heteroarilo tiene desde 1 a aproximadamente 5 heteroátomos como miembros de anillo y desde 1 a aproximadamente 14 átomos de carbono como miembros de anillo. Los grupos heteroarilo representativos incluyen piridilo, 1-oxo-piridilo, furanilo, benzo[1,3]dioxolilo, benzo[1,4]dioxinilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, quinolinilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, triazolilo, tiadiazolilo, isoquinolinilo, indazolilo, benzoxazolilo, benzofurilo, indolizínilo, imidazopiridilo, tetrazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzoxadiazolilo, indolilo, tetrahidroindolilo, azaindolilo, imidazopiridilo, quinazolinilo, purinilo, pirrolo[2,3]pirimidinilo, pirazolo[3,4]pirimidinilo, imidazo[1,2-a]piridilo, y benzo(b)tienilo. Un heteroátomo puede estar sustituido con un grupo protector conocido para aquellos de conocimiento común en el arte, por ejemplo, el hidrógeno sobre un nitrógeno puede estar sustituido con un grupo ter-butoxicarbonilo. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente con uno o más sustituyentes. Además, los heteroátomos nitrógeno o azufre como miembros de anillo pueden estar oxidados. En una forma de realización, el anillo heteroaromático está seleccionado de anillos heteroarilo monocíclicos de 5-8 miembros. El punto de unión de un anillo heteroaromático o heteroarilo a otro grupo puede estar en un átomo de carbono o en un heteroátomo de los anillos heteroaromáticos o heteroarilos.

El término "heterociclo" como se utiliza en la presente, se refiere colectivamente a grupos heterocicloalquilo y grupos heteroarilo.

Como se utiliza en la presente, el término "heterocicloalquilo" significa un grupo monocíclico o policíclico que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de O, N o S, y que tiene 2-11 átomos de carbono, el cual puede ser saturado o insaturado, pero no es aromático. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen (pero no están limitados a): piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotioperanilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotioperanilo sulfona, tetrahidrotioperanilo sulfóxido, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo sulfóxido, tiomorfolinilo sulfona, 1,3-dioxolano, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo-2-ona, tetrahidrotienilo, y tetrahidro-1,1-dioxotienilo. Típicamente, los grupos heterocicloalquilo monocíclicos tienen 3 a 7 miembros. Los grupos heterocicloalquilo monocíclicos de 3 a 7 miembros preferidos son aquellos que tienen 5 o 6 átomos de anillo. Un heteroátomo puede estar sustituido con un grupo protector conocido para aquellos de conocimiento común en el arte, por ejemplo, el hidrógeno sobre un nitrógeno puede estar sustituido por un grupo ter-butoxicarbonilo. Adicionalmente, los grupos heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. Además, el punto de unión de un anillo heterocíclico a otro grupo

puede estar en un átomo de carbono o en un heteroátomo de un anillo heterocíclico. Solo los isómeros estables de dichos grupos heterocíclicos sustituidos están contemplados en esta definición.

Como se utiliza en la presente, el término "sustituyente" o "sustituido" significa que un radical hidrógeno en un compuesto o grupo está reemplazado con cualquier grupo deseado que es sustancialmente estable en condiciones de reacción en una forma no protegida o cuando está protegido utilizando un grupo protector. Los ejemplos de sustituyentes preferidos son aquellos hallados en los compuestos y formas de realización a modo de ejemplo divulgados en la presente, así como halógeno (cloro, yodo, bromo o flúor); alquilo; alqueno; alquino; hidroxilo; alcoxi; nitro; tiol; tioéter; imina; ciano; amido; fosfonato; fosfina; carboxilo; tiocarbonilo; sulfonilo; sulfonamida; cetona; aldehído; éster; oxígeno (-O); haloalquilo (por ej., trifluorometilo); cicloalquilo, que puede ser monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (por ej., ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo), o un heterocicloalquilo, que puede ser monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (por ej., pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, o tiazinilo), arilo o heteroarilo monocíclico o policíclico fusionado o no fusionado (por ej., fenilo, naftilo, pirrolilo, indolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, acridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo, bencimidazolilo, benzotiofenilo, o benzofuranilo); amino (primario, secundario, o terciario); CO₂CH₃; CONH₂; OCH₂CONH₂; NH₂; SO₂NH₂; OCHF₂; CF₃; OCF₃; y dichos grupos moleculares pueden también estar opcionalmente sustituidos con una estructura de anillo fusionado o puente, por ejemplo -OCH₂O-. Estos sustituyentes pueden opcionalmente estar sustituidos adicionalmente con un sustituyente seleccionado de dichos grupos. En ciertas formas de realización, el término "sustituyente" o el adjetivo "sustituido" se refiere a un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de un alquilo, un alqueno, un alquino, un cicloalquilo, un cicloalqueno, un heterocicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un aralquilo, un heteroaralquilo, un haloalquilo, -C(O)NR₁₁R₁₂, -NR₁₃C(O)R₁₄, un halo, -OR₁₃, ciano, nitro, un haloalcoxi, -C(O)R₁₃, -NR₁₁R₁₂, -SR₁₃, -C(O)OR₁₃, -OC(O)R₁₃, -NR₁₃C(O)NR₁₁R₁₂, -OC(O)NR₁₁R₁₂, -NR₁₃C(O)OR₁₄, -S(O)rR₁₃, -NR₁₃S(O)rR₁₄, -OS(O)rR₁₄, S(O)rNR₁₁R₁₂, -O, -S, y -N-R₁₃, en donde *r* es 1 o 2; R₁₁ y R₁₂, para cada ocurrencia son, independientemente H, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido, un cicloalqueno opcionalmente sustituido, un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido, o un heteroaralquilo opcionalmente sustituido; o R₁₁ y R₁₂ tomados en conjunto con el nitrógeno al cual están unidos son un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido; y R₁₃ y R₁₄ para cada ocurrencia son, independientemente, H, un alquilo opcionalmente sustituido, un alqueno opcionalmente sustituido, un alquino opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido, un cicloalqueno opcionalmente sustituido, un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, un arilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido, un aralquilo opcionalmente sustituido o un heteroaralquilo opcionalmente sustituido.

En ciertas formas de realización, el término "sustituyente" o el adjetivo "sustituido" se refiere a un grupo solubilizante.

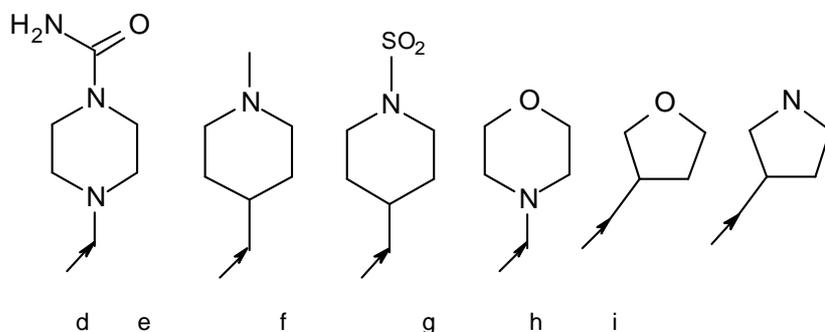
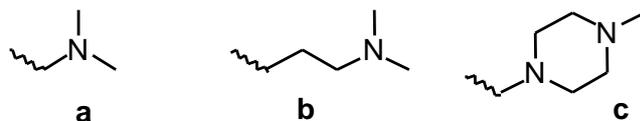
La expresión "grupo solubilizante" significa cualquier grupo que puede estar sustancialmente ionizado y que permite que el compuesto sea soluble en un solvente deseado, tal como, por ejemplo, agua o un solvente que contiene agua. Además, el grupo solubilizante puede ser uno que aumente la lipofilidad del compuesto o del complejo. Típicamente, el grupo solubilizante se selecciona de un grupo alquilo sustituido con uno o más heteroátomos tales como N, O, S, cada uno opcionalmente sustituido con un grupo alquilo sustituido independientemente con alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, carboxilo, ciano, o sustituido con

cicloheteroalquilo o heteroarilo, o un fosfato, o un sulfato, o un ácido carboxílico. Por ejemplo, por "grupo solubilizante" se hace referencia en la presente a uno de los siguientes:

- un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo que comprende al menos un heteroátomo de nitrógeno u oxígeno o cuyo grupo está sustituido con al menos un grupo amino o un grupo oxo;

5 - un grupo amino que puede ser un grupo amino cíclico saturado que puede estar sustituido con un grupo que consiste en alquilo, alcoxicarbonilo, halógeno, haloalquilo, hidroxialquilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, carbamoilo, monoalquilcarbamoilo y dialquilcarbamoilo;

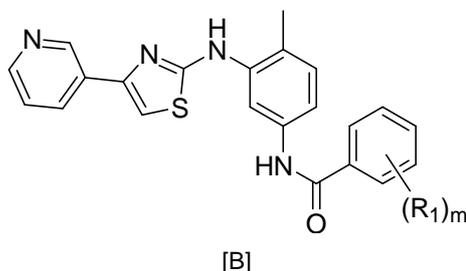
- una de las estructuras a) a i) mostradas a continuación, en donde la línea ondulada y la línea de flecha corresponden al punto de unión a la estructura central de Fórmula [A]:



15 El término "cicloalquilo" significa un radical alquilo cíclico saturado que tiene de 3 a 10 átomos de carbono. Los cicloalquilos representativos incluyen ciclopropilo, 1-metilciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoilo y ciclodecilo. Los grupos cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

El término "halógeno" significa -F, -Cl, -Br o -I.

20 En una forma de realización particular, el inhibidor de tirosina quinasa de la invención tiene la fórmula general [B],



en donde:

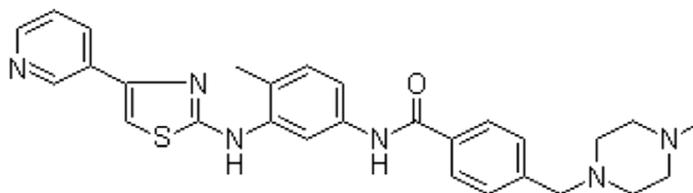
25 R₁ está seleccionado independientemente de hidrógeno, halógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, trifluorometilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, un grupo solubilizante, y m es 0-5.

En una forma de realización, el inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit es masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, más preferiblemente mesilato de masitinib.

Masitinib es un inhibidor de c-Kit/PDGFR con una potente acción anti-mastocitos.

5 Nuevos potentes y selectivos inhibidores del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), de c-Kit, son los 2-(3-aminoaril)amino-4-aryl-tiazoles descritos en la solicitud PCT de AB Science WO 2004/014903.

10 Masitinib es una droga de molécula pequeña que inhibe selectivamente tirosina quinasa específicas tal como c-Kit, PDGFR, Lyn, Fyn y DDR1 sin inhibir, a dosis terapéuticas, quinasa asociadas con toxicidades conocidas (es decir, aquellas tirosina quinasa o receptores de tirosina quinasa atribuidos a posible toxicidad cardíaca del inhibidor de tirosina quinasa, incluyendo ABL, KDR y Src) [Dubreuil y col., 2009, PLoS ONE 2009.4(9):e7258; Davis y col., Nat Biotechnol 2011, 29(11): 1046-51]. El nombre químico de masitinib es 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-iltiazol-2-ilamino)fenil] benzamida - Número CAS 790299-79-5, y la estructura se muestra a continuación. El Masitinib fue descrito por primera vez en las US 7,423,055 y EP 1525200B1. Un procedimiento detallado para la síntesis de mesilato de masitinib se da en el documento WO 2008/098949.



15 La principal quinasa diana de Masitinib es c-Kit, para la cual se ha demostrado que ejerce un fuerte efecto inhibidor sobre los receptores de c-Kit de tipo salvaje y mutados yuxtamembrana, resultando en la detención del ciclo celular y la apoptosis de las líneas celulares dependientes de la señalización de c-Kit [Dubreuil y col., 2009, PLoS ONE, 4(9):e7258]. *In vitro*, masitinib demostró alta actividad y selectividad contra c-Kit, inhibiendo la c-Kit de tipo salvaje humana recombinante con una mitad de concentración inhibidora (IC_{50}) de 200 ± 40 nM y bloqueando la proliferación de células madre inducida por factores y la fosforilación de la tirosina c-Kit con una IC_{50} de 150 ± 80 nM en células Ba/F3 que expresan c-Kit de tipo salvaje humano o de ratón. Además de sus propiedades antiproliferativas, masitinib también puede regular la activación de los mastocitos mediante su direccionamiento a Lyn y Fyn, componentes clave de la vía de transducción que conduce a la desgranulación inducida por IgE [(Gilfillan y col., 2006, Nat Rev Immunol, 6:218-230); (Gilfillan y col., 2009, Immunological Reviews, 228:149-169)]. Esto se puede observar en la inhibición de la desgranulación mediada por FcεRI en células de mastocitos de sangre de cordón umbilical humano [Dubreuil y col., 2009, PLoS ONE; 4(9):e7258]. Masitinib también es un inhibidor de los receptores α y β de PDGFR. Los ensayos recombinantes muestran que masitinib inhibe la actividad de proteína quinasa *in vitro* de PDGFR- α y β con valores de IC_{50} de 540 ± 60 nM y 800 ± 120 nM. En células Ba/F3 que expresan PDGFR- α , masitinib inhibió la proliferación estimulada por PDGF-BB y la fosforilación de tirosina PDGFR- α con una IC_{50} de 300 ± 5 nM. Además, masitinib interactúa fuertemente con la quinasa miembro 1 de la familia del receptor de dominio de discoidina (DDR1), lo que conduce a una inhibición pronunciada de la autofosforilación de DDR1. Aunque las funciones fisiológicas de DDR1 no se comprenden completamente, la señalización de DDR1 parece estar involucrada en las interacciones celulares con la matriz extracelular, y para controlar la adhesión y la motilidad celular, que son ambas características esenciales de las células cancerosas. La desregulación de estas capacidades está asociada con la progresión tumoral y el mal pronóstico en varios cánceres humanos. Se ha demostrado que Masitinib se une fuertemente al receptor de DDR1 e inhibe su actividad [Davis y col., Nat Biotechnol 2011,

20
25
30
35

29(11): 1046-51]. Masitinib, por lo tanto, podría ralentizar el desplazamiento (*homing*) y la colonización de las células tumorales.

La presente invención se refiere a un método para el tratamiento de cáncer en un paciente humano, en donde dicho método comprende administrar a un paciente humano que lo necesita, un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico.

En relación con la presente invención, el término "tratamiento" (y sus diversas formas gramaticales) se refiere a prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos nocivos de un estado de enfermedad, progresión de la enfermedad, agente causante de la enfermedad (por ejemplo, bacterias o virus) u otras condiciones anormales. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar aliviar un síntoma (es decir, no necesariamente todos los síntomas) de una enfermedad o atenuar la progresión de una enfermedad.

Los inventores han demostrado sorprendentemente que la combinación de masitinib más gemcitabina proporciona un beneficio terapéutico a una subpoblación altamente distintiva de pacientes con cáncer pancreático con una intensidad de dolor que sirve como factor predictor independiente.

Se realizó un estudio aleatorio controlado con placebo de fase 3 (AB07012) basado en los datos *in vitro* y preliminares *in vivo* antes mencionados para determinar la eficacia y seguridad de masitinib en combinación con gemcitabina en comparación con gemcitabina sola como terapia de primera línea en pacientes con cáncer pancreático avanzado/metastásico (ver Ejemplo 1). Se predijo fuertemente que el principal mecanismo de acción responsable de cualquier mejora en la supervivencia de un paciente tratado con masitinib sería una sensibilización a gemcitabina en células de cáncer pancreático inducida por masitinib. Por lo tanto, se deduce que la población de pacientes que se beneficie de la combinación de masitinib más gemcitabina sería muy similar a la del tratamiento con gemcitabina, independientemente de las variables de subpoblación, tal como el estado funcional del paciente, la edad o la localización del tumor, etc.; es decir, todos los pacientes con adenocarcinoma de páncreas localmente avanzado (no extirpable en estadio II o estadio III) o metastásico (estadio IV).

Los resultados del estudio AB07012 revelaron que en la población en el intento modificado para tratar (mITT, por sus siglas en inglés) no hubo ventaja de supervivencia en pacientes tratados con la combinación de masitinib más gemcitabina en comparación con pacientes que recibieron gemcitabina más placebo, es decir gemcitabina como agente único (véase el Ejemplo 1). Inesperadamente, los análisis exploratorios secundarios sobre la supervivencia global, estratificados según la intensidad del dolor, revelaron que la combinación de masitinib más gemcitabina había mejorado la supervivencia en comparación con gemcitabina como agente único, en una subpoblación de pacientes con cáncer pancreático asociado con dolor o con requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad. Estos datos también mostraron, sin precedentes, que la intensidad del dolor era el factor pronóstico predominante para la supervivencia global en pacientes con cáncer pancreático que recibían gemcitabina como agente único (el estándar actual de tratamiento). Específicamente, los datos revelaron que para los pacientes que recibieron gemcitabina como agente único (es decir, placebo más brazo de tratamiento con gemcitabina), hubo una diferencia en el tiempo de supervivencia de 10,0 meses entre aquellos pacientes que presentaban dolor relacionado con la enfermedad al inicio y aquellos sin dolor o el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad (mediana de SG de 5,4 versus 15,4 meses, respectivamente) (ver Ejemplo 1). Más aún, siguiendo la evolución de la tasa de riesgo de la supervivencia global según la intensidad del dolor, se reveló que la probabilidad de supervivencia mejoró con el aumento de la intensidad del dolor para los pacientes que recibieron masitinib más gemcitabina en comparación con los

pacientes que recibieron placebo más gemcitabina. Esta relación se muestra en la curva de la tasa de riesgo de muerte, definida como la probabilidad de muerte bajo masitinib más gemcitabina sobre la probabilidad de muerte bajo placebo más gemcitabina, versus el puntaje VAS (Figura 1). La tasa de riesgo de muerte tendió a disminuir con el aumento del puntaje VAS hasta alcanzar una meseta (o asíntota horizontal) desde el puntaje VAS de 20 mm. Con un puntaje VAS de 55 mm, el número de pacientes se redujo drásticamente y, por lo tanto, la tasa de riesgo no fue adecuada para un análisis posterior. Estos resultados respaldaron la elección de dividir a la población global en tres subpoblaciones de intensidad de dolor según VAS: VAS [0; 5], VAS [5; 20], y VAS > 20 (ver Ejemplo 1).

Estos hallazgos no tienen precedentes y se consideran importantes porque el significado terapéutico predictivo de la intensidad del dolor en pacientes con cáncer era desconocido previamente. De hecho, un estudio previo que evaluó erlotinib (Tarceva®, un inhibidor del factor de crecimiento EGFR) más gemcitabina en cáncer pancreático mostró que para la subpoblación de "dolor" equivalente no hubo beneficio de supervivencia [Moore MJ, y col., J Clin Oncol. 20 de mayo de 2007; 25(15):1960-6]. Esto está en contraste directo con los hallazgos de la combinación de masitinib más gemcitabina. Los datos también indicaron que los mecanismos de acción responsables de los beneficios terapéuticos observados de la terapia de combinación tienen un comienzo relativamente lento, por lo tanto, requieren un tiempo de exposición mínimo para la obtención de beneficios terapéuticos óptimos.

Este resultado no pudo haber sido predicho a partir del conocimiento adquirido antes del estudio AB07012 o de la literatura científica general. Además, estos hallazgos son altamente contradictorios con nuestra comprensión inicial del mecanismo de acción primario para la combinación de masitinib más gemcitabina en cáncer pancreático, es decir, una sensibilización inducida por masitinib de células de cáncer pancreático hacia gemcitabina [Humbert M, y col. (2010) PLoS ONE 5 (3): e9430. doi: 10.1371/journal.pone.0009430]. Estos datos muestran efectivamente que para el entorno clínico *in vivo* del tratamiento del cáncer pancreático, la sensibilización de células de cáncer pancreático no puede ser el mecanismo principal de la acción de masitinib porque: (i) no debe haber heterogeneidad en la respuesta según la intensidad del dolor relacionada con la enfermedad del paciente; y (ii) se esperaría que tal efecto tenga un inicio relativamente rápido y, por lo tanto, se manifieste en una mejor supervivencia libre de progresión, lo cual no fue el caso.

Los datos del estudio AB07012 (ver Ejemplo 1) han llevado al sorprendente descubrimiento de que una subpoblación muy distinta de pacientes con cáncer pancreático responde a la combinación de masitinib más gemcitabina, con una distinción según el grado (intensidad) del dolor relacionado con la enfermedad. Además, contrariamente a las expectativas, el inicio de esta respuesta en eficacia fue relativamente lento en comparación con las medidas sustitutas de progresión de la enfermedad; sus efectos se manifestaron en la supervivencia a largo plazo (es decir, la supervivencia global) más que en el tiempo a corto plazo para la progresión de la enfermedad (es decir, supervivencia libre de progresión). Todos estos hallazgos apuntan a que los mecanismos secundarios de acción son responsables de los beneficios terapéuticos observados (denominados secundarios porque no actúan directamente sobre las células cancerosas sino sobre las células y las vías de señalización de las que dependen las células tumorales para proliferar y hacer metástasis). o más probablemente un efecto agregado de numerosos mecanismos secundarios de acción.

En relación con la presente invención, parecería que, sin querer quedar limitado a la teoría, el masitinib administrado opcionalmente en combinación con al menos un agente antineoplásico promueve la supervivencia en la subpoblación de pacientes con cáncer que está asociado con el dolor o el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad a través de, pero no limitado a: controlar la proliferación del tumor a través de la modulación del microentorno tumoral y en particular a través de la

modulación de la actividad de los mastocitos; modulación de los efectos anticancerígenos mediados por inmunestimulación; y efectos antimetastásicos. Existe evidencia directa o putativa que relaciona el efecto de masitinib con cada uno de estos mecanismos secundarios de acción.

De particular relevancia es el hecho de que masitinib, a través de su inhibición de c-Kit, ejerce una acción directa antiproliferativa y proapoptótica sobre los mastocitos e indirectamente, por lo tanto, reduce el conjunto de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y proangiogénicas que son importantes en el crecimiento tumoral y la invasividad tumoral. Además de sus propiedades antiproliferativas, masitinib también puede regular la activación de los mastocitos mediante su direccionamiento a Lyn y Fyn, componentes clave de la vía de transducción que conduce a la desgranulación de mastocitos inducida por IgE [Gilfillan, 2006; Gilfillan, 2009]. Esto se puede observar en la inhibición de la desgranulación mediada por FcεRI de mastocitos de sangre de cordón umbilical humano [Dubreuil y col., 2009]. Masitinib también interactúa fuertemente con DDR1, una quinasa cuyas capacidades de desregulación están asociadas con la progresión tumoral y un mal pronóstico en varios tipos de cáncer humano [Davis y col., Nat Biotechnol 2011, 29 (11): 1046-51]. Masitinib, por lo tanto, podría ralentizar el desplazamiento (*homing*) y la colonización de las células tumorales.

La evidencia indica que el reclutamiento de células inflamatorias, especialmente la infiltración de mastocitos, facilita el crecimiento y la diseminación de algunos cánceres al producir moléculas que mejoran la invasividad tumoral. Por lo tanto, la inhibición de la función de los mastocitos puede ser un beneficio terapéutico para restringir el crecimiento del cáncer, incluido el cáncer pancreático. Además, existe una asociación conocida entre la inflamación y el desarrollo del cáncer pancreático, y los mastocitos tienen un papel esencial en los mecanismos inmunopatológicos de las enfermedades inflamatorias crónicas. De hecho, los mastocitos se han relacionado directamente con el desarrollo de tumorigénesis de cáncer pancreático en modelos de ratón, demostrando que altos niveles de infiltración de mastocitos en el microentorno tumoral eran predictivos de un resultado clínico pobre, aunque el mecanismo exacto por el cual los mastocitos contribuyen al desarrollo de cáncer pancreático no estaba claro [Chang DZ y col., Clin Cancer Res 2011; 17: 7015-7023].

A lo largo del proceso de tumorigénesis, progresión de la enfermedad y metástasis, el microentorno del tejido local del huésped es un participante activo y determina el grado de proliferación, angiogénesis, invasión y supervivencia de las células cancerosas. Sin embargo, no se conoce bien el rol de los mastocitos en la tumorigénesis de los cánceres y existen datos contradictorios sobre su beneficio o detrimento para la tumorigénesis, dependiendo de las condiciones del estroma local y si los mediadores liberados facilitan la proliferación de las células tumorales o inducen la apoptosis de células malignas [(Theoharides TC, y col., Trends Immunol 2004; 25: 235-41); (Samoszuk M, y col., BMC Cancer 2005; 21: 121); (Almholt K, y col., Recent Results Cancer Res 2003; 162: 31-42); (Gooch JL, y col., Cancer Res 1998; 15: 4199 - 205)].

El cuerpo de evidencia científica con respecto al rol de los mastocitos en la progresión del tumor y la invasión en el cáncer pancreático, así como el rol emergente de los mastocitos en el dolor por cáncer da credibilidad a nuestros hallazgos del estudio AB07012. Además, sin desear estar ligados a la teoría, los datos del estudio AB07012 indican que existe una conexión no reconocida previamente entre la activación de mastocitos, la patogénesis del cáncer pancreático y el dolor por cáncer pancreático. Es decir, hay una correlación de la actividad de los mastocitos con un resultado clínico pobre en el cáncer pancreático, una correlación del dolor por cáncer con un resultado clínico pobre y una correlación de la actividad de los mastocitos con el dolor por cáncer. Por lo tanto, la aparición de dolor relacionado con la enfermedad en cáncer pancreático puede servir como un marcador de la actividad de los mastocitos, que a su vez indica una etapa más agresiva en la patogénesis del cáncer. En este escenario, consideramos que, hasta cierto punto, el dolor relacionado con la enfermedad de los pacientes con cáncer, y en particular los pacientes con cáncer pancreático, es un

subproducto neuropatológico inducido por el cáncer de los cambios en el microentorno tumoral; cambios que son responsables de impulsar la progresión de la enfermedad y la metástasis, y que implican el reclutamiento de mastocitos o un aumento en la activación de mastocitos.

5 En relación con la presente invención, el tiempo y la gravedad del dolor relacionado con la enfermedad se pueden considerar como un marcador de la patogénesis del cáncer, siendo el aumento de la actividad de los mastocitos responsable en parte de la progresión del tumor y del dolor relacionado con la enfermedad. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de los mastocitos es un objetivo terapéutico plausible para la subpoblación de pacientes con cáncer que presentan dolor relacionado con la enfermedad o el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad. Esto es evidente por el hallazgo
 10 inesperado de que el masitinib administrado en combinación con gemcitabina incrementó la supervivencia global en la subpoblación de pacientes con cáncer pancreático con dolor relacionado con la enfermedad. Además, los datos del estudio AB07012 demostraron que masitinib más gemcitabina disminuyó la supervivencia global en la subpoblación de pacientes con cáncer pancreático sin dolor relacionado con la enfermedad y sin necesidad de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la
 15 enfermedad. Por lo tanto, de acuerdo con el factor predictor de la intensidad de dolor, y en ausencia de otro factor predictor independiente, no es aconsejable tratar a los pacientes de esta última subpoblación con masitinib.

Por lo tanto, se ha demostrado que una subpoblación muy distinta de la población global de cáncer pancreático se beneficia del uso de al menos un compuesto de la invención (es decir, un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o de c-Kit, especialmente masitinib) administrado en combinación con al menos un agente antineoplásico (especialmente gemcitabina). Esta subpoblación se puede identificar a través de la evaluación de la intensidad de dolor relacionada con la enfermedad; por ejemplo, pero no restringido a, al menos una ocurrencia de un puntaje de intensidad de dolor de la Escala Visual Analógica (VAS) distinto de cero (especialmente con un punto de corte a VAS > 20, por ejemplo, más de 20 mm en una escala de 100 mm) o
 20 una medida equivalente de este umbral de intensidad de dolor. Esta subpoblación define una forma de realización de pacientes relevante para la presente invención.

Una serie de marcadores bioquímicos están asociados con dolor, uno o más de los cuales pueden servir como marcadores sustitutos para soportar objetivamente el factor predictor de intensidad de dolor descrito anteriormente. Tales marcadores bioquímicos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), bradiquinina, triptasa, histamina, neurotrofina-3 (NT-3) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés). Sin embargo, se sabe que los marcadores bioquímicos de dolor son variables y hasta la fecha no hay evidencia concluyente de que puedan identificar cuantitativamente a los pacientes con cáncer que experimentan dolor relacionado con la enfermedad. De manera similar, los marcadores bioquímicos *in vivo* conocidos de mastocitos, tales como, pero no restringidos
 30 a, los niveles absolutos de células madre o niveles de triptasa, han demostrados correlacionarse pobremente con la activación de los mastocitos [Hermine O, y col., PLoS ONE. 2008; 3: e2266]. Por lo tanto, en ausencia de marcadores bioquímicos sustitutos confiables para la activación de mastocitos o dolor relacionado con la enfermedad, las herramientas unidimensionales siguen siendo la opción de evaluación de dolor más apropiada, aún si esto representa una medida relativamente subjetiva de la intensidad del dolor o evidencia indirecta de
 35 participación de mastocitos.

En relación con la presente invención, es posible generalizar tras el descubrimiento (es decir, el aumento concomitante de la actividad de los mastocitos, el pobre resultado clínico en cáncer y el dolor relacionado con la enfermedad) a otros cánceres que implican el reclutamiento de mastocitos o un aumento en el activación de

mastocitos. Explícitamente, el inicio del dolor relacionado con la enfermedad sirve como un marcador de la actividad de los mastocitos, que a su vez indica cambios en el microentorno tumoral que son responsables de impulsar la progresión de la enfermedad y la metástasis. Sin embargo, la ausencia actual de conocimiento sobre la tumorigénesis y metástasis mediadas por mastocitos *in vivo* acompañada por el inicio del dolor relacionado con la enfermedad para cualquier cáncer dado, impide a cualquier persona experta en el arte aplicar el principio de hacer diana en la actividad de mastocitos para el tratamiento del cáncer asociado con dolor más allá del de "prueba y error" heurístico.

Los principales hallazgos del estudio AB07012 con respecto al tratamiento de una subpoblación de pacientes definida mediante un factor predictor de la intensidad del dolor se resumen a continuación (ver también el Ejemplo 1).

La subpoblación con cáncer pancreático asociado con "dolor" se definió en este estudio como aquellos pacientes con un puntaje de intensidad de dolor en Escala Visual Analógica (VAS) de más de 20 (es decir, VAS > 20 mm medidos en una escala de 100 mm). Esta escala lineal proporciona una representación visual de la amplitud del dolor tal como la percibe el paciente (Figura 2). La amplitud estaba representada por una línea de 100 mm de largo sin marcas de referencia. Una extremidad indicó una ausencia de dolor (valor 0) y la otra el peor dolor imaginable (valor 100). Al inicio del estudio, se le pidió a cada paciente que indicara el nivel de intensidad del dolor que estaban experimentando trazando una línea vertical en la escala VAS. Se consideró que un paciente sin dolor o dolor insignificante localizaría una línea vertical entre 0 y 5 en la escala VAS.

Cualquier puntaje VAS indicado aquí se refiere a la amplitud absoluta en una escala lineal o equivalentemente a un porcentaje; por ejemplo, un puntaje de intensidad de dolor VAS de 20 corresponde a un nivel de dolor indicado a 20 mm en una escala de 100 mm, o alternativamente al 20% de dicha escala. En relación con la presente invención, cualquier medida equivalente de este umbral de intensidad de dolor sería válida; por ejemplo, pero no limitado a, un puntaje de herramienta de evaluación de intensidad de dolor unidimensional > 20%, una categorización de dolor basada en criterios de al menos dolor moderado; o una calificación de herramienta de evaluación de dolor multidimensional de al menos dolor moderado.

Otra interpretación de este umbral de intensidad del dolor es que dichos pacientes con cáncer tienen un dolor relacionado con la enfermedad de al menos intensidad moderada. El factor predictor de intensidad del dolor, en la realización descrita anteriormente, se definió basándose en los motivos: (1) este umbral fue aproximadamente (redondeando a la decena más cercana) la mediana de la intensidad del dolor de la población de estudio (50% de la población); (2) una intensidad de dolor VAS de 20 mm coincidió con la aparición de una meseta (o asíntota horizontal) en la relación de riesgo de muerte (véase la Figura 1); (3) este umbral ha sido citado previamente en la literatura como un límite de intensidad del dolor.

Para la subpoblación con intensidad de dolor VAS > 20, o una medida equivalente de la intensidad del dolor (denominada en lo sucesivo la "subpoblación de dolor"), la gemcitabina funciona mejor cuando se administra en combinación con masitinib. Se observó un beneficio estadísticamente significativo, en términos de mediana de supervivencia global y tasa de riesgos de muerte, para la combinación de tratamiento con masitinib más gemcitabina en pacientes con cáncer pancreático que está asociado con dolor a valores de VAS > 20.

Para la subpoblación con intensidad de dolor VAS < 5 o una medida equivalente de la intensidad del dolor y sin necesidad de analgésicos opioides para administrar el dolor relacionado con la enfermedad (denominada en lo sucesivo "sin dolor, sin subpoblación de morfina"), la gemcitabina funciona mejor por sí misma; lo que indica que en ausencia de cualquier otro factor predictor independiente, el tratamiento de esta subpoblación con masitinib más gemcitabina es desaconsejable. Se observó un beneficio terapéutico negativo, en términos de

mediana de supervivencia global y tasa de riesgo de muerte, para la combinación de masitinib más gemcitabina en pacientes de la subpoblación "sin dolor, sin morfina".

Para la subpoblación con intensidad de dolor VAS en el intervalo $5 < \text{VAS} < 20$ o una medida equivalente de la intensidad del dolor (denominada en lo sucesivo "subpoblación de dolor por debajo de la mediana"), hubo un beneficio estadísticamente significativo en la tasa de riesgo, sin embargo, no se observaron diferencias en términos de mediana de supervivencia global. Para esta subpoblación de intensidad del dolor, no parece haber ningún daño o beneficio aumentado en términos de supervivencia debido a la combinación de masitinib con gemcitabina, lo que indica que esta subpoblación es neutral (es decir, no se dañará si se administra masitinib).

La frecuencia de muertes debidas a eventos adversos en la subpoblación de "dolor" se redujo (dos veces menor) en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina que en el grupo placebo más gemcitabina (10,9% frente a 21,9%, respectivamente). La toxicidad de la combinación de masitinib más gemcitabina concuerda con el perfil de seguridad conocido de masitinib y todos son manejables, cualquier riesgo de eventos adversos con riesgo de vida se mitiga en gran medida anticipando su aparición e implementando los protocolos apropiados, especialmente para la neutropenia severa.

En una posible forma de realización de la presente invención, el uso de al menos un compuesto de la invención para el tratamiento de cáncer pancreático dependería, aunque no se limitaría a, las siguientes pautas:

- El tratamiento está indicado si el paciente cumple con el criterio de subpoblación de "dolor" de intensidad de dolor $\text{VAS} > 20$, o una medida equivalente de la intensidad de dolor, en al menos una ocasión.
- Se podría formular al menos una pregunta para eliminar el dolor que no es relevante para el cáncer pancreático, por ejemplo, se le puede pedir al paciente que indique la localización de su dolor.
- El estricto cumplimiento de la regla de no tratar la subpoblación de "sin dolor, sin morfina", en ausencia de otro factor predictor independiente, protegería a aquellos pacientes para quienes la combinación de masitinib más gemcitabina ha demostrado ser perjudicial.

Estas pautas son similares a las empleadas para diagnosticar la condición de dolor crónico de la fibromialgia, los criterios diagnósticos establecidos son primero excluir otras afecciones subyacentes que podrían estar causando los síntomas relacionados con el dolor y luego evaluar el dolor del paciente (mediante cuestionario y examen físico).

La subpoblación neutra de pacientes ("dolor por debajo de la mediana", $\text{VAS} \leq 20$ o medida equivalente de la intensidad del dolor), para quienes hubo un beneficio estadísticamente no significativo en la tasa de riesgo, proporciona un gran amortiguador entre la subpoblación de tratamiento indicado y la subpoblación para quienes dicho tratamiento es desaconsejable. La decisión diagnóstica en términos de daño/no daño debido al tratamiento se convierte efectivamente en un indicador "binario", siendo la condición de "sin dolor, sin morfina" altamente distinguible del "dolor" ($\text{VAS} > 20$). En el caso de tratar incorrectamente a un paciente que pertenece a la subpoblación "dolor por debajo de la mediana", entonces no hay detrimento para la supervivencia, siendo el único aumento de riesgo debido a la toxicidad manejable.

En relación con la presente invención, las opciones de tratamiento efectivas para pacientes con cáncer pancreático en la subpoblación de "dolor" ($\text{VAS} > 20$) son inexistentes. La credibilidad de esta afirmación es subrayada por datos del estudio AB07012 que muestran una discrepancia relacionada con la intensidad del dolor en el tiempo de supervivencia para pacientes que reciben gemcitabina como agente único, con una diferencia observada en el tiempo de supervivencia de 10,0 meses entre las subpoblaciones "dolor" y "sin dolor, sin morfina" (es decir, los pacientes de la subpoblación de "dolor" tenían un tiempo de supervivencia más corto)

(véase el Ejemplo 1). Además, en un estudio que evaluó erlotinib más gemcitabina, no se informó beneficio de supervivencia para la subpoblación de "dolor" equivalente mientras que el beneficio fue evidente para pacientes con intensidad de dolor de VAS < 20. Finalmente, el beneficio de Folfirinox para la subpoblación de cáncer pancreático con "dolor" (VAS > 20) es, en el mejor de los casos, desconocido porque el dolor no se tuvo en cuenta en el análisis de ese estudio, una omisión que da la influencia significativa del dolor en la supervivencia del paciente con cáncer pancreático (según lo revelado por los resultados del estudio AB07012) muy probablemente impactaría negativamente en los datos de supervivencia de Folfirinox.

Considerando además el análisis de seguridad del estudio AB07012, la frecuencia global de eventos adversos (AE, por sus siglas en inglés) fue similar en ambos brazos de tratamiento, mientras que la frecuencia de AEs graves y severos fue mayor en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina que en el brazo placebo más gemcitabina. Las discontinuaciones, las interrupciones temporales y las reducciones de la dosis se produjeron con mayor frecuencia en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina en comparación con el brazo placebo más gemcitabina. Los eventos adversos que condujeron a discontinuaciones permanentes ocurrieron en el 42% frente al 27% de los pacientes, respectivamente (valor $p = 0,002$). De estos, los AEs no graves representaron el 32% de las discontinuaciones del brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina, reportando una reducción de la dosis solo el 16% de los pacientes tratados con masitinib más gemcitabina. Es probable que las discontinuaciones debidas a AEs no graves se puedan evitar parcialmente mediante un uso más frecuente de reducciones de la dosis de masitinib o mediante la reducción de la dosis inicial de masitinib. En consecuencia, la exposición a la droga del estudio fue significativamente menor en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina ($p = 0,001$). En la población global, la exposición del paciente a la gemcitabina en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina se redujo en aproximadamente un 35% en comparación con el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina, con tendencias similares observadas en las diversas subpoblaciones de intensidad de dolor. En conjunto, estas observaciones sobre la seguridad y la exposición a la droga indican que la dosis de masitinib administrada de 9 mg/kg/día no fue óptima para un buen cumplimiento por parte del paciente, en parte debido a la toxicidad adicional asociada con la combinación. Teniendo en cuenta también nuevos conocimientos sobre los mecanismos de acción inferidos de masitinib, una dosis de masitinib de 6 mg/kg/día se considera la dosis inicial óptima, con escalamiento de dosis permitido en pacientes con una respuesta inadecuada en ausencia de toxicidades limitantes.

Los inventores también demostraron que la expresión génica es un factor predictor independiente para una mejor supervivencia en pacientes con cáncer pancreático tratados con masitinib más gemcitabina. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para el tratamiento de cáncer en un paciente humano, donde dicho método comprende administrar a un paciente humano que lo necesita, un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico, en el que dicho paciente se selecciona inicialmente para el tratamiento basándose en los factores predictores de expresión génica.

Un análisis farmacogenómico auxiliar de la expresión de ARN en muestras de células de sangre periférica recogidas antes del tratamiento con masitinib se llevó a cabo en paralelo al estudio AB07012 con el objetivo de identificar patrones de expresión génica predictivos de la supervivencia global y la eficacia del tratamiento. Los análisis genómicos (llevados a cabo por Skuldtech, Montpellier, Francia) consistieron en el análisis de transcriptoma global de la expresión de ARN usando el método de alto rendimiento de Secuenciación de Nueva Generación (*Next Generation Sequencing*) (realizado de forma independiente por triplicado). Este análisis midió simultáneamente el nivel de expresión de un gran número de genes en muestras de sangre extraídas de

una subpoblación de pacientes aleatorizados para estudiar AB07012. Los análisis se llevaron a cabo primero en la población global del estudio sea cual fuera el tratamiento administrado, seguido de un análisis en cada brazo de tratamiento, es decir, brazo de masitinib o placebo, para determinar posibles tendencias genéticas de acuerdo con el tratamiento. Los objetivos de este estudio auxiliar fueron revelar biomarcadores predictivos de supervivencia prolongada (es decir, aumento de la SG) para pacientes tratados con masitinib en comparación con pacientes tratados con placebo.

En particular, se recogieron y analizaron muestras de ARN sanguíneo, dando como resultado el aislamiento de un perfil de expresión génica indicativo de progresión agresiva de la enfermedad, presente en el 55% de los pacientes, que era altamente predictivo para la supervivencia global y además interactuaba con el tratamiento.

Esta base de datos farmacogenómica auxiliar contenía muestras de ARN sanguíneo de 119 pacientes asignados al azar al estudio AB07012 (proporción 1:1 según el brazo de tratamiento) con el fin de detectar expresiones génicas que se correlacionasen con el efecto del tratamiento. En un primer paso, se analizó el genoma humano completo (~27.000 genes) en términos de una posible correlación entre los niveles de expresión de ARN y la supervivencia global, con respecto al tipo de tratamiento. Se recogieron muestras de ARN sanguíneo usando el sistema de ARN sanguíneo PAXgene y se construyeron tres bibliotecas independientes de expresión génica digital (DGE, por sus siglas en inglés) para cuatro muestras de ARN combinadas que caen en los siguientes perfiles de pacientes:

- Pacientes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina que sobrevivieron ≤ 4 meses
- Pacientes en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina que sobrevivieron ≤ 4 meses
- Pacientes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina que sobrevivieron > 15 meses
- Pacientes en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina que sobrevivieron > 15 meses

La base de datos genómica resultante contenía 119 pacientes con intención de tratamiento modificados a partir de los cuales se identificaron 169 genes mediante análisis de expresión diferencial usando el método edgeR con un cambio de 1,5 veces y un criterio de valor p ajustado a la tasa de falso descubrimiento de $<10\%$.

En un segundo paso, se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real o qPCR, por sus siglas en inglés), que permite determinar el valor del umbral del ciclo (Ct) de un gen, normalizándose dicho valor con respecto al nivel de expresión de un gen de mantenimiento o de referencia para dar un valor de Delta Ct (DCt). Los genes de mantenimiento son genes que se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales y fisiopatológicas. Estos genes generalmente se expresan a niveles relativamente constantes. Preferiblemente, la normalización se basa en el nivel de expresión de dos genes de mantenimiento, y en particular, en función del nivel de expresión de los genes B2M y GAPDH. Por lo tanto, cuando se utilizan dos genes de mantenimiento (por ejemplo, los genes B2M y GAPDH) para normalizar el valor de Ct de un gen dado, el DCt de dicho gen se calcula de la siguiente manera: $DCt = Ct(\text{gen}) - [Ct(\text{B2M}) + Ct(\text{GAPDH})]/2$. Los valores elevados de DCt correspondieron a un nivel relativamente más bajo de expresión génica. Se resumen más adelante los principales aspectos metodológicos del estudio farmacogenómico auxiliar del ensayo AB07012 y los resultados posteriores con respecto al tratamiento de una subpoblación de pacientes definida a través de factores predictores de la expresión génica (ver también el Ejemplo 2 para detalles adicionales).

Con respecto a la medición de la expresión génica, en una forma de realización, el nivel de expresión de un gen se mide como el nivel de la proteína de dicho gen. En ese caso, el nivel de la proteína se mide preferiblemente empleando métodos de detección basados en anticuerpos tales como inmunquímica o análisis de Western-blot.

- 5 En otra forma de realización, el nivel de expresión de un gen se mide como el nivel del transcripto de ARN o el ADNc de dichos genes. En ese caso, el nivel de transcripto(s) de ARN o ADNc se mide empleando métodos de detección basados en ácido nucleico tales como microarreglos, PCR cuantitativa, chips de ADN, hibridación con sondas marcadas o inmunoensayos de flujo lateral, en particular pruebas de tiras reactivas de flujo lateral. Preferiblemente, el nivel de expresión del gen se mide mediante PCR cuantitativa en tiempo real realizada sobre el transcripto de ARN o el ADNc de dicho gen. Una PCR cuantitativa en tiempo real es una PCR en la que el ADN amplificado se detecta a medida que la reacción progresa en tiempo real. Esta detección se realiza mediante la acumulación de una señal fluorescente. El Ct (umbral de ciclo) se define como el número de ciclos de PCR requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, supere el nivel de fondo). Por lo tanto, se usan un cebador directo e inverso, y un reportero, preferiblemente un intercalante fluorescente de ADN, en un qPCR. Ventajosamente, se usan cebadores que son específicos para la hibridación dentro de las regiones de codificación génica.

A continuación se incluye un resumen de la metodología y los procesos analíticos utilizados para definir un conjunto de factores predictores de la expresión génica y, por lo tanto, una subpoblación de pacientes para la cual el masitinib es más probable que sea de beneficio terapéutico.

- 20 - Este análisis midió simultáneamente el nivel de expresión de un gran número de genes en muestras de células sanguíneas periféricas extraídas de un total de 119 pacientes asignados al azar al estudio AB07012 (proporción 1:1 de pacientes tratados con masitinib y placebo).
- Las muestras analizadas se tomaron solo una vez en la semana 0 (línea de base).
- El sistema de ARN sanguíneo PAXgene™ se utilizó para recoger la muestra de sangre de un paciente, y el ARN se extrajo utilizando el kit PAXgene Blood RNA V.2 (PreAnalytix) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El control de la integridad del ARN se realizó con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.) Usando Eukaryotic Total RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies). La cantidad de ARN se controló usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Los ARN purificados se conservaron a -80°C
- 25 - Se realizaron experimentos de expresión génica digital (DGE) para seleccionar un conjunto de biomarcadores putativos. La validación de biomarcadores se realizó mediante PCR en Tiempo Real en la plataforma COBAS (LC480, ROCHE Diagnostics) y se usaron enfoques bioestadísticos apropiados para filtrar los mejores biomarcadores.
- Los ARN se transcribieron de forma inversa según el protocolo de Roche Diagnostics. Los niveles de expresión génica de biomarcadores putativos fueron investigados por Real-Time PCR.
- 35 - El análisis de DGE dio como resultado la selección de 169 genes, tomados de una base de datos genómica de 119 pacientes con intención de tratamiento modificados.
- Para cada gen se especificaron tres puntos punto de corte con respecto a DCt: mediana, Q1 (primer cuartil, P25) y Q3 (tercer cuartil, P75). Por "mediana de DCt", se entiende la mediana de la DCt de todos los pacientes evaluados. Para cada punto de corte (menos que el punto de corte/más que el punto de corte) se utilizó un modelo multivariante para explicar las diferencias en la supervivencia global entre los brazos de tratamiento. Si el efecto del brazo de tratamiento fue significativo ($p < 5\%$), entonces se puede concluir que el gen bajo investigación tiene un efecto diferente en la supervivencia dependiendo del brazo de
- 40

ES 2 656 640 T3

tratamiento, y ese gen se retuvo para un análisis posterior. Debido a la importancia del gen KIT, este gen se seleccionó independientemente de su nivel de significancia.

- El análisis multivariante posteriormente refinó la selección de genes hasta un total de 64 genes con valores de punto de corte asociados.
- 5 - Todas las posibles combinaciones de genes duales de estos 64 genes y sus respectivos valores punto de corte se sometieron una vez más al modelo multivariante.
- Cada combinación se clasificó de acuerdo con el poder discriminatorio de la combinación medida por el valor p de la prueba Chi-cuadrado proporcionada en el modelo de Cox. Un criterio adicional para retener una combinación dada de genes duales fue que la subpoblación refinada debe contener al menos 40
- 10 pacientes (1/3 de la muestra total).
- Los diez genes individuales encontrados en los seis factores predictores de la expresión génica identificados (es decir, pares de genes regulados con valores de p <0,00001) fueron: ACOX-1, TNFRSF10B, RPS23, ABCC3, LYN, HIF1ALPHA, ABCC1, IGJ, UBE2H y PARP-2.

El nivel de expresión de estos genes se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real o qPCR) usando cebadores que eran específicos para la hibridación dentro de las regiones codificantes de genes.

- En el caso del gen ACOX-1, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 17 entre el nucleótido 73.938.893 y el nucleótido 73.939.007 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- 20 ▪ En el caso del gen TNFRSF10B, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 8 entre el nucleótido 22.877.657 y el nucleótido 22.877.728 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- En el caso del gen RPS23, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 5 entre el nucleótido 81.571.951 y el nucleótido 81.572.049 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- 25 ▪ En el caso del gen ABCC3, los cebadores amplifican una secuencia ubicada en el cromosoma 17 entre el nucleótido 48.762.132 y el nucleótido 48.762.221 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- En el caso del gen LYN, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 8 entre el nucleótido 56.854.522 y el nucleótido 56.860.210 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- 30 ▪ En el caso del gen HIF1A, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 14 entre el nucleótido 62.214.901 y el nucleótido 62.214.976 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- 35 ▪ En el caso del gen ABCC1, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 16 entre el nucleótido 16,177,368 y el nucleótido 16,180,772 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- En el caso del gen IGJ, los cebadores amplifican una secuencia ubicada en el cromosoma 4 entre el nucleótido 71.521.360 y el nucleótido 71.521.432 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).
- 40 ▪ En el caso del gen UBE2H, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 7 entre el nucleótido 129.470.836 y el nucleótido 129.470.925 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).

ES 2 656 640 T3

- En el caso del gen PARP-2, los cebadores amplifican una secuencia localizada en el cromosoma 14 entre el nucleótido 20.825.213 y el nucleótido 20.825.283 (Assembly Feb. 2009 GRCh37/hg19, fuente UCSC).
- En una forma de realización, los siguientes cebadores pueden usarse para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real:

5	• GAPDH		
	○ cebador directo:	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	(SEQ ID NO:1)
	○ cebador inverso:	GGGGTCATTGATGGCAACAATA	(SEQ ID NO:2)
	• B2M		
10	○ cebador directo:	GCTCAGTAAAGACACAACCATCC	(SEQ ID NO:3)
	○ cebador inverso:	CATCTGTGGATTCAGCAAACC	(SEQ ID NO:4)
	• ABCC1		
	○ cebador directo:	CCAGTGGGGATCGGACAGA	(SEQ ID NO:5)
	○ cebador inverso:	AGGGGATCATCGAAGAGGTAAAT	(SEQ ID NO:6)
15	• ACOX1		
	○ cebador directo:	TTTCTTCACTGCAGGGCTTT	(SEQ ID NO:7)
	○ cebador inverso:	GGAAAGGAGGGATTTTGAGC	(SEQ ID NO:8)
	• HIF1A		
	○ cebador directo:	TTTTGCTCTTTGTGGTTGGA	(SEQ ID NO:9)
20	○ cebador inverso:	CCTGGTCCACAGAAGATGTTT	(SEQ ID NO:10)
	• IGJ		
	○ cebador directo:	GGACATAACAGACTTGAAGCA	(SEQ ID NO:11)
	○ cebador inverso:	TGGCAATTTCTTACACTAACCTGA	(SEQ ID NO:12)
	• TNFRSF10B		
25	○ cebador directo:	GGTTTCATATTTAATTTGGTCATGG	(SEQ ID NO:13)
	○ cebador inverso:	CAAACAAGGAAGCACATTGTGTA	(SEQ ID NO:14)
	• RPS23		
	○ cebador directo:	GATTTGGTCGCAAAGGTCAT	(SEQ ID NO:15)
	○ cebador inverso:	TGCCTTTGTATAGGGCCAAA	(SEQ ID NO:16)
30	• ABCC3		
	○ cebador directo:	GGAGGACATTTGGTGGGCTTT	(SEQ ID NO:17)
	○ cebador inverso:	CCCTCTGAGCACTGGAAGTC	(SEQ ID NO:18)
	• LYN		

ES 2 656 640 T3

- cebador directo: ATCCAACGTCCAATAAACAGCA (SEQ ID NO:19)
- cebador inverso: AAGGCTACCACAATGTCTCCT (SEQ ID NO:20)
- PARP2
 - cebador directo: GGGAAAGGAATCTACTTTGCTG (SEQ ID NO:21)
 - cebador inverso: TTCTTTAGGCGAGAGGCAAA (SEQ ID NO:22)
- 5
 - UBE2H
 - cebador directo: CGCAGGTTTTCCAATCATCT (SEQ ID NO:23)
 - cebador inverso: ATGGCCATTTCTTCCCAAG (SEQ ID NO:24)

ES 2 656 640 T3

Nombre	Descripción	Identificante de Genes	Ejemplo de secuencias de ARNm
		Sequence Id. (Ensembl)	Sequence Id. (Genbank)
ACOX1	Acil-CoA oxidasa 1, palmitoilo	ENSG00000161533 (SEQ ID NO 25)	NM_001185039.1 (SEQ ID NO:35) NM_004035.6 (SEQ ID NO:36) NM_007292.5 (SEQ ID NO:37)
TNFRSF10B	Superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 10b	ENSG00000120889 (SEQ ID NO 26)	NM_003842.4 (SEQ ID NO:38) NM_147187.2(SEQ ID NO:39)
ABCC1	Cassette de unión a ATP, sub-familia C (CFTR/MRP), miembro 1	ENSG00000103222 (SEQ ID NO 27)	NM_004996.3 (SEQ ID NO:40)
ABCC3	Cassette de unión a ATP, sub-familia C (CFTR/MRP), miembro 3	ENSG00000108846 (SEQ ID NO 28)	NM_001144070.1(SEQ ID NO:41) NM_003786.3 (SEQ ID NO:42)
HIF1A	Factor 1 inducible de hipoxia, subunidad alfa	ENSG00000100644 (SEQ ID NO 29)	NM_001243084.1(SEQ ID NO:43) NM_001530.3 (SEQ ID NO:44)
LYN	Homólogo oncogen relacionado a sarcoma viral de Yamaguchi V-yes-1	ENSG00000254087 (SEQ ID NO 34)	NM_001111097.2(SEQ ID NO:45) NM_002350.3 (SEQ ID NO:46)
IGJ	Polipéptido de Inmunoglobulina J, proteína enlazadora para polipéptidos inmunoglobulina alfa y mu	ENSG00000132465 (SEQ ID NO 30)	NM_144646.3 (SEQ ID NO:47)
UBE2H	Enzima E2H conjugante de ubiquitina	ENSG00000186591 (SEQ ID NO 31)	NM_001202498.1 (SEQ ID NO:48) NM_003344.3 (SEQ ID NO:49)
PARP2	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 2	ENSG00000129484 (SEQ ID NO 32)	NM_001042618.1(SEQ ID NO:50) NM_005484.3(SEQ ID NO:51)
RPS23	Proteína S23 ribosómica	ENSG00000186468 (SEQ ID NO 33)	NM_001025.4(SEQ ID NO:52)
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	ENSG00000111640	NM_002046 (SEQ ID NO:53) NM_001256799 (SEQ ID NO:54)

B2M	beta-2 microglobulina	ENSG00000166710	NM_004048.2 (SEQ ID NO:55)
------------	-----------------------	-----------------	----------------------------

Los dos genes de mantenimiento utilizados fueron B2M y GAPDH. En el caso del gen B2M, la secuencia amplificada se localiza en el cromosoma 15 entre los nucleótidos 45.010.919 y los nucleótidos 45.010.990 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente UCSC).

5 En el caso del gen GAPDH, la secuencia amplificada se encuentra en el cromosoma 12 entre los nucleótidos 6.643.999 y los nucleótidos 6.645.738 (Assembly Feb. 2009 GRch37/hg19, fuente de UCSC).

Ventajosamente, para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real, se seleccionan para permitir una detección simultánea, cebadores, tamaño (preferiblemente entre 80 y 150 nucleótidos), Tm (temperatura de fusión, preferiblemente 60°C ± 1°C), GC% (porcentaje de nucleótido G o C, preferiblemente ~60% en 3'),
 10 autocomplementariedad 3' y 5' y estabilidad (preferiblemente inferior a 4 nucleótidos), rangos de tamaño de producto y parámetros termodinámicos (evolución de la estructura secundaria según cebador, Tm y concentración de sal de sodio).

- Tras haber identificado estos diez genes y seis factores predictores de expresión génica, finalmente se implementó una estrategia de combinación para identificar el perfil de expresión génica más
 15 común/específico y descartar variaciones individuales o valores atípicos (por ejemplo, debido a un error de manipulación de la muestra). La combinación de muestras es un método frecuentemente utilizado en epidemiología cuando los estudios individuales son demasiado pequeños para permitir una conclusión definitiva.

- Por lo tanto, primero se eligió la combinación de genes duales más significativa (y luego se registró la siguiente información: número de pacientes en la subpoblación, Tasa de Riesgo (Hazard Ratio, HR), valor p del modelo de Cox. A continuación, se agregó la segunda combinación más significativa de genes
 20 duales para aumentar el tamaño de la muestra y también el poder de los análisis. Se registró la misma información que la anterior. El proceso de selección se detuvo cuando no se agregaron pacientes adicionales (o se agregaron pocos) al tamaño de la muestra después de la adición de una nueva combinación, con la condición también de que se mantuvieran la Tasa de Riesgo y/o el valor p (ver
 25 Ejemplo 2, Tabla 5).

- El proceso se detuvo después de seis combinaciones (66 pacientes en total) siendo la selección final de combinaciones de genes duales (denominadas en lo sucesivo individualmente "factores predictores de la expresión génica" o colectivamente como la "huella digital genética/transcriptacional"):

30

- La regulación positiva concomitante de los genes ACOX-1 y TNFRSF10B con valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 3,05 para ACOX-1 y menor o igual a 6,1 para TNFRSF10B; (HR = 0,19, valor de p = 0,0091).

35

- La regulación negativa concomitante del gen RPS23 y la regulación positiva del gen ACOX-1 con los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente mayores que 0,35 para RPS23 y menores o iguales a 3,05 para ACOX-1; (HR = 0,20, valor de p = 0,00046).

- La regulación positiva concomitante de los genes ABCC3 y LYN con los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos o igual a 4,3 para ABCC3 y menor o igual a 1,65 para LYN; (HR = 0,19, valor de p = 0,00025).

40

- La regulación positiva concomitante de los genes HIF1A y TNFRSF10B con valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 3,95 para HIF1A y menor o igual a 5,65 para TNFRSF10B; (HR = 0,19, valor de p = 0,00013).

- La regulación negativa concomitante del gen ABCC1 y la regulación positiva del gen IGJ con los valores Umbral del Ciclo Delta del paciente mayores de 3,5 para ABCC1 y menor o igual a 7,05 para IGJ; (HR = 0,19, valor de p = 0,000011).
- La regulación negativa concomitante de los genes UBE2H y PARP-2 con valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente mayores de 3,7 para UBE2H y mayor que 7,1 para PARP-2; (HR = 0,192, valor de p = 0,000004).

Obsérvese que se entiende que en la presente se incluyen ligeras modificaciones a los valores punto de corte definidos anteriormente (por ejemplo, $\pm 10\%$ o incluso $\pm 25\%$ de los valores punto de corte establecidos) para reflejar el hecho de que el umbral óptimo puede ubicarse en la proximidad. a los puntos punto de corte evaluados y que la cohorte de pacientes es solo representativa de una población global con cáncer.

La SG se analizó en la subpoblación identificada como portadora de al menos uno de los factores predictores de expresión génica, denominada en lo sucesivo la subpoblación "huella digital genética" o "huella digital transcripcional" (65 pacientes), y en su contraparte, es decir, pacientes que no presentaron cualquiera de los factores predictores de expresión génica, a los que se hará referencia en lo sucesivo como la subpoblación "huella digital no genética" o "huella digital no transcripcional" (53 pacientes).

El análisis de la subpoblación de "huella digital genética" mostró que los pacientes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina tenían una mediana de SG de 12,9 meses en comparación con 4,7 meses en los pacientes que recibieron placebo más gemcitabina (análisis multivariante). Después del ajuste por diferencias en las características iniciales, la diferencia en la mediana de SG demostró ser estadísticamente significativa (valor p <0,000001) con una tasa de riesgo de muerte (definida como la probabilidad de muerte bajo masitinib más gemcitabina sobre la probabilidad de muerte bajo placebo más gemcitabina) de 0,17 con un intervalo de confianza del 95% de [0,09; 0,34]. Por lo tanto, los pacientes que albergan al menos uno de los factores predictores de expresión génica antes mencionados y, por lo tanto, identificados como pertenecientes a la subpoblación de "huella digital genética" definida, tienen un 83% de disminución en el riesgo de muerte cuando se los trata con una combinación de masitinib más gemcitabina en comparación con gemcitabina sola. Considerando el peor escenario posible del límite del intervalo de confianza más alto, es decir, el 0,34, el riesgo de muerte para los pacientes en la subpoblación de "huella digital genética" aún se redujo en un 66% cuando se los trató con masitinib más gemcitabina. Las estimaciones de Kaplan-Meier para la subpoblación de "huella digital genética" mostraron claramente que la probabilidad de supervivencia es consistentemente más alta y que las tasas de supervivencia de 6 a 24 meses fueron favorables para el tratamiento con masitinib más gemcitabina en comparación con el tratamiento con gemcitabina sola (ver Ejemplo 2, Figura 7) .

Por el contrario, el análisis de la subpoblación de "huella digital no genética" mostró una mediana de SG de 5,6 meses para el tratamiento con masitinib más gemcitabina en comparación con 13,2 meses en pacientes que recibieron placebo más gemcitabina (análisis multivariante). La diferencia en la mediana de SG fue estadísticamente significativa (valor p = 0,000036) con una tasa de riesgo de muerte (definida como la probabilidad de muerte bajo masitinib más gemcitabina sobre la probabilidad de muerte bajo placebo más gemcitabina) de 4,24 con un intervalo de confianza del 95% de [2,11; 8,52] en el modelo multivariante (ver Ejemplo 2, Figura 8). Por lo tanto, el riesgo de muerte para pacientes que no albergan al menos uno de los factores predictores de expresión génica antes mencionados es mayor cuando se tratan con la combinación de masitinib más gemcitabina en comparación con gemcitabina sola. Por lo tanto, es desaconsejable dicho tratamiento de cualquier paciente en la subpoblación de "huella digital no genética", y en ausencia de cualquier otro factor predictor positivo.

Se observó que no había correlación entre los datos genómicos y el estado de intensidad del dolor de VAS inicial, es decir, con respecto al factor predictor de intensidad del dolor. Esto fue cierto para la población genómica en general (119 pacientes), para las subpoblaciones de “huella digital genética” y “huella digital no genética”. En relación con la presente invención, parece probable, sin querer limitarse a la teoría, que los factores predictores de la intensidad del dolor y la expresión génica están asociados con mecanismos independientes de progresión de la enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento de masitinib es de beneficio terapéutico para un paciente que es positivo para un factor de predicción pero negativo para otro; es decir, no existe contradicción.

Teniendo en cuenta la expresión génica como un factor predictor independiente, el plan de gestión de tratamiento es simplemente una opción binaria entre la administración de masitinib, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico, a los pacientes identificados con la huella digital genética apropiada, y la no administración de masitinib a pacientes que carecen de dicha huella digital genética. El plan de gestión de tratamiento para el factor predictor de la intensidad del dolor es más complejo y debe tener en cuenta los diferentes umbrales de intensidad del dolor y los regímenes de tratamiento existentes. Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, el descubrimiento de factores predictores específicos e independientes nos lleva a proponer un nuevo plan de gestión terapéutico en pacientes con cáncer pancreático de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 3.

Por lo tanto, en una primera forma de realización, la invención se refiere a un método de tratamiento del cáncer en pacientes humanos, en el que un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a un paciente que lo necesita, combinado opcionalmente con al menos un agente antineoplásico.

El compuesto de la invención y el al menos un agente antineoplásico opcional se pueden administrar por separado, simultáneamente o secuencialmente en el tiempo.

De acuerdo con una forma de realización particular, dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en combinación con al menos un agente antineoplásico para el tratamiento de cáncer, en el que dicho paciente es naïve a dicho al menos un agente antineoplásico o que responde al tratamiento con dicho al menos un agente antineoplásico.

En otra forma de realización, dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en combinación con al menos un agente antineoplásico para el tratamiento de cáncer, en donde dicho paciente es refractario o resistente a dicho al menos un agente antineoplásico.

La invención también se refiere a un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente como se definió anteriormente, especialmente masitinib, combinado opcionalmente con al menos un agente antineoplásico, para uso como medicamento o en una composición farmacéutica para un método tal como definido en la descripción.

La invención también se refiere a un kit que comprende al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente como se definió anteriormente, especialmente masitinib, opcionalmente con al menos un agente antineoplásico, para uso en un método para el tratamiento de un cáncer como se define en la presente descripción y ejemplos.

En una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente en el que un inhibidor de tirosina quinasa o un inhibidor de mastocitos es un inhibidor de la actividad quinasa seleccionado de las tirosina quinasas de: c-Kit, PDGFR, Lyn, Fyn y DDR1.

5 De acuerdo con una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se define anteriormente, en el que dicho paciente se selecciona inicialmente para el tratamiento basándose en el factor predictor de la intensidad del dolor.

Así, en una forma de realización, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que está asociado con el dolor o que requiere administración de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, en un paciente humano, en el que un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a un paciente que lo necesita, combinado opcionalmente con al menos un agente antineoplásico.

10 En una forma de realización, se considera que dicho paciente está en la subpoblación de tratamiento indicada si al menos en una ocasión dicho paciente presenta un dolor relacionado con la enfermedad definido como un puntaje de intensidad de dolor en Escala Analógica Visual (VAS) distinto de cero, o medida equivalente de intensidad de dolor .

En otras formas de realización, se considera que dicho paciente está en la subpoblación de tratamiento indicada si al menos en una ocasión dicho paciente presenta dolor relacionado con la enfermedad definido como un puntaje de intensidad de dolor VAS mayor que 5 (por ejemplo, VAS > 5 mm medido en una escala de 100 mm, o 5%); o un puntaje de intensidad de dolor VAS mayor que 10 (por ejemplo, VAS > 10 mm medido en una escala de 100 mm, o 10%); o incluso un puntaje de intensidad de dolor VAS mayor que 20 (por ejemplo, VAS > 20 mm medido en una escala de 100 mm, o 20%).

20 En otra forma de realización, se considera que dicho paciente está en la subpoblación de tratamiento indicada si al menos en una ocasión dicho paciente presenta un dolor relacionado con la enfermedad definido por una medida equivalente de dicho umbral de intensidad de dolor VAS > 20. Dicho paciente también se considera en la subpoblación de tratamiento indicada si al menos en una ocasión dicho paciente presenta una intensidad de dolor relacionada con la enfermedad clasificada como dolor de moderado a intolerable.

En una forma de realización, la intensidad del dolor relacionada con la enfermedad individual se define y evalúa como se describe anteriormente.

30 En otra forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente donde dicho paciente está afectado por cáncer pancreático asociado con dolor o que requiere administración de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad, y en el que el "dolor" se define como al menos una ocurrencia reportada de puntaje de intensidad del dolor en una escala de la Escala Analógica Visual (VAS) de más de 20 (por ejemplo, VAS > 20 mm medido en una escala de 100 mm, o 20%).

35 En una forma de realización, el tratamiento de dicho paciente se considera desaconsejable si, en ausencia de cualquier otro factor predictor independiente, dicho paciente no presenta dolor relacionado con la enfermedad y no requiere analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad.

De acuerdo con una forma de realización, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, en el que dicho paciente se selecciona inicialmente para el tratamiento basándose en factores predictores de expresión génica.

40 Según una forma de realización, dichos factores predictores de expresión génica se derivan del análisis de expresión de ARN en muestras de células de sangre periférica recogidas antes del tratamiento con dicho

inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

De acuerdo con una forma de realización, se considera que dicho paciente está en la subpoblación de tratamiento indicada si la expresión génica en muestras de células de sangre periférica recolectadas antes de la administración del compuesto de la invención muestra una regulación positiva concomitante o una regulación negativa de al menos dos genes seleccionado de: ACOX-1, TNFRSF10B, RPS23, ABCC3, LYN, HIF-1A, ABCC1, IGJ, UBE-2H o PARP-2. Por ejemplo, las combinaciones de genes duales incluyen, pero no se limitan a: la regulación positiva concomitante de los genes ACOX-1 y TNFRSF10B; la regulación negativa concomitante del gen RPS23 y la regulación positiva del gen ACOX-1; la regulación positiva concomitante de los genes ABCC3 y LYN; la regulación positiva concomitante de los genes HIF1A y TNFRSF10B; la regulación negativa concomitante de los genes ABCC1 e IGJ; la regulación negativa concomitante de los genes UBE2H y PARP-2.

En una forma de realización, la regulación positiva concomitante de los genes ACOX-1 y TNFRSF10B corresponde a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 3,81 para ACOX-1 y menor o igual a 7,63 para TNFRSF10B; más preferiblemente a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente menores que, o iguales a, 3,36 para ACOX-1 y menores o iguales a 6,71 para TNFRSF10B, y aún más preferiblemente a valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente menores o iguales a 3,05 para ACOX-1 y menor o igual a 6,1 para TNFRSF10B.

En una forma de realización, la regulación negativa concomitante del gen RPS23 y la regulación positiva del gen ACOX-1 corresponde a valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente superiores a 0,26 para RPS23 y menores o iguales a 3,81 para ACOX-1; más preferiblemente a valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente superiores a 0,32 para RPS23 y menores o iguales a 3,36 para ACOX-1; e incluso más preferiblemente a valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente superiores a 0,35 para RPS23 y menores o iguales a 3,05 para ACOX-1.

En una forma de realización, la regulación positiva concomitante de los genes ABCC3 y LYN corresponde a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 5,38 para ABCC3 y menor o igual a 2,06 para LYN; más preferiblemente a valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente menores o iguales a 4,73 para ABCC3 y menores o iguales a 1,82 para LYN; y aún más preferiblemente a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 4,3 para ABCC3 y menor o igual a 1,65 para LYN.

En una forma de realización, la regulación positiva concomitante de los genes HIF1A y TNFRSF10B corresponde a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 4,94 para HIF1A y menor o igual a 7,06 para TNFRSF10B; más preferiblemente a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 4,35 para HIF1A y menor o igual a 6,22 para TNFRSF10B; e incluso más preferiblemente a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 3,95 para HIF1A y menor o igual a 5,65 para TNFRSF10B.

En una forma de realización, la regulación negativa concomitante de los genes ABCC1 e IGJ corresponde a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente superiores a 2,63 para ABCC1 y menores o iguales a 5,29 para IGJ; más preferiblemente a valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente superiores a 3,15 para ABCC1 y menores o iguales a 6,35 para IGJ; e incluso más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,5 para ABCC1 y menores o iguales a 7,05 para IGJ.

En una forma de realización, la regulación negativa concomitante de los genes UBE2H y PARP-2 corresponde a los valores de Umbral del Ciclo Delta del paciente de más de 2,78 para UBE2H y más de 5,33 para PARP-2;

más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,33 para UBE2H y mayores que 6,39 para PARP-2; e incluso más preferiblemente a valores de Umbral de Ciclo Delta del paciente mayores que 3,7 para UBE2H y mayores que 7,1 para PARP-2.

5 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer, en el que un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico, es administrado a un paciente que lo necesita, en el que dicho paciente tiene una regulación positiva en sangre periférica del gen ACOX-1 u homólogo del mismo.

10 En una forma de realización, la regulación positiva del gen ACOX-1 corresponde al valor Umbral del Ciclo Delta del paciente de menos de, o igual a, 3,81; más preferiblemente de menos de, o igual a, 3,36; e incluso más preferiblemente de menos de, o igual a, 3,05.

Una sal preferida de masitinib es mesilato de masitinib.

De acuerdo con otra forma de realización, se administrará un compuesto de la invención a una dosis diaria de 4,5 a 12,0 mg/kg/día, con la dosis diaria inicial preferida de 6,0 a 7,5 mg/kg/día.

15 Opcionalmente, se escala la dosis de un compuesto de la invención en incrementos de 1,5 mg/kg/día hasta alcanzar un máximo de 12,0 mg/kg/día.

Opcionalmente, se reduce la dosis de un compuesto de la invención en incrementos de 1,5 mg/kg/día hasta alcanzar un mínimo de 4,5 mg/kg/día.

20 El ajuste de la dosis puede considerarse un proceso dinámico, con un paciente sometido a múltiples aumentos y/o disminuciones para optimizar el equilibrio entre la respuesta y la toxicidad durante el tratamiento, las cuales es probable que varíen a lo largo del tiempo y la duración de la exposición a la droga. Si se realiza un escalamiento de la dosis, se sugiere que la dosis inicial de 6,0 mg/kg/día se incremente en 1 a 2 mg/kg/día hasta una dosis máxima de 12,0 mg/kg/día, durante un período que depende de observaciones clínicas. Por ejemplo, un escalamiento de dosis única de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o
25 inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y preferiblemente mesilato de masitinib, puede tomar de 1 a 2 meses. También se contempla en la presente que para obtener completamente los beneficios terapéuticos de una dosis optimizada para el paciente de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, podrían implementarse incrementos de dosis más pequeños que 1 a 2
30 mg/kg/día. Se debe considerar la reducción de la dosis para reducir la toxicidad en los casos apropiados.

Cualquier dosis indicada aquí se refiere a la cantidad de ingrediente activo como tal, no a su forma de sal.

Dado que la dosis de masitinib en mg/kg/día utilizada en los regímenes de dosis descritos se refiere a la cantidad de ingrediente activo masitinib, las variaciones de composición de una sal farmacéuticamente aceptable de mesilato de masitinib no cambiarán dichos regímenes de dosis.

35 Dicho compuesto de la invención se administra preferiblemente por vía oral.

Dicho compuesto de la invención se administra preferiblemente dos veces al día.

Ventajosamente, el uso o método comprende una administración a largo plazo de una cantidad efectiva de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, durante más de 3 meses, preferiblemente más de 6 meses.

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere al método como se definió anteriormente, donde dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra para el tratamiento de cáncer pancreático de adenocarcinoma no extirpable avanzado o metastásico, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico, y en el que dicho paciente tiene necesidad del mismo, como se define por el factor predictor de la expresión génica o de la intensidad del dolor.

El al menos un agente antineoplásico puede ser un medicamento para el tratamiento de cánceres, y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en gemcitabina (Gemzar®; Lilly), erlotinib (Tarceva®; Roche), paclitaxel (Taxol®, Abraxane®; Bristol -Myers Squibb), Folfirinox, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, leucovorin y cualquier combinación de estos agentes antineoplásicos.

Según una forma de realización particular, la invención también se refiere a un método de tratamiento de cáncer pancreático, en el que un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra opcionalmente en combinación con gemcitabina.

Con respecto al mejor régimen de dosificación, dependiendo de la edad, condición individual, modo de administración y entorno clínico, dosis efectivas de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en pacientes humanos con cáncer pancreático es de 4,5 a 9,0 mg/kg/día por vía oral, preferiblemente en dos tomas diarias. Para pacientes humanos adultos con cáncer pancreático, se ha encontrado que una dosis inicial de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de 6,0 a 7,5 mg/kg/día es la forma de realización preferida de acuerdo con la invención. Para pacientes con una respuesta inadecuada después de una evaluación de respuesta a la terapia y en ausencia de toxicidades limitantes, el escalamiento de dosis de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, hasta un máximo de 9,0 mg/kg/día puede considerarse con seguridad y los pacientes pueden ser tratados siempre que se beneficien del tratamiento y en ausencia de toxicidad limitante. Para pacientes que experimentan toxicidad relacionada con el tratamiento, la dosis de dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede reducirse en incrementos de 1,5 mg/kg/día para alcanzar un mínimo de 4,5 mg/kg/día en pacientes intolerantes, siempre que se beneficien del tratamiento y en ausencia de toxicidades limitantes a dicha dosis.

En otra forma de realización, dicho inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a una dosis diaria inicial de 6,0 a 7,5 mg/kg/día, y la gemcitabina se administra a dosis semanal de 1000 ± 250 mg/m² de área superficial del paciente durante hasta siete semanas consecutivas como inicio (de 3 a 7 semanas), seguidas de una semana sin tratamiento, seguidas de ciclos de dosis semanales de 1000 ± 250 mg/m² durante 3 semanas, cada 28 días. Para la gemcitabina, debe entenderse que en la presente está comprendida una ligera modificación del régimen de dosificación anterior. Por ejemplo, cada 28 días significa que un ciclo tiene 3 semanas de tratamiento y 1 semana sin tratamiento.

De acuerdo con una forma de realización particular, la composición de la invención es una composición oral.

Como es conocido por los expertos en la técnica, se pueden usar diversas formas de excipientes adaptadas al modo de administración y algunas de ellas pueden promover la eficacia de la molécula activa, por ej.

promoviendo un perfil de liberación que hace que esta molécula activa en general sea más efectiva para el tratamiento deseado.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden así administrarse en diversas formas, más especialmente por ejemplo en una forma inyectable, pulverizable o ingerible, por ejemplo a través de la vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, rectal, vaginal, oftálmica, vía nasal, transdérmica o parenteral. Una ruta preferida es la administración oral. La presente invención cubre en particular el uso de un compuesto según la presente invención para la fabricación de composiciones farmacéuticas.

10 Tal medicamento puede tomar la forma de una composición farmacéutica adaptada para administración oral, que puede formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para su ingestión por el paciente. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que
15 facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Se pueden encontrar más detalles sobre técnicas para formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

En los dibujos:

Figura 1: Tasa de riesgo para el puntaje de muerte versus VAS en el análisis multivariante;

20 Figura 2: Ejemplo de escala VAS e instrucciones para el usuario.

Figura 3: plan de gestión del tratamiento basado en los factores predictores de intensidad del dolor y expresión génica;

Figura 4: Estimaciones de probabilidad de supervivencia para la subpoblación de "dolor" (análisis multivariante)

Figura 5: Probabilidad de supervivencia para la subpoblación "sin dolor, sin morfina" (análisis multivariante)

25 Figura 6: Estimaciones de Kaplan-Meier para la probabilidad de supervivencia para la subpoblación "dolor debajo de la mediana" (análisis multivariante)

Figura 7 - Probabilidad de supervivencia para la subpoblación de "huella digital genética" (análisis multivariante)

Figura 8 - Probabilidad de supervivencia para la subpoblación "huella digital no genética" (análisis multivariante)

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

30 Los datos presentados en estos ejemplos, y también en partes de la Descripción de la patente, se toman en parte del análisis preliminar y, como tales, representan una aproximación cercana al conjunto de datos validados finales.

EJEMPLO 1: Estudio aleatorio, controlado con placebo, fase 3 para evaluar la eficacia y seguridad de masitinib en combinación con gemcitabina para el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático avanzado/metastásico

5 El plan de desarrollo en cáncer pancreático llevado a cabo por AB Science para evaluar la eficacia y seguridad de masitinib en el tratamiento de combinación con gemcitabina en esta indicación se basó en el siguiente estudio clínico: Estudio AB07012 "Un estudio prospectivo, multicentro, aleatorio, doble ciego, controlado con placebo, de 2 grupos paralelos, fase 3 para comparar la eficacia y la seguridad de masitinib a 9 mg/kg/día en combinación con gemcitabina, con placebo en combinación con gemcitabina, en el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático avanzado/metastásico". La fecha punto de corte para los análisis de eficacia y
10 seguridad fue el 1 de marzo de 2012 correspondiente a la fecha de eliminación del doble ciego.

Descripción de la población de estudio AB07012

La población con intención de tratamiento (ITT, por sus siglas en inglés) se definió como todos los pacientes asignados aleatoriamente, independientemente de si habían recibido el tratamiento del estudio o no. La población mITT (intención de tratamiento modificada) incluyó a todos los pacientes con ITT, excepto los
15 pacientes retirados prematuramente del estudio por una causa bien documentada no relacionada con el tratamiento. La población ITT del estudio AB07012 consistió en 353 pacientes, inscritos desde el 11 de noviembre de 2008 hasta el 6 de julio de 2010 (último paciente incluido): 175 pacientes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina y 178 pacientes en el brazo de tratamiento con placebo más con gemcitabina. La eficacia clínica se analizó en la población de mITT, definida como la población ITT excluyendo
20 cinco pacientes. Dos pacientes del brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina no recibieron ni masitinib ni gemcitabina. De los dos pacientes del brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina, uno no recibió placebo ni gemcitabina, y el otro recibió gemcitabina pero no placebo. El quinto paciente que se excluyó se asignó al brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina, pero no tuvo cáncer pancreático.

Por lo tanto, la población de mITT consistió en 348 pacientes:

- 25 - 173 pacientes tratados con masitinib más gemcitabina
- 175 pacientes tratados con placebo más gemcitabina

Descripción de las poblaciones analizadas para la eficacia clínica según el factor predictor de intensidad del dolor

30 Tres subpoblaciones surgieron del análisis de las características iniciales, el tipo de tratamiento y la eficacia, y se definieron de la siguiente manera:

- "Dolor": pacientes con dolor relacionado con la enfermedad definido como un puntaje > 20 en la escala de intensidad visual analógica (VAS) (N = 137: 64 y 73 en los brazos de tratamiento con masitinib más gemcitabina y placebo más gemcitabina, respectivamente).
- "Sin dolor, sin morfina": pacientes con dolor relacionado con la enfermedad definido como VAS [0-5] y sin necesidad de analgésicos opioides (N = 68:34 pacientes cada uno en los brazos de tratamiento con
35 masitinib más gemcitabina y con placebo más gemcitabina) .
- "Por debajo de la mediana del dolor": todos los demás pacientes que no pertenecen a las subpoblaciones 'dolor' y 'sin dolor, sin morfina' (N = 107:57 y 50 pacientes en los brazos de tratamiento con masitinib más gemcitabina y placebo más gemcitabina, respectivamente) .

40 La subpoblación de "dolor", como se describió anteriormente, se definió en función de los motivos:

- A partir del análisis multivariante sobre la supervivencia global en el estudio AB07012, se identificó la intensidad de dolor como un factor principal (variable) que afecta la supervivencia global. Además, se encontraron interacciones entre la variable intensidad de dolor y el tratamiento de combinación administrado a los pacientes.
- 5 - Los resultados obtenidos del estudio AB07012 sobre la supervivencia global mostraron que masitinib más gemcitabina aumentó significativamente la supervivencia global de pacientes con cáncer pancreático que se asoció con una intensidad de dolor de VAS > 20 mm, en comparación con placebo más gemcitabina.
- Los resultados sobre la supervivencia global mostraron que la SG disminuyó en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina con una mayor intensidad del dolor.
- 10 - Una intensidad de dolor VAS de 20 mm coincidió con la aparición de una meseta (o asíntota horizontal) en la tasa de riesgo de muerte.
- En un estudio similar sobre el tratamiento del cáncer pancreático realizado por Moore y col. se informó una VAS de 20 mm como el punto de corte de evaluación de dolor VAS. En ese estudio, una combinación de erlotinib más gemcitabina no demostró ningún beneficio adicional en la supervivencia global en comparación con los pacientes que recibieron placebo más gemcitabina en pacientes con VAS > 20; tasa de riesgo de 1,00 (95% IC [0,78; 1,27]) [Moore MJ, y col., J Clin Oncol. 20 de mayo 2007; 25 (15): 1960-6].
- 15 - En la literatura científica, otras varias publicaciones informaron resultados clínicos que incluían puntajes de VAS con un punto de corte en 20 mm [(Marineo G. J Pancreas 2003; 4 (1): 1-10); (Zaza C, y col., J Pain Symptom Manage, 2002; 24: 526 - 542)].
- 20

La eficacia clínica se evaluó mediante el análisis de la supervivencia global (SG) en la población global y en las tres subpoblaciones de intensidad de dolor definidas anteriormente. La intensidad del dolor se evaluó mediante la escala analógica visual, una escala lineal que proporciona una representación visual de la amplitud del dolor tal como la percibe el paciente. La amplitud estaba representada por una línea de 100 mm de largo sin marcas de referencia. Un extremo indicó una ausencia de dolor (valor 0) y el otro el peor dolor imaginable (valor 100). En la práctica, antes de recibir el tratamiento de investigación (es decir, al inicio del estudio) se le pidió a cada paciente que indicara el nivel de sensación de dolor que estaban experimentando dibujando una línea vertical en la escala de VAS. Se consideró que un paciente sin dolor, o con un dolor insignificante, al inicio del estudio ubicaría una línea vertical entre 0 y 5 en la escala VAS.

Análisis de eficacia de supervivencia global para el estudio AB07012

La supervivencia global fue el objetivo principal de este estudio. La SG se midió desde la fecha de aleatorización hasta la fecha de muerte documentada. Si no se observó la muerte, los datos de supervivencia global se censaron en la última fecha en que se sabía que el paciente estaba vivo. La SG se investigó en cada característica inicial a través de un análisis univariante en pacientes que habían recibido el tratamiento con placebo más gemcitabina, para determinar las variables que pueden afectar la supervivencia global independientemente del tratamiento. Las principales diferencias en los resultados de SG (significación estadística al 5%, datos no mostrados) se observaron en las características basales de: escala VAS para la intensidad del dolor; cáncer localmente avanzado/metastásico; nivel de albúmina (normal/anormal); y localización del tumor primario en el cuerpo del páncreas. El parámetro con el mayor impacto en la supervivencia global fue la intensidad del dolor. Si bien el dolor relacionado con la enfermedad se ha asociado

anteriormente con la supervivencia global, nunca se ha demostrado que la intensidad del dolor sea el factor más importante para la supervivencia global. El impacto de la intensidad del dolor sobre la supervivencia global de los pacientes con cáncer pancreático se considera un gran descubrimiento. Debido a que estas variables, y en particular la intensidad del dolor, mostraron claramente un impacto en la supervivencia global en pacientes
5 tratados con el tratamiento de combinación placebo más gemcitabina, se esperaba que cualquier diferencia en las características iniciales entre ambos brazos de tratamiento de combinación también afectara la supervivencia global. Un modelo univariante no es adecuado, incluso cuando se estratificó en dos variables (aquí, país y metástasis/localmente avanzado) y, por lo tanto, se reemplazó por un modelo multivariante de Cox para identificar el efecto del tratamiento de combinación sobre la supervivencia global. Los resultados
10 obtenidos del análisis multivariante de Cox sobre la supervivencia global se presentan a continuación en la población global y en las tres subpoblaciones de intensidad del dolor con VAS ("dolor", "sin dolor, sin morfina" y "dolor por debajo de la mediana").

Análisis de supervivencia global multivariante para la determinación del factor predictor de intensidad del dolor

El impacto de cada variable en la supervivencia global y la eficacia del tratamiento se investigó mediante la
15 construcción de un modelo multivariante, en el que las variables se seleccionaron mediante un procedimiento gradual utilizando umbrales del 5% para la entrada y el mantenimiento de las variables. El modelo final multivariante incluyó los siguientes factores:

- Brazo de tratamiento sea cual sea su nivel de significancia
- Factores seleccionados con el modelo multifactorial "por etapas": cáncer localmente
20 avanzado/metastásico, localización del tumor primario en el cuerpo del páncreas, nivel de albúmina (normal/anormal) y evaluación del dolor con VAS asignada a tres subpoblaciones de intensidad de dolor con VAS (como se define arriba).
- Las interacciones se validaron gráficamente a través de las estimaciones de Kaplan-Meier (por brazo de tratamiento y por modalidad de factor).

25 La Tabla 2 resume las variables estadísticamente significativas identificadas por el modelo Cox de análisis multivariante para la población global.

Tabla 2: Análisis y desarrollo de un modelo de Cox multivariante que incluye el brazo de tratamiento en la población global

Supervivencia global	Modelo Cox univariante		Modelo Cox Multivariante por etapas selección 5%	Modelo Cox Final Multivariante con brazo de tratamiento	
	Tasa de riesgo [95% CI]	χ^2 valor p	χ^2 valor p	Tasa de riesgo [95% IC]	χ^2 valor p
Brazo de tratamiento (masitinib/Placebo)	1,01 [0,81;1,26]	0,922	No seleccionado	0,89 [0,70; 1,13]	0,344
Sexo (Hembra/Macho)	0,79 [0,63; 0,99]	0,040	No seleccionado		
Edad (>65 años Sí/No)	1,01 [0,81; 1,27]	0,928	No seleccionado		
Metastásico/Localmente Avanzado	1,55 [1,11; 2,17]	0,010	0,018	1,55 [1,09; 2,22]	0,016
ECOG (1/0)	1,60 [1,27; 2,02]	<0,001	No seleccionado		
País (Francia Sí/No)	0,74 [0,59;0,94]	0,011	No seleccionado		
VAS Dolor (mm) – continuo	1,01 [1,00; 1,01]	0,001	No seleccionado		
VAS Dolor- por clase ([0;5];[5;20]; >20)	1,69 [1,29;2,23] (> 20 versus [0;5])	<0,001	<0,001	2,00 [1,50; 2,66] (> 20 versus [0;5])	<0,001*
CA Clínicamente Significativo 19-9 (Sí/No)	1,19 [0,91; 1,55]	0,196	No seleccionado		
Metástasis en Hígado (Sí/No)	1,35 [1,06; 1,72]	0,013	No seleccionado		
Metástasis en Nodos Linfáticos (Sí/No)	1,39 [1,05; 1,83]	0,022	No seleccionado		
Peso (>65kg Sí/No)	1,03 [0,83; 1,29]	0,790	No seleccionado		
Localización en Cabeza (Sí/No)	0,99 [0,79; 1,23]	0,903	No seleccionado		

Localización en Cuerpo (Sí/No)	0,84 [0,66; 1,06]	0,148	0,026	0,74 [0,57; 0,96]	0,021
Localización en Cola (Sí/No)	1,10 [0,87; 1,41]	0,424	No seleccionado		
BMI (kg/m ²) - continuo	1,00 [0,98; 1,02]	0,959	No seleccionado		
Gamma GT (Normal/Anormal)	0,69 [0,53; 0,91]	0,007	No seleccionado		
Albúmina (Normal/Anormal)	0,29 [0,20; 0,42]	<0,001	<0,001	0,29 [0,20 ; 0,44]	<0,001*

* interacción significativa con el tratamiento: p = 0,008

Los resultados obtenidos de este modelo multivariante no mostraron ningún efecto sobre la supervivencia del tratamiento de combinación en la población global, aunque revelaron un impacto significativo de cuatro variables: intensidad del dolor (p <0,001), nivel de albúmina (p <0,001), la clasificación del tumor como metastásico o localmente avanzado (p = 0,016), y la localización del tumor primario en el cuerpo del páncreas (p = 0,021). Por lo tanto, estas variables se conservaron en el modelo multivariante para SG. Sorprendentemente, estos datos llevaron a un descubrimiento de que la intensidad del dolor de acuerdo con las subpoblaciones de VAS definidas al inicio del estudio es una variable crítica con un impacto significativo en la SG de los pacientes con cáncer pancreático. Por lo tanto, se realizó un análisis multivariante en subpoblaciones de acuerdo con las subpoblaciones de intensidad de dolor de VAS iniciales, siguiendo el mismo procedimiento que antes en la población global. La Tabla 3 resume los resultados del análisis multivariante de la SG en la población global y en cada una de las tres subpoblaciones de intensidad del dolor con VAS.

Los resultados del análisis multivariante confirmaron que los pacientes tratados con masitinib más gemcitabina no tenían una ventaja de supervivencia estadísticamente significativa sobre el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina para la población global. En base a nuestros hallazgos de que la intensidad inicial del dolor se correlacionaba fuertemente con la SG, este parámetro se investigó adicionalmente para determinar si existía alguna interacción entre esta variable, el tipo de tratamiento de combinación y la supervivencia global; es decir, se analizó SG en función del puntaje de intensidad del dolor de la VAS, la para ambos brazos de tratamiento (masitinib versus placebo). Curvas similares corresponderían a ninguna interacción entre las dos variables, mientras que curvas separadas indicarían una interacción. Se reveló una interacción significativa y fuerte entre la escala VAS que evalúa la intensidad del dolor y el tratamiento de combinación utilizado, como lo demuestra un valor p de 0,010 para la subpoblación "dolor" y 0,041 para la subpoblación "sin dolor, sin morfina" (Tabla 3). La validación gráfica de las interacciones mostró que la mediana de SG en los pacientes con VAS > 20 fue menor en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina en comparación con el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina; tasa de riesgos de 0,61 (IC del 95% [0,42; 0,88]) (Figura 4). Por el contrario, la mediana de SG en pacientes con una VAS [0; 5] (es decir, la subpoblación "sin dolor, sin morfina") fue mayor en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina en comparación con el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina; tasa de riesgo de 1,63 (95% IC [0,94; 2,85]) (Figura 5). Esto resalta la importancia clave de la variable intensidad de dolor para el análisis de la SG en pacientes con cáncer.

En la población global, el análisis multivariante sobre la supervivencia global no mostró un impacto significativo del tratamiento de combinación en la SG con un valor de p de 0,740 y una tasa de riesgo de muerte con su intervalo de confianza del 95% de 0,90 (IC 95% [0,71; 1,14]). La mediana de SG fue de 7,7 meses (IC 95%

ES 2 656 640 T3

[6,1; 10,6]) en pacientes tratados con el tratamiento de combinación de masitinib más gemcitabina y 7,0 meses (IC 95% [5,8; 9,6]) que recibieron placebo más gemcitabina, respectivamente. Las tasas de SG a los 6, 12, 18 y 24 meses fueron respectivamente, 59,2%, 32,1%, 17,3% y 9,5% para masitinib más gemcitabina, versus 56,0%, 28,5%, 14,5% y 7,5% para placebo más gemcitabina.

5

Tabla 3: Resultados de la supervivencia global después del análisis multivariante en la población global y en cada subpoblación de intensidad del dolor de la VAS

	Tratamiento	N	Valor p*	Tasa riesgo [95%IC]	Mediana de SG (meses)	Tasas SG (meses) [95%IC]			
						M6	M12	M18	M24
Población global	M+G	173	0,740	0,90 [0,71;1,14]	7,7 [6,1; 10,6]	59,2 [51,2;69,3]	32,1 [24,1;43,4]	17,3 [11,2;27,3]	9,5 [5,2;17,7]
	P+G	175			7,0 [5,8; 9,6]	56,0 [47,9;66,4]	28,5 [21,0;39,5]	14,5 [9,1;23,7]	7,5 [3,9;14,8]
"Dolor"	M+G	64	0,010	0,61 [0,42; 0,88]	8,1 [5,9; 11,5]	58,2 [48,5;71,7]	32,2 [22,2;47,9]	18,2 [10,4;32,9]	≤6,4*[2,5; 17,3]
	P+G	73			5,4 [4,5; 8,0]	43,9 [33,7;58,7]	17,8 [10,5;31,3]	7,8 [3,6;18,0]	≤2,0* [0,5; 8,2]
"Sin dolor sin morfina"	M+G	34	0,041	1,63 [0,94; 2,85]	11,4 [7,2; 22,2]	71,1 [56,5;89,8]	46,9 [30,2;74,4]	24,5 [11,4;56,6]	12,5 [4,0;43,9]
	P+G	34			15,4 [11,4; NA]	81,1 [69,8;94,3]	62,7 [46,9;84,4]	41,8 [25,4;71,1]	27,2 [13,2;60,0]
"Dolor debajo de mediana"	M+G	57	0,976	0,95 [0,63; 1,41]	6,7 [5,6;10,3]	57,3 [45,5;74,4]	22,8 [12,9;41,4]	8,5 [3,2;23,4]	6,3 [2,0;20,1]
	P+G	50			6,4 [5,6;10,0]	55,6 [44,0;73,3]	21,0 [11,7;39,7]	7,4 [2,6;22,5]	5,4 [1,6;19,4]

M + G: masitinib más gemcitabina; P + G: placebo más gemcitabina. * Valor p de *log-rank*.

5 En la subpoblación de "dolor" (pacientes con dolor relacionado con la enfermedad definido como VAS > 20), la combinación de masitinib más gemcitabina aumentó significativamente la supervivencia global de pacientes con cáncer pancreático y con un puntaje de intensidad de dolor de la VAS > 20 en comparación con placebo más gemcitabina, evidenciado por un valor de p de 0,01. La tasa de riesgo de muerte (definida como la probabilidad de muerte bajo masitinib más gemcitabina sobre la probabilidad de muerte bajo placebo más gemcitabina) fue 10 0,61 (IC 95% [0,42; 0,88]), lo que significa que el riesgo de muerte en pacientes tratados con masitinib más gemcitabina se redujo significativamente en un 39% en comparación con los pacientes tratados con placebo más gemcitabina. Considerando el peor escenario posible del límite del intervalo de confianza más alto, es decir, 0,88, el riesgo de muerte para los pacientes en la subpoblación de "dolor" se redujo todavía en un 12% cuando se trató con masitinib más gemcitabina. La mediana de SG en el brazo de tratamiento con masitinib 15 más gemcitabina fue de 8,1 meses, mientras que solo fue de 5,4 meses en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina. Las tasas de supervivencia a los 6, 12, 18 y 24 meses fueron, respectivamente, 58,2%, 32,2%, 17,2% y ≤ 6,4% en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina, frente a 43,9%, 17,8%, 7,8% y ≤ 2,0% en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina. Las estimaciones de Kaplan-Meier para el modelo multivariante de esta subpoblación se muestran en la Figura 4. La ventaja terapéutica del tratamiento 20 con masitinib más gemcitabina sobre placebo más gemcitabina se ve claramente en el modelo multivariante, en el que la probabilidad de supervivencia de masitinib más gemcitabina es consistentemente más alta.

En la subpoblación "sin dolor, sin morfina" (pacientes con dolor relacionado con la enfermedad definido como VAS [0-5] y sin necesidad de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad), el brazo de tratamiento con gemcitabina demostró supervivencia significativamente aumentada de pacientes 25 con cáncer pancreático en comparación con el brazo de masitinib más gemcitabina, como lo demuestra un valor de p de 0,041 y una tasa de riesgo de muerte de 1,63 (IC del 95% [0,94; 2,85]). Este análisis multivariante apoyó la conclusión de que, en ausencia de otros factores predictivos independientes, es desaconsejable la administración de masitinib más gemcitabina para el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático que no

está asociado con dolor o el requerimiento de analgésicos opioides para el tratamiento del dolor relacionado con la enfermedad.

Las estimaciones de Kaplan-Meier para el modelo multivariante de esta subpoblación se muestran en la Figura 5.

5 En la subpoblación "dolor debajo de la mediana" (es decir, pacientes con dolor relacionado con la enfermedad definido como $5 < \text{VAS} < 20$), el tratamiento no se identificó a través del modelo multivariante de Cox como un impacto significativo en la supervivencia global con un valor p de 0,976 y tasa de riesgo de muerte de 0,95 (IC del 95% [0,63; 1,41]). Esta subpoblación fue por lo tanto considerada como neutral. Las estimaciones de Kaplan-Meier para el modelo multivariante de esta subpoblación se muestran en la Figura 6. A partir de este gráfico de Kaplan-Meier, es evidente que las dos curvas que representan la probabilidad de supervivencia son casi idénticas y, por lo tanto, la subpoblación "dolor debajo de la mediana" es neutral hacia el tratamiento con masitinib más gemcitabina. Esto es importante cuando se considera que el tratamiento de la subpoblación "sin dolor, sin morfina" con masitinib más gemcitabina es desaconsejable, la subpoblación "dolor debajo de la mediana" en consecuencia representa un gran amortiguador entre los umbrales de tratamiento y no tratamiento, que mitiga en gran medida cualquier riesgo de que un paciente reciba tratamiento que sería perjudicial para su supervivencia.

Además, se observa que los pacientes con dolor relacionado con la enfermedad definido como $\text{VAS} > 20$ pueden necesitar analgésicos opiáceos para controlar su dolor y, posteriormente, su dolor puede reducirse a un puntaje de $\text{VAS} \leq 5$ mm. Sin embargo, esta subpoblación de pacientes, definida como "sin dolor pero con un requerimiento de analgésicos opiáceos", también se mostró como una subpoblación neutral (datos no mostrados).

Análisis de seguridad para el estudio AB07012

En la subpoblación de pacientes con "dolor" ($\text{VAS} > 20$), la frecuencia de eventos adversos (EA) fue similar en ambos grupos de tratamiento (100%). Las frecuencias de eventos adversos graves y eventos adversos severos fueron mayores en el brazo de tratamiento con masitinib (68,8% y 85,9% de los pacientes, respectivamente) que en el brazo de tratamiento con placebo (56,2% y 71,2%, respectivamente). Los eventos adversos que condujeron a la discontinuación o interrupción de gemcitabina fueron más frecuentes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina que en el grupo placebo más gemcitabina. Estas tendencias se repitieron en la población global; es decir, la frecuencia de eventos adversos fue similar en ambos brazos de tratamiento y la frecuencia de eventos adversos graves y severos, así como la discontinuación o interrupción del tratamiento con gemcitabina, fueron mayores en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina que en el brazo placebo más gemcitabina.

La exposición a gemcitabina en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina en comparación con el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina se redujo en aproximadamente: 35% en la población global; 30% en la subpoblación "dolor"; 30% en la subpoblación de "dolor debajo de la mediana"; y 45% en la subpoblación "sin dolor, sin morfina". En general, los pacientes del brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina recibieron masitinib durante una media de 3,0 meses, mientras que los pacientes del grupo placebo más gemcitabina recibieron placebo durante una media de 4,3 meses. Por lo tanto, la exposición a la droga de estudio fue significativamente menor en el brazo de masitinib más gemcitabina ($p = 0,001$). Esta menor exposición a la droga de estudio se destacó por la intensidad de la dosis de droga recibida por los pacientes durante el estudio: el 34,7% de los pacientes del brazo de masitinib más gemcitabina recibieron

menos del 80% de la dosis inicialmente planeada frente al 17,1% de los pacientes del brazo placebo más gemcitabina.

En conjunto, estas observaciones sobre los eventos adversos y la exposición a la droga indican que la dosis de masitinib administrada de 9 mg/kg/día no es óptima para el cumplimiento por parte del paciente, en parte debido a la toxicidad adicional asociada con la combinación. Teniendo en cuenta también nuevos conocimientos sobre los mecanismos de acción inferidos de masitinib, una dosis de masitinib de 6 mg/kg/día se considera la dosis inicial óptima, con escalada de dosis permitida en pacientes con respuesta inadecuada y en ausencia de toxicidades limitantes.

Conclusiones de eficacia del estudio AB07012 de acuerdo con el factor predictor de la intensidad de dolor

Uno de los objetivos del estudio AB07012 fue comparar la eficacia de masitinib más gemcitabina, con la de placebo más gemcitabina en el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático localmente avanzado y/o metastásico no extirpable. En la población global, el tratamiento con masitinib más gemcitabina no mostró mejoras estadísticamente significativas en la mediana de supervivencia global de los pacientes. Sin embargo, el análisis multivariante en diferentes características iniciales identificó la intensidad del dolor como el factor individual más importante con poder predictivo para la supervivencia global. Tres subpoblaciones han surgido de acuerdo con los siguientes criterios:

- "Dolor": VAS >20
- "Sin dolor, sin morfina": VAS <5
- "Dolor por debajo de la mediana": VAS = [5-20]

La estratificación según estas subpoblaciones mostró que para los pacientes que recibieron placebo más gemcitabina (es decir, gemcitabina como agente único) la mediana de SG fue de 15,4 meses en la subpoblación "sin dolor, sin morfina" en comparación con 5,4 meses en la subpoblación de "dolor", correspondiente a una diferencia de 10,0 meses en la mediana de SG entre estas dos subpoblaciones. En contraste, el tratamiento con masitinib más gemcitabina demostró prolongar significativamente la mediana de supervivencia global en la subpoblación de "dolor" con una mediana de SG de 8,1 meses, y una tasa de riesgo de 0,61 (95% IC [0,42; 0,88]), lo que significa que el riesgo de la muerte se reduce en un 39% en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina en comparación con el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina (valor de p = 0,01). La tasa de riesgo se invirtió en la subpoblación "sin dolor, sin morfina", siendo 1,63 (IC 95% [0,94; 2,85]) con un valor de p de 0,041. Por lo tanto, de acuerdo con el factor predictor de la intensidad de dolor, y en ausencia de cualquier otro factor predictor independiente, es desaconsejable dicho tratamiento de los pacientes en la subpoblación "sin dolor, sin morfina".

En resumen, nuestro análisis ha llevado al descubrimiento de que la intensidad de dolor es fuertemente predictiva para la supervivencia global en pacientes con cáncer pancreático. La combinación del tratamiento con masitinib más gemcitabina ha demostrado ser eficaz en la subpoblación definida por al menos una ocurrencia reportada de un puntaje de intensidad de dolor en una escala de intensidad visual análoga (VAS) mayor que 20 (por ej. VAS > 20 mm medida en una escala de 100 mm o 20%). Esta subpoblación tiene el pronóstico más pobre en la supervivencia global y, por lo tanto, una necesidad médica no satisfecha muy alta. En la subpoblación de "dolor", que representa aproximadamente el 43,9% de los pacientes, la mediana de SG fue de 5,4 meses con placebo más gemcitabina, mientras que fue de 15,4 meses en la subpoblación "sin dolor, sin morfina" y 6,4 meses en la población "dolor por debajo de la mediana". El tratamiento con masitinib más gemcitabina mejoró significativamente la supervivencia global en la población "dolor": la mediana de SG fue de 8,1 meses en comparación con 5,4 meses en el brazo de tratamiento con placebo y gemcitabina (valor p =

0,010). La tasa de riesgo fue de 0,61 (IC del 95% de [0,42; 0,88]), lo que demuestra que el riesgo de muerte disminuyó en un 39% con masitinib más gemcitabina en comparación con el brazo de tratamiento control. Las tasas de supervivencia global a los 12, 18 y 24 meses fueron, respectivamente, del 32%, 18% y $\leq 6,4\%$ en comparación con el 18%, 8% y $\leq 2,0\%$ en el brazo de tratamiento con placebo más gemcitabina.

5 EJEMPLO 2: Análisis genómicos del estudio AB07012 para investigar los criterios predictivos de eficacia

Se realizó un estudio farmacogenómico auxiliar para definir los criterios predictivos de eficacia a partir de los datos genómicos. Es decir, la identificación de genes que fueron regulados negativamente o regulados positivamente en un subconjunto aleatorizado de pacientes con cáncer pancreático tomados del estudio
 10 AB07012, y que podrían correlacionarse con la supervivencia global y el beneficio clínico del tratamiento en investigación. Los principales hallazgos de este estudio auxiliar con respecto al tratamiento de una subpoblación de pacientes definida mediante factores predictores de la expresión génica se presentan anteriormente en la sección "Descripción de la invención". Aquí, se proporcionan detalles adicionales o complementarios sobre las técnicas utilizadas.

15 *Protocolo de Skuldtech para análisis de expresión génica*

Los análisis genómicos que consisten en el análisis transcriptómico global de muestras de células de sangre periférica recogidas antes del tratamiento con masitinib usando un método de alto rendimiento y secuenciación de nueva generación (realizada por triplicado independientemente) se realizaron por Skuldtech (Montpellier, Francia). La identificación de genes cuya expresión se correlacionó con la supervivencia global y el tipo de
 20 tratamiento se basó en un proceso de múltiples etapas. A continuación se presentan extractos tomados del protocolo de Skuldtech (etapas 1 a 7), seguidos de una discusión general sobre ciertos aspectos metodológicos para la expresión génica diferencial.

1. Recolección y manipulación de muestras:

- Se recibieron y almacenaron a -80°C muestras de sangre total de pacientes en tubos de PAXgene en
 25 hielo seco (expedidor: LabConnect, EE. UU.).
- Los tubos recogidos pertenecen a 119 pacientes antes del tratamiento y se denominan Semana 0.
- Se extrajo el ARN total de las muestras de sangre de 119 pacientes antes del tratamiento, y se nombró a la semana 0. El análisis del transcriptoma (investigación de biomarcadores) se realizó solo en este momento.
- 30 - Se analizaron todas las 119 muestras de ARN. Si algunas muestras recibidas no eran elegibles para el análisis debido a material de calidad insuficiente, no se utilizaron.
- Se realizaron experimentos de expresión génica digital (DGE, por sus siglas en inglés) para seleccionar un conjunto de biomarcadores putativos.
- La validación de biomarcadores se realizó mediante PCR en Tiempo Real en la plataforma COBAS
 35 (LC480, ROCHE Diagnostics) y se utilizaron enfoques bioestadísticos apropiados para filtrar los mejores biomarcadores.

2. Muestras de ARN:

- Se extrajeron 119 muestras de ARN sanguíneo correspondientes a muestras de sangre iniciales, a partir de sangre (tubos de recogida de sangre PAXgene, BD) utilizando el kit PAXgene Blood RNA V.2
 40 (PreAnalytix) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- El control de la integridad del ARN se realizó con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.) utilizando Eukaryotic Total RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies). La cantidad de ARN

fue controlada usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Los ARN purificados fueron conservados a -80°C

3. Construcción de la biblioteca DGE y mapeo *tag-a-gene*:

Se construyeron doce bibliotecas de expresión génica digital (DGE) a partir de muestras de ARN de sangre combinada de pacientes. Para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento (es decir, Placebo/Gemcitabina P o Masitinib + Gemcitabina M y muertos antes del mes 4, M4, o vivos después del mes 15, M15), se construyeron tres bibliotecas DGE usando las mismas muestras de ARN sanguíneo (tres replicados técnicos). Las bibliotecas se construyeron con el kit de perfiles de etiquetas DGE de Illumina de acuerdo con el protocolo del fabricante (versión 2.1B), utilizando 5 µg de ARN total (cantidades iguales de ARN en el conjunto entre cada muestra de ARN). El análisis de secuenciación y las llamadas de base se llevaron a cabo utilizando Illumina Pipeline, y se obtuvieron etiquetas de secuencia después del filtrado para pureza. La plataforma utilizada es MGX (Montpellier, Francia). Los datos de cada biblioteca DGE se analizaron con el software BIOTAG (Skuldtech, Montpellier, Francia) para la detección de etiquetas, conteo de etiquetas y para evaluar la calidad de la biblioteca DGE (Piquemal D, y col., Genomics, 2002 Sep; 80 (3): 361-71)

4. Anotación y selección de etiquetas:

Se generó una base de datos local que compila secuencias de homo sapiens e información relacionada a partir de secuencias bien anotadas de clústeres UniGene (Built # 232, marzo de 2012, NCBI). Para cada secuencia de esta base de datos, se extrajeron la etiqueta DGE esperada (etiqueta canónica) ubicada aguas arriba del sitio de restricción NlaIII más cercano a 3' (CATG) de la secuencia (R1), así como etiquetas putativas ubicadas en posiciones internas (etiquetadas como R2, R3 y R4 comenzando desde el extremo 3' del transcripto) (Piquemal D, y col., Genomics, 2002 Sep; 80 (3): 361-71). Las etiquetas experimentales obtenidas de las bibliotecas DGE se emparejaron y anotaron (coincidencias exactas para los 17 pb) utilizando esta colección de etiquetas virtuales. En primer lugar, se buscó una correspondencia para cada etiqueta experimental con las etiquetas canónicas virtuales (R1). Luego, se anotaron etiquetas experimentales sin aparear con las etiquetas R2, luego con R3 y R4. Los análisis de los experimentos de DGE se llevaron a cabo utilizando el método edgeR (versión 2.6.9, Bioconductor).

5. Síntesis de ADNc para PCR en Tiempo Real:

Se llevaron a cabo transcripciones inversas para cada uno de los 119 ARN en 20 µl de volumen de reacción final con 300 ng de ARN total usando 200 unidades de enzima SuperScript II (M-MLV RT Type, Invitrogen) y 250 ng de cebadores aleatorios de acuerdo con las instrucciones del fabricante (25°C durante 10 min, 42°C durante 50 min, 70°C durante 15 min), el mismo día con el mismo juego de pipetas y el mismo manipulador.

6. PCR en Tiempo Real:

La validación de los genes diana se realizó en la plataforma PCR en Tiempo Real (qPCR) de Roche Diagnostics. Los experimentos de qPCR se llevaron a cabo utilizando LightCycler® 1536 DNA Green Master Kit y RealTime ready DNA Probes Master Kit (Roche Diagnostics) en el aparato Roche Diagnostics LightCycler1536® qPCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para los ensayos de Sybr Green, la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 2 µl de la siguiente manera: 0,4 µl de LightCycler 1536 DNA Green Master 5X (Roche), 0,1 µl de Bright Green 20X (Roche), 0,1 µl de Setup Control 20X (Roche), 0,04 µl de pares de cebadores 50 µM (Eurogentec), 0,36 µl de agua libre de DNAsa y RNAsa y 1 µl de matriz de ADNc (1/50 de dilución final). Para ensayos de sondas, la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 2 µl de la siguiente manera: 0,4 µl de Real Time Ready DNA Probe

Master 5X (Roche), 0,1 µl de Control Setup 20X, 0,1 µl de cebador directo 4 µM (Eurogentec), 0,1 µl de cebador inverso 4 µM (Eurogentec), 0,1 µl de sonda FAM/TAMRA 4 µM (Eurogentec), 0,2 µl de agua libre de DNAsa y RNAsa y 1 µl de matriz de ADNc (dilución final 1/50). Todas las etapas de pipeteo se llevaron a cabo con la plataforma automatizada de manejo de líquidos Agilent Bravo. El programa de PCR consiste en una primera etapa de preincubación a 95°C durante 1 minuto seguido de 50 ciclos de PCR (95°C durante 2 segundos, 60°C durante 30 segundos). Para discriminar productos específicos y no específicos y dímeros de cebadores, se obtuvo una curva de fusión por aumento gradual de la temperatura de 60 a 95°C. Los datos de qPCR se analizaron usando el método Delta.Ct (DCt) (Livak KJ y Schmittgen TD. *Methods*, 2001 Dic; 25 (4): 402-8). Los valores de DCt se determinaron para todos los genes diana restando los valores de Ct de la media de los valores de Ct de los dos genes de referencia (mantenimiento). Los dos genes de mantenimiento fueron B2M (NM_009735, *Mus musculus* beta-2 microglobulina, ARNm) y GAPDH (NM_002046, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, transcripto variante 1, ARNm + NM_001256799 *Homo sapiens* gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, transcripto variante 2, ARNm).

7. Perfiles transcriptómicos:

Usando el método de Expresión Génica Digital (DGE), se llevaron a cabo los perfiles transcriptómicos de la sangre total de los pacientes y se seleccionaron 169 genes con el método edgeR como genes expresados diferencialmente entre respondedores buenos y malos de masitinib. Los genes analizados se seleccionaron de acuerdo con (i) filtros matemáticos con el mayor cambio diferencial ($> 1,5$), el criterio de valor p ajustado por FDR ($< 10\%$) basado en el error de tipo I ($\alpha = 5\%$) y (ii) filtros biológicos con participación de genes diana en procesos específicos y rutas metabólicas conocidas. En un ensayo de PCR en Tiempo Real, se detecta una reacción positiva mediante la acumulación de una señal fluorescente. El Ct (umbral de ciclo) se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, exceda el nivel de fondo). Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra (es decir, cuanto menor es el valor de Ct, mayor es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra).

25 *Metodología para la identificación de factores predictores de la expresión génica de la supervivencia global*

Los objetivos de este estudio auxiliar fueron revelar: (i) biomarcadores predictivos de supervivencia prolongada (es decir, aumento de la SG) para pacientes tratados con masitinib más gemcitabina en comparación con pacientes tratados con placebo y gemcitabina; (ii) biomarcadores predictivos de muerte temprana (es decir, disminución de la SG) para pacientes tratados con masitinib más gemcitabina en comparación con pacientes tratados con placebo más gemcitabina. Este análisis midió simultáneamente el nivel de expresión de un gran número de genes en muestras de células de sangre periférica recolectadas antes del tratamiento con masitinib de 119 pacientes del estudio AB07012 (proporción 1:1 de masitinib más gemcitabina y pacientes tratados con placebo más gemcitabina). Se utilizó el PAXgene™ Blood RNA System para recolectar una muestra de sangre de pacientes y aislar el ARN (ácido ribonucleico), empacar en hielo seco para su envío y almacenar a -80°C. Los tubos de PAXgene están aprobados por la FDA (i.d. K042613). Las muestras analizadas se tomaron una sola vez en la semana 0 (línea de base).

En general, la expresión génica diferencial presenta varios desafíos en términos de reproducibilidad y detección de patrones de expresión génica verdaderamente novedosos. Por ejemplo, el análisis de muestras de ARN sanguíneo está sujeto a varios errores debido a la variabilidad experimental e interindividual. Además, la preselección de genes de interés podría verse obstaculizada por la necesidad de un conocimiento preexistente del transcriptoma. Las siguientes medidas fueron adoptadas por Skuldtech para abordar estos problemas y garantizar la reproducibilidad óptima:

- El uso del sistema de recolección de ARN sanguíneo PAXgene™ evita la degradación del ARN y las diferencias en la calidad de la muestra debido a los diferentes estándares de recolección entre los sitios.
 - Se tuvo en cuenta la variabilidad de expresión inherente a genes específicos e interindividuales a través del análisis de edgeR Bioconductor y la agrupación de muestras de ARN.
- 5 - La metodología DGE no se basa en un conocimiento preexistente del transcriptoma de interés y, por lo tanto, puede aplicarse a cualquier grupo de pacientes de interés.
- Para el experimento qPCR, se utilizó la plataforma del estado del arte actual, que cumple con los estándares de la industria y la investigación.

La primer etapa analítica involucró un análisis completo de DGE, realizado utilizando la metodología de edgeR [http://www.bioconductor.org/packages/2.9/bioc/html/edgeR.html]. En una segunda etapa analítica, se realizó un análisis de 2^{-ddCt} (2 exp -Delta Delta Cycle Threshold – Umbral de Ciclo Delta) usando el paquete R ddCt en el experimento de PCR en Tiempo Real, [www.bioconductor.org/packages/2.9/bioc/html/ddCt.html]. Este análisis se utilizó para establecer el punto de corte diferencial para evaluar si un gen seleccionado cumplirá las propiedades clínicas y técnicas clásicas. En este estudio, cada gen de interés se amplificó mediante qPCR y se determinó un parámetro resultante denominado Delta Cycle Threshold (DCt – Umbral de Ciclo Delta) después de la normalización individual para cada gen y para cada paciente, proporcionando así el nivel de expresión de un gen dado en un paciente dado. La normalización de los valores de Ct se logró utilizando dos genes de referencia (mantenimiento) (B2M, GAPDH), que mostraron una expresión estable en el análisis de DGE en todas las muestras de ARN sanguíneo. Los DCt se definen para cada gen bajo investigación al restar los valores de Ciclo Umbral (Ct) de la media geométrica de los valores de Ct de los genes de referencia. Los valores de DCt son inversamente proporcionales al nivel de expresión génica; por lo tanto, en el caso de genes regulados positivamente un valor de DCt menor indica un mayor nivel de expresión, mientras que en el caso de genes regulados negativamente, un valor de DCt más alto indica un nivel de expresión más bajo.

El método DGE (Digital Gene Expression) utilizado en este estudio es un enfoque de secuenciación de alto rendimiento para el análisis transcriptómico. Este enfoque proporciona una medida digital de la abundancia de ARN representada por los recuentos de lecturas (*reads*) de secuencias en una región de interés en oposición a una señal analógica, indirecta de microarreglos. Además, tiene un rango dinámico más amplio, y no depende de tener conocimiento preexistente sobre el transcriptoma en estudio. Por lo tanto, este enfoque tiene la capacidad de detectar exhaustivamente nuevas transcripciones y variantes de ARNm resultantes de usos alternativos del promotor, sitios punto de corte y empalme y poliadenilación.

Las bibliotecas de DGE se generaron con ARNm aislado usando selección de poli-A a partir del ARN total. La posterior construcción de bibliotecas se realizó con el kit de perfiles de etiquetas DGE de Illumina (San Diego, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante (versión 2.1B). En resumen, los ARN se cebaron aleatoriamente para la transcripción inversa seguida de la síntesis de la segunda hebra para crear fragmentos de ADNc bicatenario. A continuación, se extrajeron etiquetas específicas de 21 pb para cada uno de los ARN. Las etiquetas fueron aisladas, los adaptadores específicos fueron ligados y luego se siguió mediante amplificación por PCR. Las bibliotecas fueron secuenciadas por la plataforma de secuenciación de ADN de Illumina (San Diego, EE. UU.). Debido a que DGE proporciona valores absolutos y no requiere ninguna calibración con estándares arbitrarios, los resultados se pueden comparar con otros datos generados por laboratorios independientes.

Para descartar desvíos debido a las manipulaciones humanas y el peso de la purificación celular, Skuldtech optó por una lectura directa a partir sangre completa. Por lo tanto, la selección e identificación de

biomarcadores con el enfoque de DGE durante las primeras etapas de este proyecto se realizaron en sangre completa. Finalmente, se implementó una estrategia de combinación (*pooling*), un método frecuentemente utilizado en epidemiología cuando los estudios individuales son demasiado pequeños para permitir una conclusión definitiva. La principal ventaja de la combinación de muestras es su capacidad para identificar el perfil de expresión génica más común/específico y descartar variaciones individuales.

Los ARN fueron transcritos de forma inversa según el protocolo de Roche Diagnostics. Los niveles de expresión génica de biomarcadores putativos fueron investigados por PCR en Tiempo Real, utilizando el LightCycler 480. La expresión de los genes de referencia se cuantificó en cada placa de PCR en Tiempo Real con el fin de evaluar la eficiencia técnica de los experimentos de PCR en Tiempo Real. Se evaluaron las variaciones en los valores de Ct asociados a cada experimento de PCR en Tiempo Real entre los genes de referencia. Los valores de DCt fueron determinados para todos los genes diana restando los valores de Ct de la media geométrica de los valores de Ct de los genes de referencia. Por lo tanto, se construyó una matriz de datos basada en los valores DCt obtenidos de todas las arreglos dinámicos de PCR en Tiempo Real, que posteriormente se utilizaron para todos los ensayos de hipótesis.

Selección de genes de interés e identificación de factores predictores de expresión génica

El análisis de DGE dio como resultado la selección de 169 genes, tomados de una base de datos genómica de 119 pacientes con intención de tratamiento modificados. La selección de estos genes se basó en el impacto de los genes sobre la supervivencia global, por ej. genes asociados con una correlación de la supervivencia global con el tratamiento con masitinib más gemcitabina. Cada uno de los genes seleccionados se amplificó mediante Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativa (qPCR) y se evaluó el nivel de expresión de un gen dado en un paciente determinado después de la normalización individual. El análisis se basó en las variaciones en los valores de Ct asociados a cada experimento de qPCR con respecto a un conjunto de genes de referencia (B2M, GAPDH). Los valores de Delta Ct (DCt) se definieron para cada gen bajo investigación al restar los valores de Ct de la media geométrica de los valores de Ct de estos genes de referencia. Para cada gen se especificaron tres puntos punto de corte: mediana, Q1 (primer cuartil, P25) y Q3 (tercer cuartil, P75). Para cada punto de corte (menos que el punto de corte/más que el punto de corte), el modelo multivariante utilizado para los criterios primarios calcula la tasa de riesgo, la estadística de Chi cuadrado y el valor p del modelo de Cox (uno por gen) para explicar la SG, usó los factores de: brazo de tratamiento, estado del tumor, localización del tumor y nivel de albúmina al inicio del estudio.

Por lo tanto, para cada gen se corrieron siete modelos de Cox diferentes:

- Sin valores DCt punto de corte crudos en el modelo
- valores DCt < mediana
- valores DCt > mediana
- valores DCt < Q1
- valores DCt > Q1
- valores DCt < Q3
- valores DCt > Q3

Si el efecto del brazo de tratamiento fue significativo ($p < 5\%$), se puede concluir que el gen bajo investigación tiene un efecto diferente en la supervivencia dependiendo del brazo de tratamiento. El gen bajo investigación fue seleccionado para el próximo paso si $p < 5\%$. Se seleccionaron un total de 37 combinaciones de genes/punto de corte que consisten en 17 genes diferentes.

Para cada uno de los 17 genes seleccionados de las etapas anteriores, se utilizó el mismo modelo multivariante para cada combinación y cada punto de corte. Por lo tanto, para cada gen se corrieron siete modelos de Cox diferentes. La regla aplicada fue que la subpoblación creada por la combinación debe contener más de 40 pacientes (1/3 de la muestra total):

- 5 Estas diferentes combinaciones fueron clasificadas de acuerdo con el poder discriminatorio de la combinación medida por el valor p del ensayo Chi-cuadrado proporcionado en el modelo de Cox. Las seis combinaciones más significativas (valores de $p < 0,01$) se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4. Combinaciones de genes duales seleccionados de interés y puntos de corte

Población		
(1) ACOX1 \leq 3,05	y	TNFRSF10B \leq 6,1
(2) RPS23 $>$ 0,35	y	ACOX1 \leq 3,05
(3) ABCC3 \leq 4,3	y	LYN \leq 1,65
(4) HIF1A \leq 3,95	y	TNFRSF10B \leq 5,65
(5) ABCC1 $>$ 3,5	y	IGJ $>$ 7,05
(6) UBE2H $>$ 3,7	y	PARP2 $>$ 7,1

- 10 Para finalizar la huella digital genética global más inclusiva, se eligió primero la combinación de genes duales más significativa y luego se registró la siguiente información: número de pacientes en la subpoblación, tasa de riesgo; valor p del modelo de Cox. A continuación, se agregó otra combinación de genes duales para aumentar el tamaño de la muestra y también el poder de los análisis. Se registró la misma información que arriba. El proceso de selección se detuvo cuando no se agregaron (o se agregaron pocos) pacientes adicionales al tamaño de la muestra después de la adición de una nueva combinación, con la condición previa de que se mantuvo la tasa de riesgo y/o el valor de p. La Tabla 5 resume el proceso de selección.

15
20 Tabla 5. Combinaciones de genes duales con impacto estadísticamente significativo en la SG con respecto al brazo de tratamiento. En negrita se muestran las combinaciones de genes duales más discriminatorias correspondientes a seis factores de predicción de expresión génica y denominados colectivamente subpoblación de "huella digital genética".

Población	N	HR	valor p
(1) ACOX1 \leq 3,05 y TNFRSF10B \leq 6,1	31	0,19	<0,01
(2) RPS23 $>$ 0,35 y ACOX1 \leq 3,05	35	0,20	<0,001
(3) ABCC3 \leq 4,3 y LYN \leq 1,65	37	0,19	<0,001
(4) HIF1A \leq 3,95 y TNFRSF10B \leq 5,65	40	0,19	<0,001
(5) ABCC1 $>$ 3,5 y IGJ $>$ 7,05	52	0,19	<0,0001
(6) UBE2H $>$ 3,7 y PARP2 $>$ 7,1	56	0,192	<0,00001

El proceso fue detenido después de seis combinaciones. Entre los pacientes identificados como portadores de GBM, algunos fueron marcados en ambas repeticiones (45 pacientes), algunos fueron marcados por duplicado

1 pero no marcados por duplicado 2 (11 pacientes), algunos fueron marcados por duplicado 2 pero no marcados por duplicado 1 (10 pacientes). Así, la subpoblación final comprende un total de 66 pacientes (= 45 + 11 + 10). La selección final de combinaciones de genes duales que constituyen un conjunto de "factores predictores de expresión génica" (denominados colectivamente como la "huella digital genética"). Estos factores predictores de expresión génica son: ACOX1 \leq 3,05 y TNFRSF10B \leq 6,1; RPS23 $>$ 0,35 y ACOX1 \leq 3,05; ABCC3 \leq 4,3 y LYN \leq 1,65; HIF1A \leq 3,95 y TNFRSF10B \leq 5,65; ABCC1 $>$ 3,5 e IGJ $>$ 7,05; UBE2H $>$ 3,7 y PARP2 $>$ 7,1.

Los umbrales de DCt como se definieron anteriormente representan la huella digital genética global más inclusiva para distinguir una subpoblación diana. Sin embargo, es posible encontrar umbrales óptimos en la proximidad de estos puntos de corte, por ejemplo, al 55% en lugar de la mediana. Además, los umbrales definidos anteriormente se toman de una cohorte de pacientes particular (n = 119) que puede considerarse como representativa de una población general de cáncer, sin embargo, se debe esperar que dada una cohorte diferente, los puntos de corte óptimos varíen ligeramente, ya que ésta es solo una muestra representativa de la población global. Por lo tanto, para la definición de los puntos de corte relacionados con estos factores predictores de expresión génica, debe entenderse que aquí se incluyen ligeras modificaciones; por ejemplo, \pm 10% de los puntos de corte establecidos, o incluso \pm 25% de los puntos de corte establecidos.

Tomados en conjunto, estos seis factores predictores de expresión génica definen una subpoblación de pacientes que tiene una mayor probabilidad de respuesta terapéutica positiva al tratamiento con masitinib en términos de supervivencia prolongada. Esta subpoblación puede ser interpretada generalmente como la subpoblación de "huella digital genética" para el tratamiento con masitinib en el cáncer. Por lo tanto, todos los análisis (línea de base, eficacia y seguridad) se realizaron en la subpoblación de "huella digital genética" (es decir, aquellos pacientes identificados como que tienen al menos uno de los factores predictores de expresión génica positivos). Además, también se realizó un análisis de eficacia en la subpoblación que fue negativa para los factores predictores de expresión génica (es decir, la subpoblación de "huella digital no genética").

Evaluación de la eficacia clínica del estudio AB07012 de acuerdo con factores predictores de expresión génica

Considerando la cohorte completa de pacientes con información genómica disponible (n = 119; 60 pacientes con masitinib y 59 con placebo), la mediana de SG fue de 7,7 meses en ambos brazos de tratamiento y la tasa de riesgo de muerte fue de 0,89 [0,60; 1,31] con un valor de p de 0,55. Por lo tanto, no se pueden extraer conclusiones con respecto a los efectos beneficiosos o perjudiciales del tratamiento con masitinib en esta subpoblación sin análisis adicionales según la expresión génica.

La SG fue analizada en la subpoblación identificada como portadora de al menos uno de los factores predictores de expresión génica, a los que en lo sucesivo denominaremos "huella digital genética" o subpoblación "huella digital transcripcional" (66 pacientes), y en su contraparte, es decir, pacientes que no presentan cualquiera de los factores predictores de expresión génica, a los que se hará referencia en lo sucesivo como la subpoblación "huella digital no genética" o "huella digital no transcripcional" (53 pacientes).

La Tabla 6 muestra la mediana de la SG y las estimaciones de la tasa de supervivencia calculadas a través de análisis univariante y multivariante para la subpoblación de "huella digital genética" según el brazo de tratamiento.

Tabla 6 - SG da como resultado la subpoblación de "huella digital genética"

Brazo de tratamiento	N	valor p*	Tasa riesgo [95%IC]	Mediana de SG [95% IC] (meses)	Tasas de SG [95% IC] (%)			
					M6	M12	M18	M24
Análisis univariante								
M+G	34	0,0000019	0,22 [0,12; 0,40]	11,7 [8,6;17,1]	78,8 [66,7;93,2]	48,6 [32,8;74,8]	15,8 [7,1;45,4]	10,6 [4,1; 39,0]
P+G	32			5,3 [3,9; 8,6]	36,7 [21,7; 67,4]	7,5 [2,6; 35,8]	0,7 [0,1; 19,1]	0,3 [0,0; 16,3]
Análisis multivariante								
M+G	34	0,00000056	0,17 [0,09; 0,33]	12,9 [8,7;17,1]	78,7 [67,5; 93,5]	52,5 [38,0;76,8]	18,3 [9,1;44,8]	12,6 [5,7;36,9]
P+G	32			4,7 [3,7; 8,3]	31,8 [19,0; 61,8]	7,4 [3,1; 30,7]	0,8 [0,1; 20,6]	0,3 [0,0; 17,8]

M + G: masitinib más gemcitabina; P + G: placebo más gemcitabina; NR: no alcanzado; * log-rank

- En el modelo univariante, los pacientes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina tuvieron una SG media de 11,7 meses versus 5,3 meses en pacientes que recibieron placebo más gemcitabina.
- Esta diferencia fue aún más pronunciada en el modelo multivariante, con una mediana de SG de 12,9 versus 4,7 meses, respectivamente. Después del ajuste por diferencias en las características iniciales, la diferencia en la mediana de SG demostró ser estadísticamente significativa (valor $p < 0,00001$) con una tasa de riesgo de muerte (definida como la probabilidad de muerte bajo masitinib más gemcitabina sobre la probabilidad de muerte bajo placebo más gemcitabina) de 0,22 con un intervalo de confianza del 95% de [0,12; 0,40]. Por lo tanto, los pacientes en la subpoblación de "huella digital genética" tienen una disminución del 78% en el riesgo de muerte cuando se los trata con la combinación de masitinib más gemcitabina en comparación con gemcitabina sola. Considerando el peor escenario posible del límite del intervalo de confianza más alto, es decir, 0,40, el riesgo de muerte para los pacientes en la subpoblación de "huella digital genética" aún se redujo en un 60% cuando se trató con masitinib más gemcitabina. Las estimaciones de Kaplan-Meier para pacientes que presentan la "huella digital genética" identificada se muestran en la Figura 7. La ventaja terapéutica del tratamiento con masitinib más gemcitabina sobre placebo más gemcitabina se ve claramente en el modelo multivariante, en el que la probabilidad de supervivencia de masitinib más gemcitabina es consistentemente más alta.
- La Tabla 7 muestra la mediana de la SG estimada y la tasa de supervivencia para la subpoblación de "huella digital no genética". Las estimaciones de Kaplan-Meier para los pacientes que se presentan sin la "huella digital genética" identificada se muestran en la Figura 8.

Tabla 7 - SG da como resultado subpoblación "huella digital no genética"

Brazo de tratamiento	N	valor p*	Tasa riesgo [95%IC]	Mediana de SG [95% IC] (meses)	Tasas de SG [95% IC] (%)			
					M6	M12	M18	M24
Univariate analysis								
M+G	26	0,0000082	5,00 [2,44; 10,25]	4,8 [4,2; 14,4]	40,0 [25,0; 76,3]	10,8 [3,6;53,0]	3,3 [0,6;42,1]	≤0,1** [0,0; 35,9]
P+G	27			14,4 [8,8; 23,3]	81,0 [68,0;97,0]	53,0 [38,1;86,8]	34,7 [20,0;73,3]	≤9,3** [3,3; 46,2]
Multivariate analysis								
M+G	26	0,000036	4,24 [2,11; 8,52]	5,6 [4,3; 11,5]	45,2 [29,3; 76,2]	12,5 [4,4; 46,3]	3,6 [0,7; 30,5]	≤0,1** [0,0; 20,4]
P+G	27			13,2 [8,4; 23,0]	79,6 [68,3; 96,6]	53,8 [37,4; 85,0]	33,0 [18,5; 70,2]	≤6,9** [2,3; 38,1]

M + G: masitinib más gemcitabina; P + G: placebo más gemcitabina; NR: no alcanzado; * log-rank

En el modelo univariante, los pacientes en el brazo de tratamiento con masitinib más gemcitabina tuvieron una mediana de SG de 4,8 meses en comparación con 14,4 meses en los pacientes que recibieron placebo más gemcitabina. En el modelo multivariante, la mediana de SG fue de 5,6 y 13,2 meses, respectivamente. La diferencia en la mediana de SG fue estadísticamente significativa (valor p = 0,00001) con una tasa de riesgo de muerte (definida como la probabilidad de muerte bajo masitinib más gemcitabina sobre la probabilidad de muerte bajo placebo más gemcitabina) de 4,24 con un intervalo de confianza del 95% de [2,11; 8,52] en el modelo multivariante. Por lo tanto, el riesgo de muerte para pacientes que no pertenecen a la subpoblación de "huella digital genética", es decir, que no alberga al menos un factor predictor de expresión génica, es mayor cuando se trata con la combinación de masitinib más gemcitabina en comparación con gemcitabina sola. Por lo tanto, en ausencia de cualquier otro factor predictor positivo, es desaconsejable dicho tratamiento de pacientes en la subpoblación "huella digital no genética".

15

Finalmente, se observó que no existía correlación dentro de la cohorte de pacientes con datos genómicos con su estado de intensidad de dolor de VAS inicial, es decir, con respecto al factor predictor de intensidad de dolor. Esto fue cierto para la cohorte genómica completa (población global), así como para las subpoblaciones de "huella digital genética" y "huella digital no genética". En conexión con la presente invención, parecería que, sin querer limitarse a la teoría, esto se debe al parámetro de la intensidad del dolor que requiere un tamaño de muestra de población mayor para ser estadísticamente distinguible o porque los factores predictores de intensidad del dolor y expresión génica actúan a través de mecanismos independientes de la progresión de la enfermedad. En este último caso, es bastante factible que un paciente determinado sea positivo para un factor predictor pero negativo para otro y para que el tratamiento con masitinib sea aún de beneficio terapéutico; no hay contradicción aparente.

25

Por lo tanto, en la subpoblación de "huella digital genética", que representa aproximadamente el 55,5% de los pacientes, la mediana de SG fue de 4,7 meses con placebo más gemcitabina, mientras que fue de 13,2 meses en la subpoblación de "huella digital no genética". Por lo tanto, hasta la fecha, los pacientes con la "huella digital genética" definida al inicio del estudio son los que tienen el peor pronóstico en términos de supervivencia global cuando reciben el tratamiento estándar para cáncer pancreático de monoterapia con gemcitabina y, por lo tanto, tienen la mayor necesidad médica no satisfecha. El tratamiento con masitinib más gemcitabina mejoró significativamente la supervivencia global en la subpoblación de "huella digital genética": la mediana de SG fue de 12,9 meses en comparación con 4,7 meses en el brazo de tratamiento con placebo y gemcitabina (valor de $p = 0,00000056$). Las tasas de supervivencia global a los 12, 18 y 24 meses fueron respectivamente, 52,5%, 18,3% y 12,6% en pacientes que recibieron masitinib más gemcitabina versus 7,4%, 0,8% y 0,3% en pacientes tratados con placebo más gemcitabina. La tasa de riesgo fue 0,17 (IC del 95% de [0,09; 0,33]), lo que sugiere que el riesgo de muerte disminuyó en un 83% para los pacientes que recibieron masitinib más gemcitabina en comparación con el brazo de tratamiento control de placebo más gemcitabina.

En conclusión, los factores predictores definidos anteriormente de intensidad de dolor y expresión génica fueron factores independientes para la supervivencia global deficiente en pacientes con cáncer y, en particular, cáncer pancreático en pacientes humanos, lo que subraya la gran necesidad médica no satisfecha en las subpoblaciones de pacientes de "dolor" y "huella digital genética", como se definió anteriormente. Estos dos factores predictores identifican pacientes que son adecuados para el tratamiento con la combinación de al menos un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de mastocitos o inhibidor de c-Kit, especialmente masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con al menos un agente antineoplásico.

REIVINDICACIONES

1. Masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina para uso en el tratamiento de cáncer pancreático en un paciente humano, en donde dicho paciente es inicialmente seleccionado para tratamiento en base al factor predictor de intensidad de dolor relacionado con la enfermedad, definido como al menos una ocurrencia reportada de un puntaje de una herramienta de evaluación de intensidad de dolor unidimensional mayor que 20%.
5
2. Masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el puntaje de la herramienta de evaluación de intensidad de dolor unidimensional mayor que 20% es un puntaje de intensidad de dolor en la Escala Visual Analógica (VAS) mayor que 20 mm en una escala de 100 mm.
10
3. Masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde masitinib es administrado en una dosis diaria de 4,5 a 12,0 mg/kg/día (mg por kg de peso corporal por día).
4. Masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cáncer pancreático es cáncer pancreático de adenocarcinoma no extirpable.
15
5. Una composición farmacéutica que comprende masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un medicamento que comprende masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un kit que comprende masitinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con gemcitabina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

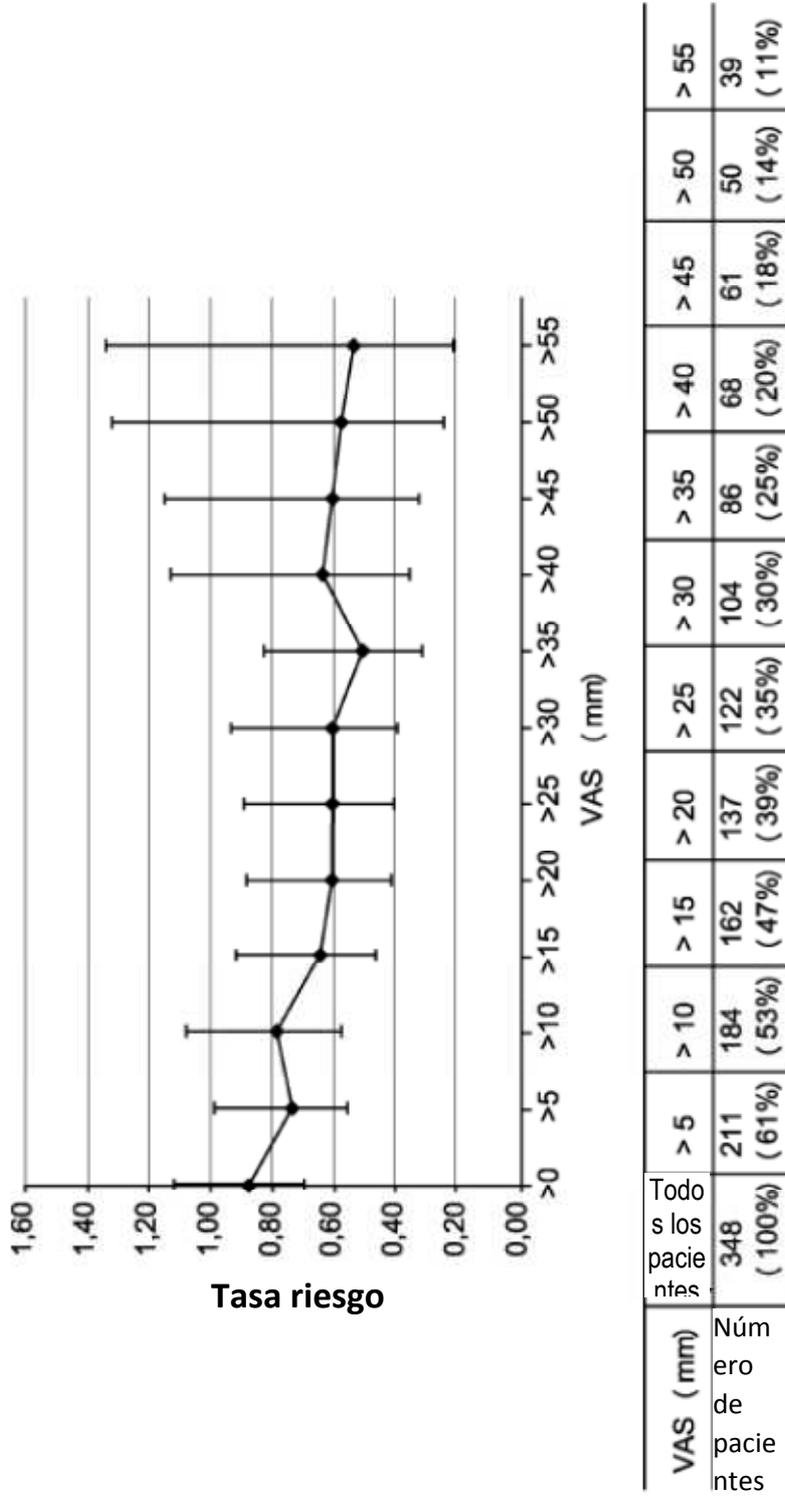


FIG.1

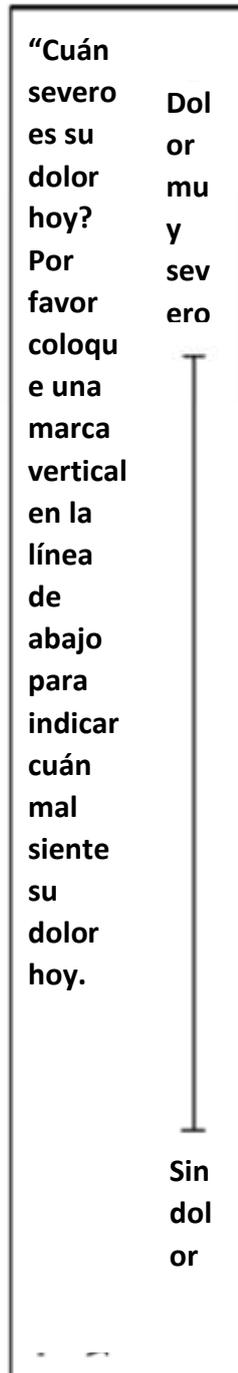


FIG.2

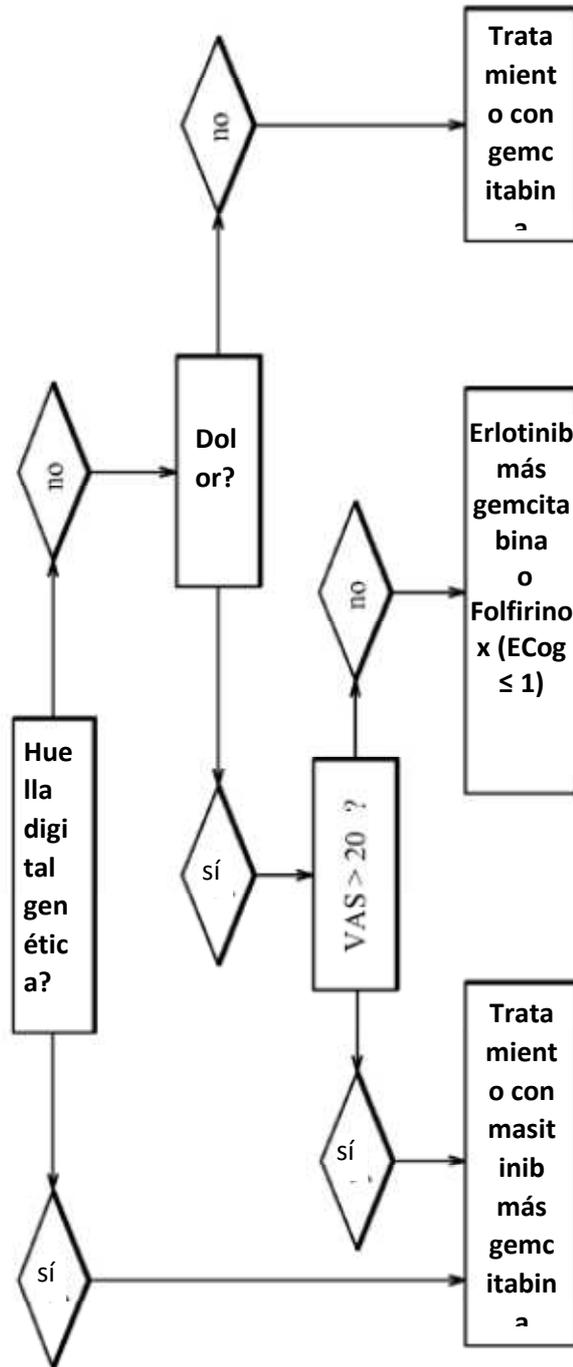


FIG.3

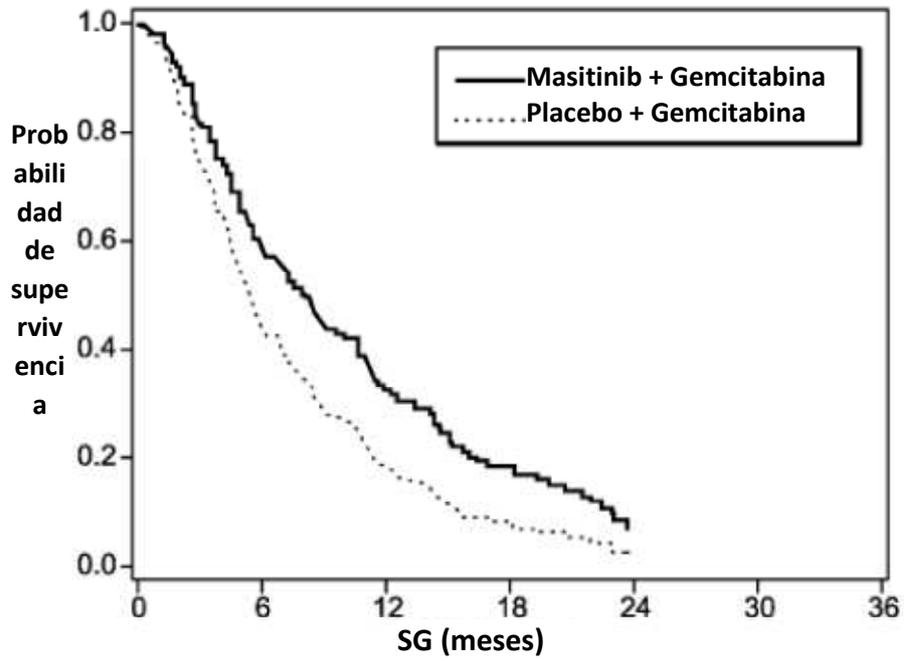


FIG.4

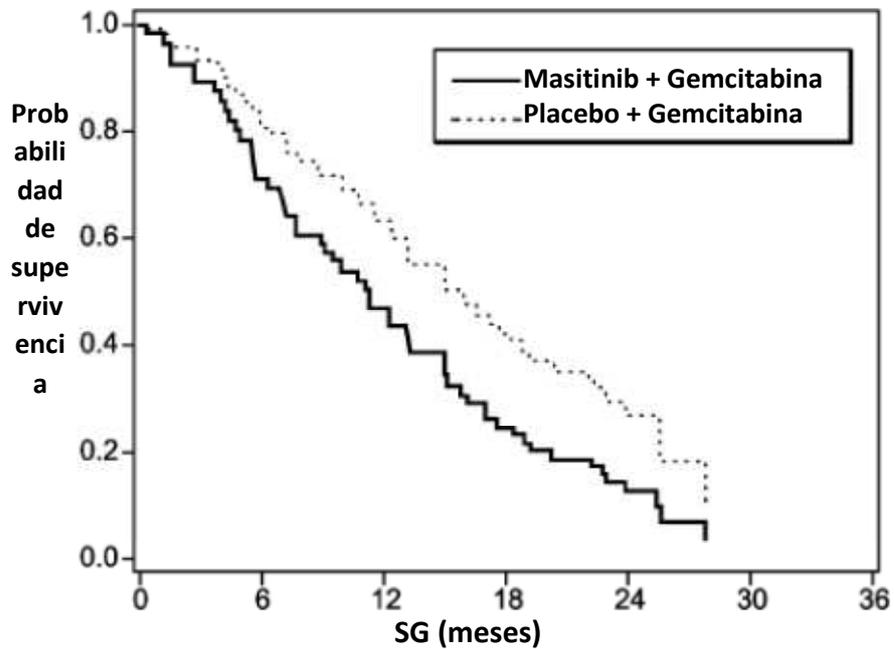


FIG.5

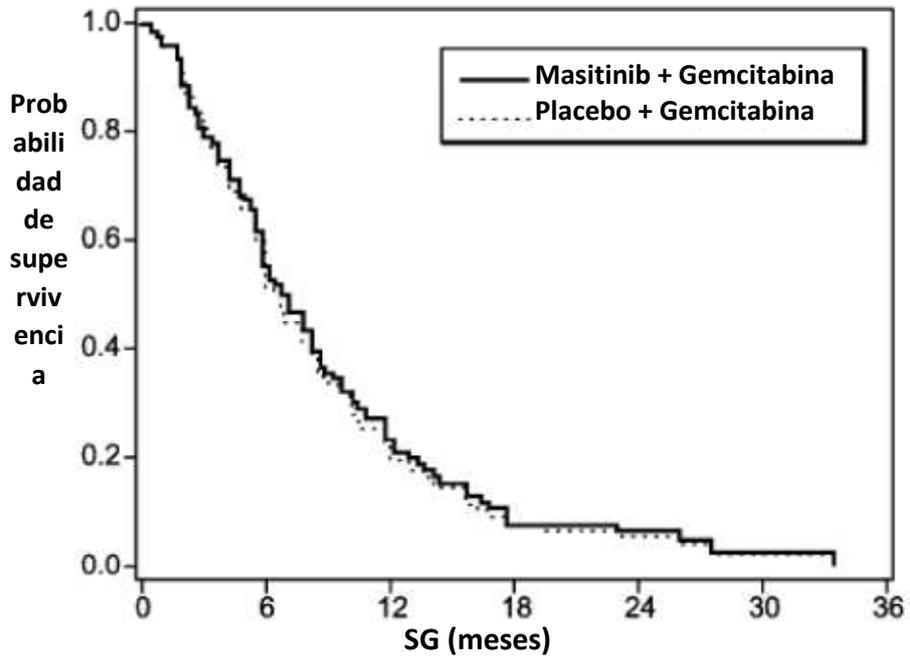


FIG. 6

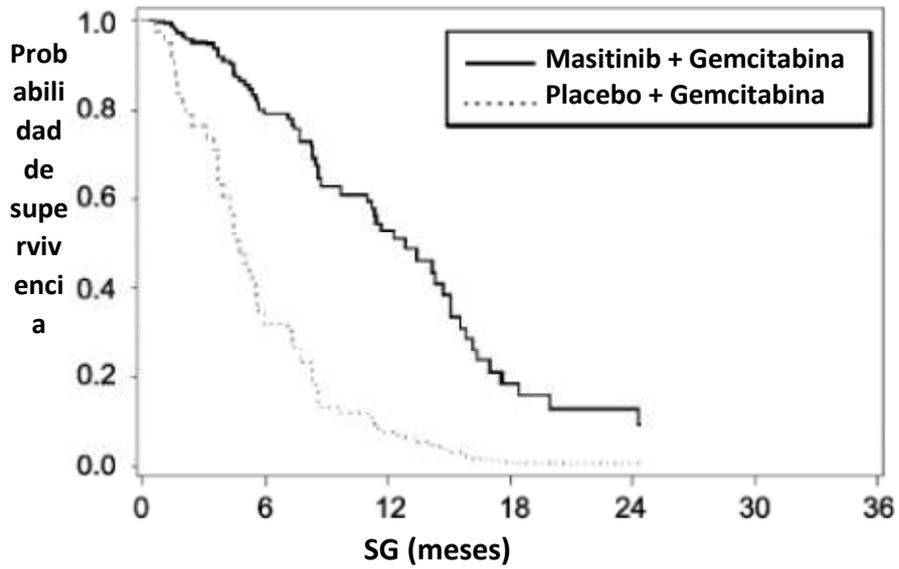


FIG. 7

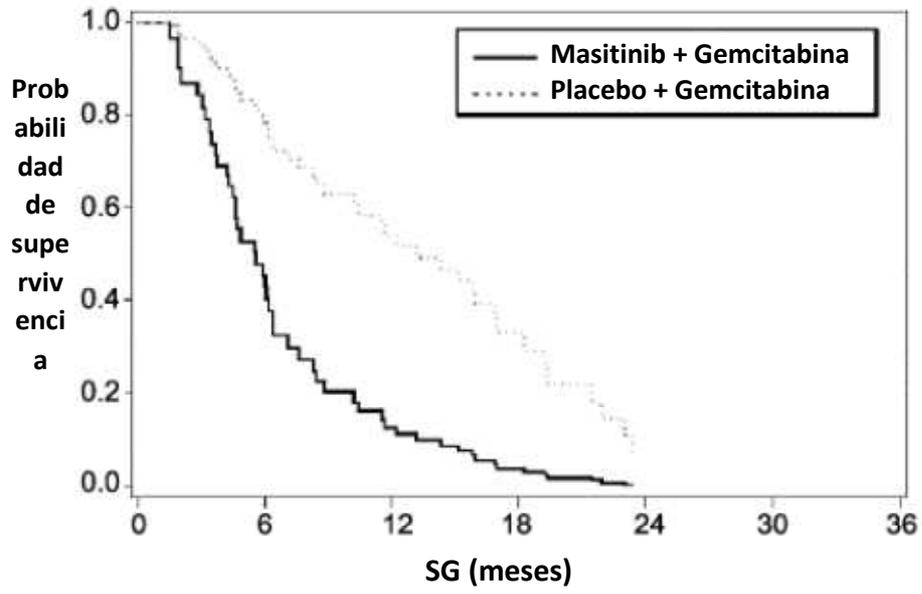


FIG.8