

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 337**

51 Int. Cl.:

G16B 5/00	(2009.01)	C07K 16/28	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)	G16B 20/00	(2009.01)
A61K 39/39	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	A61K 39/395	(2006.01)
A61K 31/203	(2006.01)	A61K 31/495	(2006.01)
A61K 31/21	(2006.01)	A61K 31/506	(2006.01)
A61K 31/34	(2006.01)	A61K 31/55	(2006.01)
A61K 31/382	(2006.01)	A61K 31/551	(2006.01)
A61K 31/4415	(2006.01)		
A61K 31/445	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/AU2015/000458**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16015095**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15827186 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3195168**

54 Título: **Un método para la identificación de combinaciones de inmunoterapia-fármacos usando un enfoque de red**

30 Prioridad:

31.07.2014 AU 2014902956

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2022

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA
(100.0%)
35 Stirling Highway
Nedlands, WA 6009, AU**

72 Inventor/es:

**LESTERHUIS, WILLEM JOOST;
LAKE, RICHARD ANDREW y
BOSCO, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 931 337 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

Un método para la identificación de combinaciones de inmunoterapia-fármacos usando un enfoque de red

Campo técnico

5 Esta divulgación se refiere a sistemas y métodos para evaluar la diferenciación de un conjunto de variables aleatorias discretas entre dos o más afecciones, tales como una afección maligna que responde al régimen de tratamiento y otra que no lo hace. Los sistemas y métodos se refieren más específicamente a la identificación y evaluación de las relaciones entre una pluralidad de genes que se activan o reprimen en una afección maligna que responde al régimen de tratamiento. La invención proporciona la identificación y selección de agentes terapéuticos que fenocopian la red genética de una afección maligna que responde al menos a un agente de bloqueo del punto de control inmunitario. 10 Específicamente, estos agentes terapéuticos funcionan en conjunto con el bloqueo de puntos de control inmunitarios para modular un módulo o submódulo de genes que gobiernan la respuesta al bloqueo de puntos de control inmunitarios. Todavía en otra realización, la invención proporciona la identificación y selección de al menos un agente terapéutico que funciona junto con un agente de bloqueo de puntos de control inmunitarios para modular al menos un gen central en un módulo asociado a la respuesta.

15 Antecedentes de la técnica

Durante las últimas décadas, muchos estudios han identificado eventos oncogénicos y rutas celulares que inician o promueven la formación y progresión del cáncer. Aunque los compuestos orientados a estas rutas se han mostrado inicialmente prometedores y se han desarrollado fármacos eficaces, su beneficio clínico suele ser modesto.

20 El principal inconveniente de usar un solo compuesto orientado a una ruta es la creciente comprensión de que la función y los comportamientos celulares dependen de conjuntos de rutas que interactúan en el contexto de módulos funcionales. Por esta razón, un enfoque más exhaustivo es probar la diferenciación de un conjunto de rutas entre afecciones. Por ello, la comunidad científica ahora está investigando posibilidades para inhibir varias rutas al mismo tiempo.

25 Sorprendentemente, se sabe poco sobre los eventos que ocurren durante la regresión tumoral inducida por la terapia. Como ejemplo, en los últimos años la inmunoterapia contra el cáncer ha tenido bastante éxito, con varios tratamientos novedosos entrando en el uso clínico. Los ejemplos más importantes son ipilimumab, que se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4, y nivolumab, que se orienta al receptor de muerte programada (PD-1).

30 Ipilimumab es el primer fármaco que se ha mostrado que otorga un beneficio de supervivencia general en el melanoma metastásico y están en curso estudios clínicos de fase III del cáncer de pulmón con ambos ipilimumab y nivolumab. Es importante destacar que subconjuntos de pacientes permanecen libres de enfermedad durante muchos años y, por tanto, pueden designarse *curados* por el tratamiento (17 % de supervivencia a 7 años para el melanoma después de ipilimumab). Sin embargo, esto es solo una pequeña minoría de pacientes; la mayoría de los pacientes experimentan progresión de la enfermedad. Aunque algunos estudios investigaron el papel de tipos de células aisladas o moléculas específicas en la respuesta inmunitaria efectora después de anti-CTLA-4, falta un análisis exhaustivo de las células y 35 moléculas efectoras cruciales que curan eficazmente el tumor. Por tanto, se desconoce en gran medida por qué existe esta dicotomía en respuesta a la inmunoterapia anti-CTLA-4. Tampoco se sabe cómo está mediada exactamente la respuesta efectora antitumoral inducida por la inmunoterapia y cómo se puede amplificar aún más para aumentar la eficacia.

40 Aún más sorprendente es el hecho de que no está exactamente claro qué eventos moleculares y celulares ocurren durante la regresión del tumor con el tratamiento clásico de quimioterapia citotóxica. Por ejemplo, el 30 % de los pacientes con cáncer de esófago demuestran una remisión completa del cáncer después del tratamiento con quimiorradioterapia, mientras que el 20 % no tiene ningún efecto aparente del tratamiento, aunque las características clínicas y patológicas de los pacientes y los cánceres parezcan idénticas. Además, de muchos estudios surge la imagen de que el proceso de regresión tumoral inducida por la quimioterapia es muy complejo y no está bien representado en los estudios celulares *in vitro*. Por tanto, sigue siendo enigmático lo que discrimina un tumor 45 respondedor al tratamiento de un tumor no respondedor.

La práctica actual de descubrimiento de fármacos en el cáncer se basa en la suposición de que los mismos procesos moleculares y celulares que desarrollan un cáncer, cuando se combaten, destruirán el cáncer. De hecho, esto se ha mostrado para varios cánceres dependientes de un solo oncogén seleccionados. Este enfoque se basa 50 invariablemente en el análisis de estudios de expresión génica que típicamente se han centrado en la identificación de genes o rutas expresados diferencialmente. Sin embargo, este enfoque es limitado, porque los genes no funcionan de forma aislada, sino en conjunto.

Con el tiempo, ha quedado claro que, en la mayoría de los cánceres, la inhibición terapéutica de las rutas moleculares promotoras de tumores solo conduce temporalmente a la regresión y, a menudo, va seguida de una rápida progresión 55 del cáncer. Esto se debe al hecho de que rutas moleculares que son diferentes de las inhibidas por la terapia pueden asumir su función tumorigénica y, por tanto, permitir que las células cancerosas escapen de la destrucción.

Por lo tanto, se requiere un nuevo enfoque de la forma en que se examinan los datos genotípicos y fenotípicos del cáncer. Un avance significativo en este contexto fue la aplicación de la teoría de gráficos de redes al análisis de datos genómicos. Sin embargo, esta información por sí sola no es suficiente para orientarse a eventos clave que podrían servir como tratamiento en el desarrollo del cáncer.

5 Es en este contexto que se ha desarrollado la presente invención.

Los presentes inventores han buscado abordar las deficiencias en el campo centrándose en los eventos moleculares y celulares asociados con la resolución del cáncer en lugar de su evolución. A través de este enfoque han podido reforzar o imitar aquellos eventos que aumentan las tasas de respuesta a los tratamientos actuales. En el pasado, esto no ha sido posible porque no se observaban regresiones completas en muchos pacientes con cáncer. Recientemente, la inmunoterapia con anticuerpos bloqueadores de puntos de control inmunitarios ha mostrado un éxito notable con curación completa en un pequeño porcentaje de pacientes.

Sumario de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los inventores han implementado el análisis de redes de genes para identificar redes de interacción molecular en animales respondedores y no respondedores a la inmunoterapia contra el cáncer para priorizar los genes principales que potencialmente juegan un papel importante en la eficacia del tratamiento y que son críticos para el equilibrio de la resolución de una afección maligna.

El concepto subyacente es que un sistema biológico funcional puede representarse como una red de genes interconectados. En lugar de centrarse en los niveles de expresión de genes individuales, la ciencia de redes consulta las relaciones de coexpresión entre genes; mediante la búsqueda de pares de genes que se expresan de manera correlacionada (positiva o negativa) en muchas muestras de un conjunto de datos y luego se infiere la conectividad entre los genes. Muchos sistemas interconectados complejos tienen una arquitectura de red "sin escala", lo que significa que la gran mayoría de los nodos están conectados a unos pocos otros nodos, mientras que unos pocos nodos están conectados a muchos nodos, comportándose como centros que dominan los patrones de conectividad y esencialmente "mantienen" la red unida. En particular, los centros son cruciales para el funcionamiento y la persistencia de las redes celulares. Construyendo mapas topológicos de conexiones entre genes y por inferencia, productos génicos, se pueden distinguir subredes (*módulos*) de rutas separadas pero altamente conectadas con funciones comunes. Por tanto, el análisis de redes permite la identificación de módulos y centros que son críticos para el equilibrio de sistemas complejos de cáncer.

Usando este enfoque para consultar las relaciones de coexpresión entre genes expresados en animales que exhiben cánceres respondedores y no respondedores, los inventores han desarrollado un mapa detallado de las redes moleculares que están asociadas con el éxito inmunoterapéutico en ciertos sistemas de cáncer. Usando este enfoque de biología de sistemas, pueden identificar módulos genéticos que gobiernan la respuesta al bloqueo del punto de control inmunológico. Usando estos datos, consultan bases de datos disponibles públicamente de estirpes celulares tratadas con fármacos para identificar fármacos que refuercen los módulos asociados a la respuesta.

La presente invención se refiere a combinaciones terapéuticas que influyen en el bloqueo del punto de control inmunitario y que potencian la respuesta a una afección maligna para usar en el tratamiento de una afección maligna, en particular el mesotelioma como se define en las reivindicaciones adjuntas.

El agente de bloqueo del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento de una afección maligna se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4 y/o se orienta al receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR); el agente de bloqueo del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento del mesotelioma se orienta al receptor de muerte programada (PD-1) o y o la ruta del ligando PD (PD-L). Es un ejemplo de un agente que se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4 un antagonista de CTLA-4 tal como ipilimumab o *tremelimumab*. Es un ejemplo de un agente que se orienta a PD-1 un antagonista de PD-1 tal como nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*. Es un ejemplo de un agente que se orienta a PD-L1 un antagonista de PD-L1 tal como *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*. Son ejemplos de agentes que se orientan a GITR antagonistas tales como TRX518 o MK4166.

Según la invención, también se proporciona una combinación terapéutica para usar en el tratamiento de una afección maligna, que comprende:

a. un agente de bloqueo del punto de control inmunitario seleccionado del grupo que consiste en: un agente que se orienta a CTLA-4, y un agente que se orienta a GITR, y

b. un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en: un generador de óxido nítrico (NO) y un retinoide, que es activo junto con el bloqueo del punto de control inmunitario para potenciar la respuesta de un paciente asociada con la afección maligna.

Según la invención, también se proporciona una combinación terapéutica para usar en el tratamiento del mesotelioma, que comprende:

a. un agente de bloqueo del punto de control inmunitario seleccionado del grupo que consiste en: un agente que se orienta a PD-1 y un agente que se orienta a PD-L1, y

5 b. un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en: un generador de óxido nítrico (NO) y un retinoide, que es activo junto con el bloqueo del punto de control inmunitario para potenciar la respuesta de un paciente asociada con la afección maligna.

El agente terapéutico puede seleccionarse según el método de la divulgación. El agente terapéutico puede ser identificado por:

a. recibir un conjunto diana de materiales genéticos de una pluralidad de animales, cada uno de los cuales respondedor o no respondedor a la inmunoterapia de una afección cancerosa;

10 b. evaluar y buscar pares de genes que se expresen de manera correlacionada (positiva o negativa) en muchas muestras de un conjunto de datos;

c. identificar estructuras de red de dependencia para la pluralidad de genes para cada afección;

d. definir módulos y/o centros genéticos que sirvan como punto de intervención en la eficacia del tratamiento;

15 e. consultar bases de datos disponibles públicamente de estirpes celulares tratadas con fármacos con datos de módulo o centro derivados de la etapa (d); y

f. identificar al menos un agente terapéutico que (i) influya en una respuesta (positiva o negativa) asociada con al menos un módulo que gobierna y/o domina una respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario de animales que responden a un tratamiento.

20 Según la divulgación, la etapa (f) en el método anterior puede lograrse consultando las bases de datos de fármacos disponibles públicamente y la bibliografía biomédica para identificar fármacos que sean capaces de influir en la actividad biológica de al menos un módulo o centro que sea fundamental para la actividad genética y/o el equilibrio de una afección maligna.

El agente de bloqueo del punto de control inmunitario que se usa en la composición terapéutica para usar en el tratamiento de una afección maligna se selecciona preferiblemente de:

25 a. un agente que se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4, por ejemplo, un antagonista de CTLA-4 (tal como ipilimumab o *tremelimumab*); o

b. un miembro de la familia génica relacionada con TNFR inducido por glucocorticoides (GITR) (tal como TRX518 o MK4166).

30 El agente de bloqueo del punto de control inmunitario que se usa en la composición terapéutica para usar en el tratamiento del mesotelioma se selecciona preferiblemente de:

a. un agente que se orienta a PD-1, por ejemplo, un antagonista de PD-1 (tal como nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*); o

b. un agente que se orienta a PD-L1, por ejemplo, un antagonista de PD-L1 (tal como *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*).

35 En una forma específica de la invención, el antagonista de CTLA-4 usado en las composiciones terapéuticas para usar en el tratamiento de una afección maligna según la invención es ipilimumab o *tremelimumab*. En una forma específica de la invención, los antagonistas de PD-1 usados en la composición terapéutica para usar en el tratamiento del mesotelioma según la invención son nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*.

40 En una forma específica de la invención, los antagonistas de PD-L1 usados en las composiciones terapéuticas para usar en el tratamiento del mesotelioma según la invención son *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*.

45 Cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es un agonista anti-CTLA-4 o un miembro génico de la familia génica relacionada con TNFR inducido por glucocorticoides (GITR), el agente terapéutico se orienta preferentemente a las siguientes moléculas o su actividad biológica: NOS2 (iNOS) o receptores de retinoides. Más preferiblemente, el agente terapéutico se selecciona de uno o una combinación de los siguientes agentes: dinitrato de isosorbida (ISDN), dinitrato de isosorbida, JS-K, mononitrato de isosorbida o nitroglicerina; ácido todo-trans retinoide (ATRA).

50 Según una de las realizaciones, la invención proporciona el tratamiento de un paciente con una afección maligna mediante la administración a dicho paciente de una combinación de al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario seleccionado del grupo que consiste en: un agente que se orienta a CTLA-4, y un agente que se orienta a GITR y un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en: un generador de óxido nítrico (NO) y

un retinoide. Según una de las realizaciones, la invención proporciona el tratamiento de un paciente con mesotelioma mediante la administración a dicho paciente de una combinación de al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario seleccionado del grupo que consiste en: un agente que se orienta a PD-1 y un agente que se orienta a PD-L1 y un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en: un generador de óxido nítrico (NO) y un retinoide. Preferiblemente, dicho método emplea una composición terapéutica como se describe en el presente documento.

La administración puede ocurrir simultánea, secuencial o alternativamente. La administración simultánea se refiere a la administración del agente terapéutico y el agente de bloqueo del punto de control inmunitario esencialmente al mismo tiempo. Para la coadministración simultánea, los planes de tratamiento también pueden ejecutarse a la vez. Por ejemplo, se puede administrar al paciente una única formulación combinada de los agentes.

Los objetivos, ventajas y características novedosas adicionales se expondrán en la descripción que sigue o resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de los dibujos y la subsiguiente descripción detallada de varias realizaciones no limitativas que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La divulgación proporcionará detalles en la siguiente descripción de realizaciones preferidas con referencia a las siguientes figuras en las que:

la Figura 1 presenta un esquema del enfoque experimental usado en el presente documento;

la Figura 2 presenta un esquema de ingeniería de red inversa de datos de expresión génica;

la Figura 3 ilustra que el modelo de tumor dual permite un análisis detallado de eventos tempranos en tumores respondedores a la terapia frente a tumores no respondedores;

la Figura 4 ilustra que el modelo de tumor dual muestra frecuencias aumentadas de células T ICOS+ CD4 y CD8, así como cantidades aumentadas de células NK en TDLN de ratones respondedores, mientras que los macrófagos disminuyen en TDLN de ratones respondedores, en comparación con ratones no respondedores;

Figura 5 - el análisis de la expresión génica de tumores respondedores frente a no respondedores en ratones tratados con anti-CTLA-4 discrimina entre grupos de respuesta y demuestra un perfil de Th1 (a) Análisis de agrupamientos no supervisado de 30 micromatrices obtenidas de ratones que se curaron después de anti-CTLA-4 (respondedores; n=10), exhibieron progresión de la enfermedad (no respondedores; n=10) o que fueron tratados con PBS (no tratados; n=10). (b) Gráfico de volcán que exhibe la importancia del gen frente a la relación de expresión, comparando respondedores y no respondedores;

Figura 6 - Identificación de redes de genes asociados a la respuesta (A) Análisis de agrupamientos no supervisado. (B) WGCNA identificó 8 módulos funcionales dentro de la red tumoral y (C) la comparación de los módulos entre respondedores y no respondedores mostró una regulación positiva del módulo azul (que contiene muchos genes relacionados con la inmunidad Th1) y una regulación negativa del módulo cian (que contiene muchos genes relacionados con el cáncer). La reconstrucción basada en conocimientos previos (Ingenuity Systems) del diagrama de conexiones de los módulos identificó una serie de genes centrales (D y E);

Figura. 7 - La combinación de anti-CTLA-4 con fármacos que se orientan específicamente a los centros asociados a la respuesta cambia la eficacia del tratamiento. Los ratones portadores de mesotelioma AB1-HA se trataron con anti-CTLA4 en combinación con (A) el inhibidor específico de rho-cinasa fasudil o (B) el inhibidor de aurora cinasa VX-680. (C) La inhibición de iNOS con el inhibidor L-NNA anuló el efecto antitumoral, mientras que (D) la amplificación de la ruta de iNOS a través del tratamiento conjunto con ISDN aumentó la tasa de respuesta a anti-CTLA-4, como predijo el análisis de red y (E) también lo hizo el tratamiento conjunto con el inhibidor de CDKN1 flavopiridol;

Figura. 8 - Los fármacos que fenocopian los módulos asociados a la respuesta aumentan las tasas de respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario. Se trataron conjuntamente ratones portadores de AB1-HA con anti-CTLA-4 en combinación con fármacos orientados a la red de respuesta (A) ATRA, (B) meticrano, (C) galantamina y (D) piridoxina y (E) hidrocotamina y, de hecho, se encontró una mayor respuesta antitumoral para todos estos fármacos;

Figura. 9 - La combinación de anti-CTLA4 con el generador de NO JS-K, que es de una clase diferente de fármacos que ISDN, también mejora el beneficio clínico de anti-CTLA4 en ratones portadores de tumores AB1-HA;

Figura. 10 - Fármacos que se predijo que funcionarían en sinergia con el bloqueo anti-CTLA4, también actúan en sinergia con otros anticuerpos de bloqueo de puntos de control inmunitarios. Se trataron conjuntamente ratones portadores de tumor AB1-HA con anti-GITR en combinación con ISDN y se observó una supervivencia mejorada para la combinación; y

Figura 11 - Los fármacos que se predijo que funcionarían en sinergia con el bloqueo de puntos de control en el modelo de mesotelioma AB1-HA, también actúan en sinergia en otros cánceres no relacionados. Se inocularon

ratones con células de cáncer de riñón Renca y se trataron con anti-CTLA4 en combinación con (A) ISDN o (B) ATRA. Para ambos fármacos se observó una supervivencia mejorada para la terapia de combinación en este segundo modelo de tumor. (C) La terapia de combinación con anti-CTLA4 e ISDN también indujo una regresión completa en una proporción sustancial de ratones en el modelo de cáncer de pulmón Line-1, mientras que esto no se observó para ninguno de los tratamientos solos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en una investigación de los mecanismos moleculares del cáncer *en regresión* después de la inmunoterapia y busca reforzar farmacológicamente esos eventos para mejorar la eficacia de los tratamientos actuales.

El alcance de la presente invención no está limitado por las siguientes realizaciones específicas. Esta descripción detallada está destinada únicamente a fines de ejemplificación. De acuerdo con esta posición, los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o se indica en la memoria descriptiva, individualmente o en conjunto, y todas y cada una de las combinaciones o dos o más de las etapas o características.

No se admite que ninguna de las referencias constituya un estado de la técnica o sea parte del conocimiento general común de quienes trabajan en el campo al que se refiere esta invención.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", o variaciones como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

En la descripción detallada de la invención se pueden encontrar otras definiciones para los términos seleccionados que se usan en este documento y se aplican en toda su extensión. A menos que se defina de otro modo, todos los demás términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

La invención descrita en el presente documento puede incluir uno o más intervalos de valores (por ejemplo, tamaño, desplazamiento e intensidad de campo, etc.). Se entenderá que un intervalo de valores incluye todos los valores dentro del intervalo, incluidos los valores que definen el intervalo y los valores adyacentes al intervalo que conducen al mismo o sustancialmente al mismo resultado que los valores inmediatamente adyacentes a aquel valor que define el límite del intervalo. Por ejemplo, un experto en la materia entenderá que una variación del 10 % en los límites superior o inferior de un intervalo puede ser totalmente apropiada y está abarcada por la invención. Más particularmente, la variación en los límites superior o inferior de un intervalo será del 5 % o como se reconoce comúnmente en la materia, el que sea mayor.

A lo largo de esta memoria descriptiva se usa un lenguaje relativo tal como las palabras 'alrededor de' y 'aproximadamente'. Este lenguaje busca incorporar al menos un 10 % de variabilidad al número o intervalo especificado. Esa variabilidad puede ser más del 10 % o menos del 10 % del número particular especificado.

Como se describe en el presente documento, la presente invención se refiere al descubrimiento de firmas de genes y redes de genes expresados coordinadamente asociados con la respuesta de un individuo a una afección maligna y a métodos para identificar y usar compuestos que regulan y, en algunos casos, recalibran conjuntos de genes y rutas de genes asociados con cáncer, en el que tal regulación y recalibración detienen o revierten efectivamente los efectos de la afección.

En el presente documento se divulga un método implementado por ordenador para identificar o evaluar relaciones entre redes de interacción molecular de genes para identificar módulos genéticos y centros que gobiernan la respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario de animales que responden a un tratamiento contra el cáncer.

Como se usa en el presente documento, un módulo es una red genética (tal como la ilustrada por una huella genética o una imagen) formada por una pluralidad de centros genéticos o genes que están ampliamente regulados positiva o negativamente y que están asociados con el crecimiento (ya sea crecimiento en aumento o disminución) de una neoplasia en un animal respondedor o no respondedor a la inmunoterapia de una afección maligna. Por ejemplo, un módulo puede representar todos aquellos genes que están regulados positiva o negativamente y que están asociados con el crecimiento de una neoplasia. Como alternativa, un módulo podría representar todos los genes que están regulados positiva o negativamente en la respuesta inmunitaria asociada con el crecimiento de una neoplasia.

Como se usa en el presente documento, un centro es un gen aislado o un número seleccionado de genes que son fundamentales para la actividad genética y/o el equilibrio de una afección maligna en un animal respondedor o no respondedor a la inmunoterapia para esa afección maligna.

El método implementado por ordenador según la divulgación puede comprender las etapas de:

a. recibir un conjunto diana de materiales genéticos de una pluralidad de animales, cada uno de los cuales respondedor o no respondedor a la inmunoterapia de una afección cancerosa;

b. evaluar y buscar pares de genes que se expresen de manera correlacionada (positiva o negativa) en muchas muestras de un conjunto de datos;

5 c. identificar estructuras de red de dependencia para la pluralidad de genes para cada afección; y

d. definir módulos y más específicamente centros que sirvan como punto de intervención en la eficacia del tratamiento.

10 En algunos aspectos, puede examinarse una variedad de inmunoterapias usando el método de la divulgación. La inmunoterapia puede ser una que bloquee un punto de control inmunitario o que influya en un punto de control inmunitario. Tal bloqueo se refiere a una multitud de rutas inhibitorias integradas en el sistema inmunitario que mantienen la autotolerancia y modulan la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas para minimizar el daño tisular colateral.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se divulga un método que comprende además las etapas de:

15 a. consultar bases de datos disponibles públicamente de estirpes celulares tratadas con fármacos con datos de módulos derivados del método descrito anteriormente; y

b. seleccionar aquellos agentes terapéuticos que influyen en una respuesta (positiva o negativa) asociada con al menos un módulo que gobierna y/o domina una respuesta a la inmunoterapia por parte de animales que responden a un tratamiento.

20 De acuerdo con un aspecto alternativo de la presente divulgación, se divulga un método que comprende además las etapas de:

a. consultar bases de datos de fármacos disponibles públicamente con datos centrales derivados del método descrito anteriormente; y

b. seleccionar al menos un agente terapéutico que sea capaz de influir en la actividad biológica de un centro que sea fundamental para la actividad genética y/o el equilibrio de una afección maligna.

25 Los tumores incorporan ciertas rutas de puntos de control inmunitarios como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria, en particular contra las células T que son específicas de los antígenos tumorales. Preferiblemente, la ruta del punto de control inmunitario que se bloquea en el método de la presente divulgación es la asociada con uno o más de las siguientes dianas: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), proteína de muerte celular programada 1 (PD1), ligando de PD1, GITR, proteína de membrana de células T 3, LAG3, gen de activación de linfocitos 3, B7-H3 o B7-H4.

30 En algunos aspectos particulares, la ruta del punto de control inmunitario bloqueado está asociada con uno o más (una combinación) de las siguientes dianas: CTLA4, PD1, ligando de PD1 o GITR. Por ejemplo, la inmunoterapia se selecciona de agentes que se orientan a (a) CTLA-4 tales como ipilimumab o tremelimumab; (b) PD-1 tales como nivolumab, pidilizumab o pembrolizumab, AMP-224; (c) PD-L1 tales como MPDL-3280A, MSB0010718C o MEDI4736; o (d) GITR tales como TRX518 o MK4166. Para mejorar el número de pacientes que se benefician del bloqueo del punto de control inmunitario, los anticuerpos de CTLA-4, PD-1, PD-L1 y/o GITR se combinan en una forma preferida de la invención. Los detalles de estos productos, sus dianas y los tipos de cáncer contra los que se usan principalmente se proporcionan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Anticuerpos orientados a CTLA-4, PD-1 o su ligando PD-L1

Anticuerpo	Diana	Compañía	Tipos de cáncer
ipilimumab	CTLA-4	BMS	melanoma pulmón/próstata muchos otros cánceres
tremelimumab	CTLA-4	Pfizer	mesotelioma pulmón/melanoma (con otros fármacos)
nivolumab	PD-1	BMS	melanoma/pulmón/riñón muchos otros cánceres

Anticuerpo	Diana	Compañía	Tipos de cáncer
pembrolizumab	PD-1	Merck	<i>melanoma/pulmón</i> <i>muchos otros cánceres</i>
MPDL-3280A	PD-L1	Roche	<i>melanoma/pulmón</i> <i>riñón y muchos otros cánceres</i>
MEDI4736	PD-L1	AstraZeneca	<i>pulmón</i>
AMP-224	PD-1		<i>melanoma/pulmón</i> <i>riñón y muchos otros cánceres</i>
MSB0010718C	PD-L1	EMD-Serono	<i>melanoma/pulmón</i> <i>riñón y muchos otros cánceres</i>
pidilizumab	PD-1	CureTech	<i>linfoma/cerebro</i>
TRX518	GITR	GITR Inc.	<i>melanoma</i> <i>muchos otros cánceres</i>
MK4166	GITR	Merck	<i>melanoma</i> <i>muchos otros cánceres</i>

En otro aspecto más de la divulgación, el método es un método informatizado o implementado por ordenador para identificar puntos de intervención terapéutica para una afección maligna que está influida por una inmunoterapia, comprendiendo dicho método:

- 5 a. recibir, en un primer procesador, un conjunto de datos de tratamiento genético de un sistema biológico maligno que responde a una inmunoterapia, en el que el conjunto de datos deriva de una pluralidad de entidades biológicas;
- b. recibir, en un segundo procesador, un conjunto de datos de tratamiento genético de un sistema biológico maligno que no responde completamente a una inmunoterapia, en el que el conjunto de datos deriva de una pluralidad de entidades biológicas;
- 10 c. proporcionar, en un tercer procesador, un modelo de red computacional que representa el sistema biológico maligno e incluye nodos y módulos que representan pares de genes que se expresan de forma correlacionada (positiva o negativa) en una pluralidad de muestras;
- d. calcular, con un cuarto procesador, medidas de actividad y/o relaciones de coexpresión para los nodos, que representan estructuras de red de dependencia para la pluralidad de genes expresados en los conjuntos de datos de no respondedores o respondedores parciales y los conjuntos de datos de respondedores;
- 15 e. identificar con un quinto procesador, los módulos genéticos y más específicamente los centros que gobiernan y/o dominan una respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario de los animales que responden a un tratamiento.

En algunos aspectos del método anterior, los datos generados por el quinto procesador luego son usados por un sexto procesador para consultar bases de datos disponibles públicamente para identificar fármacos que influyen en una respuesta (positiva o negativa) asociada con al menos un módulo o centro que gobierna y/o domina una respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario de los animales que responden a un tratamiento.

Usando este método de la divulgación, es posible identificar fármacos que funcionan de manera coordinada con agentes de bloqueo de puntos de control inmunitarios para fenocopiar una red en tumores respondedores.

En un segundo aspecto, la solicitud divulga un sistema para identificar fármacos que funcionan de manera coordinada con agentes de bloqueo de puntos de control inmunitarios para fenocopiar un módulo de red de tumores respondedores, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a. consultar datos de módulo derivados del método anterior para un agente o agentes terapéuticos que influyen en una respuesta asociada con al menos un módulo o centro que gobierna y/o domina una respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario de animales que responden a un tratamiento.

Cuando se emplea el método anterior en el análisis de mesotelioma y el agente inmunoterapéutico se orienta a CTLA-4, se genera un patrón de expresión de un módulo asociado a la respuesta.

5 Un agente terapéutico que puede influir en una respuesta en un módulo es un agente terapéutico que funciona en conjunto con un agente modulador de punto de control inmunitario para regular positivamente o negativamente la actividad del módulo o centro en consideración. Esto se puede lograr si el agente terapéutico tiene un efecto biológico sobre un solo gen en el módulo o centro o si tiene un efecto biológico sobre uno o más genes que componen el módulo o centro.

10 Cuando los datos del módulo se comparan con bases de datos disponibles públicamente de estirpes celulares tratadas con fármacos, los siguientes fármacos, enumerados en la tabla 2, se identificaron como agentes que funcionan en conjunto con un agente anti-CTLA-4 para influir en una respuesta del módulo (positiva o negativa) asociada con mesotelioma.

Tabla 2: Lista de agentes terapéuticos reconvertidos que fenocopian el patrón de expresión de los módulos asociados a la respuesta

Fármaco	Clase	Indicación original
Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	Derivado del ácido retinoico	Enfermedad cutánea acné y como inductor de la diferenciación de citoblastos en la leucemia promielocítica
Meticrano	Diuréticos tiazídicos	Hipertensión
Piridoxina	Vitamina B6	Deficiencia de vitamina B6 y para prevenir los efectos secundarios de los fármacos antituberculosos
Galantamina		Enfermedad de Alzheimer
Bexaroteno	Derivado del ácido retinoico	En ensayos: cáncer, enfermedad de Cushing, Alzheimer
CD1530	Agonista del receptor del ácido retinoico γ	En desarrollo (cáncer)
SR11237	Agonista del receptor del ácido pan-retinoico	En desarrollo (cáncer)
Ro 41-5253	Agonista del receptor de ácido retinoico α	En desarrollo (cáncer)
Gabapentina	Mimético del ácido γ -aminobutírico	Epilepsia y dolor neuropático
Trioxisaleno	Derivado de psoraleno	Fotosensibilización en combinación con luz ultravioleta en enfermedades cutáneas
Calcitriol	Forma activa de vitamina D	Osteoporosis e hipocalcemia
Cetirizina	Antihistamínico	alergias

15 De acuerdo con esta forma de la invención, se proporcionan combinaciones terapéuticas que comprenden al menos un agente terapéutico que es activo junto con el bloqueo del punto de control inmunitario para reprimir la respuesta de un paciente asociada con una afección maligna para usar en el tratamiento de una afección maligna, en particular mesotelioma según la presente invención.

20 El agente de bloqueo del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento de una afección maligna se orienta o funciona en asociación con la molécula inhibidora de células T CTLA-4 o agentes que se orientan a GITR; y/o el agente de bloqueo del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento del mesotelioma se orienta al receptor de muerte programada (PD-1) o sus ligandos. Por ejemplo, es un agente que se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4 un antagonista de CTLA-4 tal como ipilimumab o *tremelimumab*. Es un agente que se orienta a PD-1 un antagonista de PD-1 tal como nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*. Es un agente que se orienta a PD-L1 un antagonista de PD-L1 tal como *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*. Son agentes que se orientan a GITR antagonistas de GITR tales como TRX518 o MK4166.

Cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es la molécula inhibidora de células T CTLA-4, el agente terapéutico se selecciona de una o más de las siguientes clases de fármacos: derivados del ácido retinoico, agonistas del receptor gamma del ácido retinoico, agonistas del receptor del ácido pan-retinoico, ácido retinoico o agonista del receptor alfa.

- 5 En una forma altamente preferida de la invención, el agente terapéutico se selecciona del grupo que comprende: ácido todo-*trans* retinoico o derivados funcionales del mismo.

En un tercer aspecto, la solicitud divulga un sistema para identificar fármacos que funcionan de manera coordinada con agentes de bloqueo de puntos de control inmunitarios para fenocopiar un centro de red en un tumor respondedor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a. recibir un conjunto diana de materiales genéticos de una pluralidad de animales, cada uno de los cuales respondedor o no respondedor a la inmunoterapia de una afección cancerosa;
- b. evaluar y buscar pares de genes que se expresen de manera correlacionada (positiva o negativa) en muchas muestras de un conjunto de datos;
- c. identificar estructuras de red de dependencia para la pluralidad de genes para cada afección;
- 15 d. definir módulos y más específicamente centros que sirvan como punto de intervención en la eficacia del tratamiento;
- e. seleccionar un centro que influya en la actividad genética y/o el equilibrio de una afección maligna; y
- f. consultar las bases de datos de fármacos disponibles públicamente para identificar al menos un fármaco que sea capaz de regular positiva o negativamente el centro.
- 20 Cuando se emplea el método anterior en el análisis del mesotelioma y el agente inmunoterapéutico se orienta a CTLA-4, se han identificado una serie de centros que actuarán en combinación con el agente de bloqueo inmunitario para influir en la respuesta de los animales a un mesotelioma. En particular, los centros pueden clasificarse funcionalmente o dividirse en subclases de la siguiente manera en la Tabla 3.

Tabla 3: Clasificación de centros en categorías funcionales

	Categoría/subclase funcional	n. ^o	Centro
1	Molécula de adhesión celular (PC00069)	9	CD2, CD81, CDH2, ITGA4, ITGAV, ITGB2, LGALS3, PECAM1, SELL
2	Chaperona (PC00072)	1	CCT5
3	Proteína de defensa/inmunidad (PC00090)	14	ADIPOQ, C3, CD3E, CD4, CD8a, CD86, FCER1G, FCGR2A, FCGR2B, H2-Aa, H2-ab1, H2-eb1, IFNGR1, PTX3
4	Modulador enzimático (PC00095)	5	CAV1, CCNA2, CCND1, PIK3R1, RAN
5	Hidrolasa (PC00121)	8	CD38, FAS, FASN, LPL, PTPRC, PTPRJ, SH2D1A, TNFAIP3
6	Cinasa (PC00137)	12	AURKA, AURKB, BUB1B, CDK1, CHEK1, ITK, JAK2, MET, PIK3CG, PRKCA, PRKCC, RIOK2
7	Ligasa (PC00142)	2	ACACA, CBLB
8	Unión de ácido nucleico (PC00171)	8	HDAC2, HNRNPH1, MCM6, PARP1, SUV39H1, WHSC1, XRCC5, ZFP36
9	Oxidoreductasa (PC00176)	4	CYBB, HMOX1, NOS2, SOD2
10	Proceso metabólico (GO:0008152)	3	FABP4, MAD2L1, SAMS1
11	Proteasa (PC00190)	5	DPP4, MMP3, MMP9, MMP12, MMP13
12	Receptor (PC00197)	7	CCR2, CD36, CXCR2, CXCR3, IL2RA, TNFRSF9, XPO1

	Categoría/subclase funcional	n.º	Centro
13	Molécula de señalización (PC00207)	25	APOE, CCL2, CCL3, CCL5, CCL22, CD28, CTLA-4, CXCL3, CXCL9, ECT2, FYB, ICOS, IFNG, IGF1, IL1A, IL-1B, IL1RN, IL33, INHBA, INSIG1, IRS1, LAT, LCP2, PF4, S100A9
14	Factor de transcripción (PC00218)	11	CTTN, EGR2, ELAVL1, FOXM1, HIF1A, IKZF1, RBL1, REL, SATB1, STAT4, TWIST1
15	Transportador (PC00227)	1	ABCA1

Los centros anteriores se clasificaron según categorías funcionales derivadas del sistema de clase de proteínas (CP) PANTHER. Los centros que no fueron clasificados por PANTHER se seleccionaron manualmente en clases PANTHER relevantes o se asignaron a categorías funcionales de ontología de genes (OG).

- 5 Cuando se consultaron los centros anteriores frente a las bases de datos de fármacos disponibles públicamente, los inventores identificaron al menos los siguientes fármacos, identificados en la Tabla 4, que son capaces de regular positiva o negativamente los centros particulares enumerados.

Tabla 4: Lista de centros con sus respectivos agentes específicos

Centro	Módulo	Regulado positiva o negativamente en los respondedores	Nombre del fármaco	Clase
NOS2 (iNOS)	Cáncer	Positivo	Dinitrato isosorbida	de Generador de NO
			Mononitrato isosorbida	de Generador de NO
			Nitroglicerina	Generador de NO
			JS-K	Generador de NO
Cinasa aurora B	Cáncer	Negativo	VX680	Inhibidor de la cinasa aurora
Ect2	Cáncer	Negativo	Fasudilo	Inhibidor de la cinasa Rho
CDKN1	Cáncer	Negativo	Flavopiridol	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina

Nota: JS-K es un agente experimental que se ha usado *in vitro* y en modelos animales en cáncer.

- 10 La presente invención se refiere además a combinaciones terapéuticas que comprenden al menos un agente terapéutico que es activo junto con el bloqueo del punto de control inmunitario para potenciar la respuesta de un paciente asociada con una afección maligna para usar en el tratamiento de una afección maligna, en particular mesotelioma según la presente invención.

- 15 El agente de bloqueo del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento de una afección maligna se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4 y/o el agente de bloqueo del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento del mesotelioma se orienta al receptor de muerte programada (PD-1) o sus ligandos. Por ejemplo, es un agente que se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4 un antagonista de CTLA-4 tal como ipilimumab o *tremelimumab*. Es un agente que se orienta a PD-1 un antagonista de PD-1 tal como nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*. Es un agente que se orienta a PD-L1 un antagonista de PD-L1 tal como *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*.

- 20 Preferiblemente, el agente terapéutico y el bloqueo del punto de control inmunitario funcionan de manera sinérgica. Un efecto sinérgico se refiere a un efecto superior al aditivo producido por la combinación que se examina.

Según una forma preferida de la invención, el agente terapéutico se selecciona según el método de la divulgación. El agente terapéutico puede ser identificado por:

- 25 a. recibir un conjunto diana de materiales genéticos de una pluralidad de animales, cada uno de los cuales respondedor o no respondedor a la inmunoterapia de una afección cancerosa;

b. evaluar y buscar pares de genes que se expresen de manera correlacionada (positiva o negativa) en muchas muestras de un conjunto de datos;

c. identificar estructuras de red de dependencia para la pluralidad de genes para cada afección;

d. definir módulos y/o centros genéticos que sirvan como punto de intervención en la eficacia del tratamiento;

5 e. consultar bases de datos disponibles públicamente de estirpes celulares tratadas con fármacos con datos de módulo o centro derivados de la etapa (d); y

f. identificar al menos un agente terapéutico que (i) influya en una respuesta (positiva o negativa) asociada con al menos un módulo que gobierna y/o domina una respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario de animales que responden a un tratamiento.

10 Según la divulgación, la etapa (f) en el método anterior puede lograrse consultando las bases de datos de medicamentos disponibles públicamente y la bibliografía biomédica para identificar fármacos que sean capaces de influir en la actividad biológica de al menos un módulo o centro que sea fundamental para la actividad genética y/o el equilibrio de una afección maligna.

15 El agente modulador del punto de control inmunitario que se usa en la composición terapéutica para usar en el tratamiento de una afección maligna se selecciona preferiblemente de:

a. un agente que se orienta a la molécula inhibidora de células T CTLA-4, p. ej. un antagonista de CTLA-4 (tal como ipilimumab o *tremelimumab*); o

b. un miembro de la familia génica relacionada con TNFR inducido por glucocorticoides (GITR) (tal como TRX518 o MK4166).

20 El agente modulador del punto de control inmunitario que se usa en la composición terapéutica para usar en el tratamiento del mesotelioma se selecciona preferiblemente de:

a. un agente que se orienta a PD-1, p. ej. un antagonista de PD-1 (tal como nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*); o

25 b. un agente que se orienta a PD-L1, p. ej. un antagonista de PD-L1 (tal como *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*).

En una forma específica de la invención, el antagonista de CTLA-4 usado en las composiciones terapéuticas para usar en el tratamiento de una afección maligna según la invención es ipilimumab o *tremelimumab*.

En una forma específica de la invención, los antagonistas de PD-1 usados en la composición terapéutica para usar en el tratamiento del mesotelioma según la invención son nivolumab, AMP-224, *pidilizumab* o *pembrolizumab*.

30 En una forma específica de la invención, los antagonistas de PD-L1 usados en las composiciones terapéuticas para usar en el tratamiento del mesotelioma según la invención son *MPDL-3280A*, *MSB0010718C* o *MEDI4736*.

35 Cuando el agente modulador del punto de control inmunitario es un agonista anti-CTLA-4 o un miembro de la familia génica relacionada con TNFR inducido por glucocorticoides (GITR), el agente terapéutico es preferiblemente NOS2 (iNOS). Más preferiblemente, el agente terapéutico se selecciona de uno o una combinación de los siguientes agentes: dinitrato de isosorbida (ISDN), dinitrato de isosorbida, JS-K, mononitrato de isosorbida o nitroglicerina; ácido todo-trans-retinoide (ATRA).

En el presente documento se divulga un método para tratar a un paciente con una afección maligna, comprendiendo dicho método las etapas de:

40 a. identificar uno o más agentes terapéuticos que funcionan de manera coordinada con agentes moduladores de puntos de control inmunitarios para fenocopiar una red de tumores respondedores, usando un método de la invención descrito anteriormente; y

b. administrar a dicho paciente una combinación de al menos un agente modulador del punto de control inmunitario y el agente terapéutico (identificado en la etapa (a)).

45 La etapa a en el método de tratamiento anterior se usa para identificar un agente terapéutico que (a) fenocopia un módulo de una red genética asociada con una afección maligna respondedora o (b) influye en la actividad biológica de un centro genético que es fundamental para la actividad genética y/o el equilibrio de una afección maligna.

Según una realización, la invención también proporciona el tratamiento de un paciente con una afección maligna, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una combinación de al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunológico y el agente terapéutico según la presente invención.

Preferiblemente, el método de tratamiento es para mesotelioma, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de riñón. Lo más preferiblemente, el agente modulador del punto de control inmunitario es un agonista anti-CTLA-4.

5 La administración de la combinación puede ocurrir simultánea, secuencial o alternativamente. La administración simultánea se refiere a la administración del agente terapéutico y el agente de bloqueo del punto de control inmunitario esencialmente al mismo tiempo. Para la coadministración simultánea, los planes de tratamiento también pueden ejecutarse a la vez. Por ejemplo, se puede administrar al paciente una única formulación combinada de los agentes.

10 En el método de la presente invención, el agente terapéutico y el agente de bloqueo del punto de control inmunitario pueden administrarse en tratamientos individuales separados que se espacian durante un período de tiempo, para obtener la máxima eficacia de la combinación. Cuando se espacia durante un período de tiempo, se da preferiblemente a un paciente un tratamiento durante un período de tiempo (digamos de 1 a 10 días, preferiblemente de aproximadamente 3 a 5 días) después del cual se administra el segundo agente al paciente. Este ciclo podrá repetirse tantas veces como sea necesario y siempre que el paciente sea capaz de recibir dicho tratamiento.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" incluye:

15 (i) prevenir que ocurra una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección pero que aún no ha sido diagnosticado que la tenga;

(ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detener su desarrollo; o

(iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

20 Según la invención, el paciente a tratar es preferiblemente un mamífero (p. ej., un ser humano, un animal de compañía o un animal comercial, incluidas vacas, perros, monos, ratones, cerdos y ratas). Lo más preferiblemente es un ser humano.

25 En el método de la presente invención, la cantidad de agente activo que se administra al paciente para tratar la afección maligna es una cantidad que es eficaz para mejorar o minimizar el deterioro clínico o los síntomas de la afección, ya sea en forma de dosis única o múltiple. Por ejemplo, el deterioro clínico o síntomas de una afección maligna pueden mejorarse o minimizarse disminuyendo cualquier dolor o malestar sufrido por el sujeto; extendiendo la supervivencia del sujeto más allá de lo que de otro modo se esperaría en ausencia de tal tratamiento; inhibiendo o previniendo el desarrollo o propagación de la afección; o limitando, suspendiendo, terminando o controlando de otro modo la maduración y proliferación de células en la afección. En particular, las cantidades de los agentes eficaces para tratar una afección maligna en un sujeto que necesita tratamiento variarán según el tipo de agente usado, así como los factores particulares de cada caso, incluido el tipo de afección, la etapa de la afección, el peso del sujeto, la gravedad de la afección del sujeto y el método de administración. Estas cantidades pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la materia.

35 La combinación terapéutica descrita en el presente documento puede administrarse a un sujeto mediante procedimientos conocidos, que incluyen, pero sin limitación, administración oral, administración parenteral (p. ej., administración intramuscular, intraperitoneal, intravascular, intravenosa o subcutánea) y administración transdérmica.

Las formulaciones pueden presentarse en envases unitarios o multidosis, tales como ampollas o viales sellados. Además, las formulaciones pueden suministrarse mediante cualquier modo de inyección, incluidas, pero sin limitación, epifascial, intracapsular, intracutánea, intramuscular, intraorbitaria, intraperitoneal (particularmente en el caso de terapias regionales localizadas), intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, o subcutánea.

40 En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un paciente con una afección maligna mediante la administración a dicho paciente de una combinación terapéutica de al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario y el agente terapéutico según la presente divulgación. Preferiblemente, la combinación terapéutica proporciona un tratamiento del mesotelioma.

45 Cuando se proporciona un tratamiento de mesotelioma de este tipo, el agente terapéutico es un generador de óxido nítrico (NO) que se combina con el agente de bloqueo del punto de control inmunitario. Por ejemplo, cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es anti-CTLA4 y el generador de NO se selecciona de dinitrato de isosorbida (ISDN) y JS-K.

50 Cuando se proporciona un tratamiento de mesotelioma de este tipo, el agente terapéutico es un retinoide que se combina con el agente de bloqueo del punto de control inmunitario. Por ejemplo, cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es anti-CTLA4 y el retinoide es el ácido todo-trans retinoico (ATRA).

En un ejemplo alternativo de la invención, cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es un gen relacionado con la familia de TNFR inducido por glucocorticoides (GITR), el agente terapéutico se selecciona de ISDN y ATRA.

En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un paciente con cáncer renal mediante la administración a dicho paciente de una combinación terapéutica de al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario y el agente terapéutico. Por ejemplo, cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es anti-CTLA4 y el agente terapéutico se selecciona de ATRA e ISDN.

- 5 En una realización, la invención proporciona el tratamiento de un paciente con cáncer de pulmón mediante la administración a dicho paciente de una combinación terapéutica de al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario y el agente terapéutico. Por ejemplo, cuando el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es anti-CTLA4 y el agente terapéutico es ISDN.

10 Las características de la invención se discutirán ahora con referencia a la siguiente descripción y ejemplos no limitativos.

Otras características de la presente invención se describen con más detalle en los siguientes ejemplos. Debe entenderse, sin embargo, que esta descripción detallada se incluye únicamente con el propósito de ejemplificar la presente invención, y no debe entenderse de ninguna manera como una restricción a la descripción amplia de la invención tal como se establece anteriormente.

15 Ejemplos

La presente invención identifica módulos genéticos que están asociados con la respuesta al bloqueo terapéutico del punto de control inmunitario de antígeno de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y que posteriormente podrían anular o amplificar farmacológicamente la red asociada a la respuesta, reduciendo o aumentando así la eficacia terapéutica del bloqueo de CTLA-4. En particular, los experimentos descritos en la presente memoria persiguen dos objetivos:

20 **Objetivo n.º 1** Identificar en detalle las redes moleculares que subyacen a la regresión tumoral inducida por inmunoterapia.

Objetivo n.º 2 Identificar y validar combinaciones óptimas de fármacos para mejorar la tasa de respuesta al bloqueo del punto de control inmunitario en el cáncer, que posteriormente puedan ser llevados a la clínica.

25 La Figura 1 presenta un esquema del enfoque experimental usado en el presente documento. Se trataron ratones con tumores inoculados bilateralmente con anti-CTLA-4. Las respuestas fueron simétricas en >90 % de los ratones. Siete días después del tratamiento (el 'punto de inflexión'; momento de inicio de la regresión), se extirpan los tumores de un lado. Basándose en las características de crecimiento del tumor restante, los inventores podrían predecir la futura reacción a la terapia del tumor ya extirpado. A continuación, los inventores realizaron análisis de expresión génica (p. ej., análisis de micromatriz o RNAseq) en tejido tumoral y construyeron una red de coexpresión, identificando módulos moleculares, en correlación con la respuesta. Luego, los inventores usaron estos datos para identificar posteriormente fármacos pleiotrópicos que funcionan en sinergia con el bloqueo del punto de control inmunitario consultando bases de datos de expresión génica disponibles públicamente de estirpes celulares tratadas con fármacos en busca de firmas de expresión que fenocopian la red de tumores respondedores.

35 La Figura 2 representa un esquema más detallado de cómo se logra la ingeniería de red inversa de los datos de expresión génica. A partir de los datos de expresión génica se construye una red de coexpresión utilizando el algoritmo de análisis de red de coexpresión génica ponderada (WGCNA). El algoritmo WGCNA usa un proceso analítico por etapas que aprovecha la información derivada de los patrones de coexpresión génica en las muestras para dilucidar la estructura topológica global de las redes génicas subyacentes, revelando por tanto los módulos. El diagrama de conexión local de módulos seleccionados asociados con rasgos fenotípicos de interés se reconstruye usando datos funcionales de estudios previos. Los centros se definen como genes que están implicados en al menos diez interacciones funcionales con otros genes.

A continuación, se presenta una descripción de los experimentos que se han realizado en el desarrollo de esta invención. Al final de la descripción hay un conjunto de materiales y métodos que se usan en los experimentos.

45 **El modelo de tumor dual permite una valoración detallada de las respuestas inmunitarias tempranas en un tumor respondedor frente a uno no respondedor.**

En este experimento, se inocularon ratones con AB1-HA y luego se trataron con anti-CTLA-4. Las respuestas fueron simétricas en >90 % de los casos (n= 55). El día 13 (primera evidencia de respuesta macroscópica) se extirparon quirúrgicamente los tumores de un lado. Basándose en las características de crecimiento del tumor restante, se denominó la reacción a la terapia del tumor extirpado. El tejido tumoral y de los ganglios linfáticos se analizó mediante FACS, micromatrices e inmunohistoquímica y los datos se agruparon por respondedores frente a no respondedores.

55 El modelo permitía a los inventores tomar muestras de un tumor completo en cualquier momento dado durante el tratamiento mientras sabían cuál habría sido la respuesta eventual, al dejar el otro tumor lateral *en el lugar* y monitorizar su crecimiento (Fig. 3). Los inventores trataron ratones con anti-CTLA-4 o PBS, extirparon quirúrgicamente uno de los tumores así como el ganglio linfático que drena el tumor (TDLN) el día 13, momento en el que los regresores y los progresores eran macroscópicamente idénticos. Los inventores dividieron los datos en tres grupos en función del

crecimiento del otro tumor que quedó *en el lugar*; respondedores, no respondedores y no tratados. Evaluaron la expresión de ICOS por parte de las células T CD4 y CD8 y el número de células NK en los ganglios linfáticos que drenan tumores, ya que se ha encontrado que se correlacionan con la respuesta a anti-CTLA-4 tanto en ratones como en pacientes con cáncer. Los inventores encontraron que los ratones respondedores tenían significativamente más células ICOS⁺ CD4 CD8 y NK que los ratones no respondedores, lo que demuestra la validez del modelo (Fig. 4). Además, encontraron que el número de macrófagos se redujo significativamente en los ratones respondedores; estas células se han asociado con la supresión de las respuestas de células T efectoras en el cáncer.

El análisis de red precisa los eventos moleculares clave en la regresión inducida por inmunoterapia

A continuación, se realizó un análisis de expresión génica de tumores respondedores frente a no respondedores en ratones tratados con anti-CTLA-4. El análisis de agrupamientos jerárquicos no supervisados de datos de micromatrices de 30 ratones (10 no respondedores, 10 respondedores, 10 no tratados) mostró claramente que los tres grupos respectivos podían discriminarse en función de su perfil general de expresión génica. Los genes que se correlacionaron con una respuesta Th1 (incluidos IFN γ , STAT4, IL-18, IL-12, CXCR6 y varias granzimas; Fig. 5), pero también otros genes menos esperados, como iNOS y ligandos de NK, estaban altamente enriquecidos en ratones respondedores, en comparación con los no respondedores o no tratados (Fig. 5). Por tanto, el modelo de tumor dual permite un análisis robusto y detallado de los eventos celulares y moleculares tempranos que ocurren en un tumor respondedor a anti-CTLA-4, sin destruir la lectura del resultado (el tumor restante), en el entorno más informativo: donde las respuestas son discordantes entre animales tratados de manera idéntica.

A continuación, los inventores aplicaron WGCNA de los datos de micromatriz para reconstruir la red en función de la coexpresión de pares de genes y luego identificaron varios módulos separados. Se observaron cambios sorprendentes en las redes génicas, lo más notablemente la regulación positiva del módulo azul (módulo azul; Fig. 6) y la regulación negativa del módulo cian en los ratones respondedores (módulo cian; Fig. 6), en comparación con los ratones respondedores y los no tratados. El módulo azul estaba altamente enriquecido en genes implicados en la inflamación, que estaban muy regulados positivamente en los respondedores (*'módulo inmunitario'*). El diagrama de conexión de los módulos se reconstruyó incorporando datos mecánicos (conocimiento previo) de la bibliografía almacenada en Ingenuity Systems Knowledge Base. Como era de esperar, los genes centrales principales incluían muchos genes relacionados con células T citotóxicas, receptores de quimiocinas y genes implicados en la proliferación de células T. Menos esperado fue el sorprendente enriquecimiento (10 de los 50 centros principales) de genes relacionados con las células NK y ligandos de NK. Además, se encontraron varios genes que estaban asociados con la función celular inmunitaria pero que no se habían ligado antes con respuestas efectoras, así como genes con un conocimiento previo limitado sobre su función pero que se correlacionaban con la regresión del tejido (mamario o prostático) en circunstancias fisiológicas.

El módulo cian, que se reguló negativamente en los ratones respondedores, estaba fuertemente enriquecido en genes implicados en la regulación, adhesión y proliferación del ciclo celular, que son procesos biológicos básicos asociados con el cáncer, y por consiguiente este módulo se denominó *'módulo de cáncer'*. La mayoría de estos genes estaban regulados negativamente en los respondedores, con la excepción de varios centros, que estaban altamente regulados positivamente solo en los respondedores, lo que indica una posible relación recíproca con los genes relacionados con el cáncer en el módulo de cáncer (véase más abajo).

Determinación de la cinética de la red de regresión en desarrollo

Para determinar la cinética de un tumor en regresión, se extirpan los tumores de un lado y se determina la capacidad de respuesta al tratamiento monitorizando los tumores contralaterales. Esto se realiza en varios puntos temporales para obtener una visión detallada y completa de la respuesta inmunitaria efectora durante todas sus fases. Los análisis se realizan en tres grupos de ratones BALB/C portadores de AB1-HA (no tratados, respondedores y no respondedores, n= 10/grupo, como se describe anteriormente en la sección de datos preliminares), en los días 3-5-7-9 después de anti-CTLA-4 (siendo el día 7 el momento en que el tumor empieza a disminuir de tamaño). Cada punto temporal se examina de forma independiente.

El tamaño de la muestra se basa en estudios previos, en los que los inventores mostraron que los experimentos requieren un tamaño de muestra de 30 para identificar módulos asociados a enfermedades que podrían replicarse en un conjunto de datos independiente. A diferencia de los métodos anteriores, los inventores usan RNAseq porque tiene una resolución de base única, una sensibilidad y un intervalo dinámico superiores, y puede detectar genes y transcritos novedosos.

Los datos de RNA-Seq se procesan en el software R usando la canalización Rsubread-featureCounts-voom-LIMMA. WGCNA se usa posteriormente para el análisis de red y la identificación de módulos según estudios anteriores y los centros se identifican mediante la herramienta de análisis Ingenuity Systems Pathway. Estos experimentos revelan cómo se desarrolla la red del tumor en el tiempo y más allá del punto de inflexión de la regresión.

Datos preliminares para el objetivo n.º 2

La orientación a centros dentro de los módulos asociados a la respuesta cambia la respuesta a anti-CTLA-4

Como se indicó anteriormente, siguiendo los métodos anteriores, los inventores identificaron varios genes centrales en el módulo de cáncer que estaban implicados en la activación de la cinasa Rho, y estaban regulados negativamente solo en los respondedores. Por esta razón, los inventores trataron ratones con anti-CTLA-4 en combinación con fasudilo, un inhibidor específico de la cinasa Rho que se usa en pacientes con vasoespasmio cerebral. El fasudilo solo no provocó ningún retraso en el crecimiento, pero en combinación con anti-CTLA-4 aumentó la tasa de respuesta (Fig. 7a). Estos datos sugieren que, al orientarse farmacéuticamente a varios centros dentro del módulo de cáncer, los inventores podrían potenciar de hecho la tasa de respuesta a anti-CTLA-4. Los inventores también identificaron a la cinasa aurora como uno de los principales centros en el módulo de cáncer, que estaba regulado negativamente en los respondedores. Por lo tanto, probaron el inhibidor específico de cinasa aurora VX-680 en combinación con anti-CTLA-4. VX-680 se encuentra actualmente en desarrollo clínico para varios tumores malignos en los que el bloqueo del punto de control inmunitario no ha tenido éxito, tales como el cáncer de mama, colon y páncreas. De hecho, encontraron que el efecto anticancerígeno de anti-CTLA-4 aumentó significativamente con el tratamiento conjunto con VX-680 (Fig. 7b). La solidez de este enfoque se ejemplifica con un tercer ejemplo. Los inventores descubrieron que la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) era un centro en el módulo de cáncer, pero estaba altamente regulada positivamente en los ratones respondedores, lo que indica una relación recíproca. Para validar la iNOS como un mediador importante de la respuesta, los inventores inhibieron específicamente la iNOS usando L-NNA y observaron que, de hecho, la eficacia anti-CTLA-4 disminuía (Fig. 7c). Por el contrario, cuando los inventores amplificaron iNOS al tratar a los ratones conjuntamente con dinitrato de isosorbida (ISDN) donante de NO, pudieron aumentar la eficacia terapéutica (Fig. 7d), lo que sugiere que, de hecho, este gen regulado positivamente era un controlador clave del módulo de cáncer. Además, cuando se usó JS-K como generador de óxido nítrico (que, a diferencia del ISDN de nitrato, es un generador de óxido nítrico activado por GST), se encontraron resultados similares (Fig. 9). Estos datos confirman el poder y la viabilidad de usar el análisis de redes para identificar dianas cooperativas para el desarrollo de fármacos.

Identificación de fármacos pleiotrópicos que afectan a la red

Mediante el uso de análisis informáticos para comparar los datos de micromatrices con datos de bases de datos de 'reposicionamiento de fármacos' disponibles públicamente que contienen datos de expresión génica de todo el genoma de estirpes celulares tratadas con fármacos, los inventores identificaron varios compuestos candidatos potenciales que podrían aumentar los niveles de expresión de genes en el módulo inmunitario y/o disminuir los niveles de expresión de genes en el módulo de cáncer y por tanto imitar la red del cáncer respondedor. Los fármacos identificados que eran estadísticamente significativos por debajo de un umbral específico (valor $p < 0,01$) se enumeran en la Tabla 5. La tabla contiene el nombre de cada fármaco (Nombre del fármaco) y la estirpe celular de la que se derivaron los datos (Estirpe celular). Las otras columnas proporcionan información adicional. La "conectividad media" mide la potencia promedio de la coincidencia de patrones entre los genes del módulo inmunitario/de cáncer en el cáncer respondedor y en las estirpes celulares. La "n" se refiere al número de experimentos independientes que se realizaron para el fármaco dado en una estirpe celular dada. El "enriquecimiento" mide el enriquecimiento de los n experimentos entre una lista clasificada de todos los experimentos. El "valor p" es la probabilidad de que el enriquecimiento se haya observado por casualidad. La "especificidad" proporciona una medida de la singularidad de la coincidencia de patrones entre el cáncer respondedor y las respuestas al fármaco en función de una gran cantidad de resultados anteriores generados usando una colección de firmas diversas.

Tabla 5: Fármacos candidatos que pueden modular los niveles de expresión de los genes en los módulos inmunitarios/de cáncer de una manera (aumentada o disminuida) que sea consistente con la red del cáncer respondedor.

Nombre del fármaco	Estirpe celular	Conectividad media	n	Enriquecimiento	Valor p	Especificidad
Tricostatina A	PC3	0,654	55	0,529	0	0,44
Tricostatina A	MCF7	0,523	92	0,382	0	0,7156
Resveratrol	MCF7	0,811	6	0,805	0,00008	0,0895
Tretinoína	MCF7	0,602	13	0,578	0,00008	0,0659
LY-294002	MCF7	0,487	34	0,367	0,0002	0,3421
Vorinostat	MCF7	0,669	7	0,738	0,00022	0,3158
Harmina	MCF7	0,945	2	0,988	0,00026	0,0066

ES 2 931 337 T3

Nombre del fármaco	Estirpe celular	Conectividad media	n	Enriquecimiento	Valor p	Especificidad
Sirolimús	MCF7	0,396	25	0,401	0,0004	0,2711
Piridoxina	MCF7	0,882	2	0,985	0,00044	0,0073
Fenoxibenzamina	MCF7	0,808	3	0,929	0,00064	0,1921
Alfa-estradiol	MCF7	0,67	9	0,624	0,00064	0,042
Protoveratrina A	MCF7	0,868	2	0,975	0,00099	0
Trifluoperazina	MCF7	0,491	9	0,599	0,00116	0,1971
Astemizol	PC3	0,869	2	0,972	0,00123	0,0337
Galantamina	MCF7	0,911	2	0,972	0,00125	0,0168
Alexidina	PC3	0,857	2	0,967	0,00185	0,033
175029-0000	PC3	0,705	4	0,81	0,00247	0,0764
Proclorperazina	MCF7	0,661	9	0,572	0,00252	0,1841
Tomatidina	MCF7	0,89	2	0,962	0,00256	0,0164
Meticrano	PC3	0,855	2	0,958	0,00308	0,0303
Tioridazina	PC3	0,719	5	0,718	0,00409	0,1636
Clorpromazina	MCF7	0,564	11	0,5	0,00418	0,0196
Sulconazol	MCF7	0,851	2	0,95	0,00449	0,051
Senecifilina	MCF7	0,854	2	0,946	0,00535	0,0945
Hidrocotarnina	MCF7	0,833	2	0,946	0,00557	0,0141
DL-tiorfano	MCF7	0,857	2	0,942	0,00638	0,0147
Tioguanosina	MCF7	0,824	2	0,941	0,0066	0,1167
Dacarbazina	MCF7	0,858	2	0,94	0,0069	0,0348
Crisina	MCF7	0,865	2	0,937	0,00763	0,0234
Cloperastina	PC3	0,808	2	0,935	0,00799	0,0225
Bromuro de pancuronio	MCF7	0,831	2	0,935	0,00809	0,0315
Carbarsona	MCF7	0,872	2	0,934	0,00827	0,0161
Corinantina	MCF7	0,801	2	0,928	0,00984	0

Nombre del fármaco	Estirpe celular	Conectividad media	n	Enriquecimiento	Valor p	Especificidad
Prestwick-674	MCF7	0,751	3	0,83	0,00988	0,0486

- Usando este enfoque, los inventores identificaron con éxito múltiples fármacos candidatos que de hecho podían potenciar la tasa de respuesta al bloqueo de puntos de control, como se muestra en la Fig. 8, lo que demuestra el poder y la validez del enfoque. Estos incluían compuestos que se desarrollaron para una variedad de trastornos, tales como enfermedades psiquiátricas y dermatológicas. Como prueba de concepto, los inventores probaron cuatro compuestos: ácido todo-trans retinoico (ATRA, usado en la enfermedad cutánea acneiforme y como inductor de la diferenciación de citoblastos en la leucemia), meticrano (un diurético usado en Japón para el tratamiento de la hipertensión), galantamina (usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer) y piridoxina (vitamina B6, usada para prevenir los efectos secundarios de fármacos antituberculosos). Los inventores trataron conjuntamente ratones portadores de AB1-HA con anti-CTLA-4 en combinación con estos fármacos y, de hecho, encontraron un efecto claro cuando combinaron estos tratamientos (Fig. 8). Es importante destacar que la mayoría de estos fármacos nunca se han asociado con ningún efecto antitumoral o proinmune. Estos datos demuestran el poder de usar fármacos reposicionados para imitar la red de tumores respondedores al bloqueo de puntos de control, con el fin de aumentar la tasa de respuesta a este tratamiento.
- Los inventores también probaron si los hallazgos podrían extenderse a otros anticuerpos de bloqueo de puntos de control, diferentes de anti-CTLA4, y encontraron que, de hecho, la eficacia del bloqueo de puntos de control con anti-GITR podría mejorar igualmente mediante el tratamiento conjunto con ISDN (Fig. 10). Además, verificaron si los hallazgos podrían replicarse en otro modelo de cáncer, diferente al mesotelioma, y encontraron que ISDN y ATRA sí podrían mejorar la eficacia clínica del bloqueo de CTLA4 en el cáncer de riñón Renca y en el cáncer de pulmón Line-1, demostrando que el los hallazgos se pueden extrapolar a múltiples tipos de cáncer (Fig. 11).

Métodos y materiales

Ratones

- Los ratones BALB/c (H-2d) se obtuvieron del Animal Resources Centre (Canning Vale, Australia) y se mantuvieron en condiciones estándares (M-Block Animal Facility, Centro Médico Reina Isabel II, Universidad de Australia Occidental). Todos los ratones usados en estos estudios tenían entre 8 y 12 semanas de edad. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las aprobaciones del Comité de Ética Animal de la Universidad de Australia Occidental (protocolo RA/3/100/1139) y el código de conducta del Consejo Nacional de Investigación Médica y de Salud de Australia. El Comité de Ética Animal de Australia Occidental aprobó específicamente este estudio.

Estirpes celulares

- Se ha descrito anteriormente la estirpe celular AB1 de mesotelioma de ratón inducido por asbesto derivada de BALB/c, positiva para MHC de clase I, negativa para clase II, altamente tumorigénica y poco inmunogénica, transfectada con el gen HA de la gripe (AB1-HA) (Marzo, A. L. et al. Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. *Journal of Immunology* 162, 5838-5845 (1999); Nowak, A.K. et al. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *Journal of Immunology* 170, 4905-4913 (2003); Lesterhuis, W.J. et al. Synergistic effect of CTLA-4 blockade and cancer chemotherapy in the induction of anti-tumor immunity. *PLoS One* 8, e61895, doi:10.1371/journal.pone.0061895 (2013)). La estirpe celular Renca poco inmunogénica y altamente tumorigénica, originalmente derivada de un adenocarcinoma cortical renal espontáneo. (Murphy, G. P. y Hrushesky, W. J. A murine renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 50, 1013-1025 (1973)), se obtuvo de ATCC donde se validó la identidad de la estirpe celular. Las estirpes celulares se mantuvieron en RPMI 1640 (Invitrogen, Mulgrave, Australia) complementado con HEPES 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, penicilina 100 unidades/ml (CSL, Melbourne, Australia), gentamicina 50 µg/ml (David Bull Labs, Kewdale, Australia) y 10 % de FCS (Invitrogen). Las células AB1-HA se mantuvieron en medios que contenían gentamicina análoga de neomicina (Invitrogen) a una concentración final de 400 µg/ml. Todas las estirpes celulares se probaron periódicamente y resultaron negativas para *Mycoplasma spp.*

Anticuerpos

Se prepararon y purificaron los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 (clon 9H10) y anti-GITR en Monoclonal Antibody Facility, WAIMR (Perth, Australia). El hibridoma CTLA-4 fue un amable regalo del Prof. J.P. Allison (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Nueva York, EE. UU.). Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y anti-PD-1 fueron preparados y purificados por Bioceros BV.

Exposición tumoral y protocolos de tratamiento anti-CTLA-4, incluida la cirugía

Experimentos iniciales sobre la simetría de la respuesta:

5 Se inocularon ratones BALB/c por vía subcutánea (s.c.) con 5×10^5 células AB1-HA en ambos flancos el día 0. Se trataron con anti-CTLA-4 el día 5 o 6 por vía intraperitoneal (i.p.). En estos experimentos, se aspiraba a una tasa de respuesta de aproximadamente 40-60 %, pero dependiendo del lote del anticuerpo anti-CTLA-4, se observaron ligeras diferencias en las tasas de respuesta. Por lo tanto, se optimizó la dosificación para cada lote posterior, usando una dosis única de 100 o 200 μg por ratón. Los no respondedores y los respondedores fueron emparejados por dosis.

10 En solo el 11 % de los ratones, la respuesta fue asimétrica: apareció un nuevo crecimiento en una lesión de un lado respondedora previamente, lo que siempre ocurrió dentro de los 40 días. La cirugía simulada no afectó la simetría de la respuesta (datos no mostrados). Por lo tanto, se puede extirpar un tumor, dejar el otro en el lugar y, posteriormente, inferir el destino del material que se ha extraído y analizado al monitorizar el crecimiento del tumor indicador restante durante al menos 40 días. Esto da una ventana a los eventos de control clave en tumores por lo demás idénticos antes de que se manifieste la regresión.

15 *Experimentos posteriores con extirpación de tumores de un lado:* Después de haber confirmado que la cirugía simulada no afectaba a la simetría de la respuesta (datos no mostrados), se iniciaron experimentos en los que el día del inicio de la respuesta (el "punto de inflexión", 7 días después de la administración de anti-CTLA-4) se retiró uno de los dos tumores. Se usaron tumores de 4 experimentos diferentes, en los que los ratones se trataron el día 5 o 6 con anti-CTLA-4 200 μg i.p. y el tumor se extirpó 7 días después. Los ratones se anestesiaron con isoflurano durante no más de 5 minutos, durante los cuales se extirpó el tumor s.c. a través de una incisión en el flanco y se sumergió instantáneamente por completo en RNALater (Life Technologies, Australia), después de lo cual las heridas quirúrgicas se suturaron con suturas continuas de vicryl 5/0 (Ethicon, North Ryde, Australia). Los ratones se colocaron bajo una lámpara de calor para su recuperación.

20 Las semanas siguientes, el tumor indicador restante se midió con microcalibradores digitales al menos tres veces por semana y, en función de sus características de crecimiento, los ratones se dividieron en tres grupos diferentes:

25 *1- Respondedores:* El tumor era evidente como un nódulo subcutáneo palpable de al menos 5 mm^2 el día de la cirugía del otro tumor (que también debería ser palpable) y retrocedió a 0 mm^2 y permaneció indetectable durante más de 40 días después de la inoculación.

2- No respondedores: El tumor era evidente como un nódulo subcutáneo palpable de al menos 5 mm^2 el día de la cirugía del otro tumor (que también debería ser palpable) y seguía progresando, es decir, no había signos de ralentización del crecimiento o disminución parcial. Cuando el tamaño del tumor alcanzó los 100 mm^2 , los ratones se sacrificaron siguiendo las pautas regionales de ética animal.

30 *3- Respondedores intermedios:* Ni respondedor ni no respondedor claro, es decir, hubo una regresión completa pero seguida de crecimiento tumoral dentro del período de tiempo observado (de al menos 40 días), regresión parcial, crecimiento retardado o lento o un tumor de $<5 \text{mm}^2$ en el momento de la cirugía. Estos ratones fueron excluidos del análisis.

35 Como grupo de control, se extirparon los tumores el día 13 de ratones que habían sido tratados con 100 μl de PBS el día 6 después de la inoculación del tumor.

Se realizaron análisis de micromatrices de expresión génica comparando ratones tratados con anti-CTLA-4 que habían mostrado una regresión completa del tumor contralateral sin recurrencia en los siguientes 2 meses (respondedores, $n = 10$) con ratones que tenían un crecimiento continuo de los tumores contralaterales (no respondedores, $n = 10$). Se usaron ratones tratados con PBS como control ($n = 10$); los ratones con una respuesta intermedia fueron descartados.

40 **Aislamiento de ARN**

45 Los tumores se estabilizaron en RNALater (Life Technologies, Australia) y almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Los tumores se desestabilizaron en TRIzol (Life Technologies, Australia) empleando un homogeneizador de rotor-estator TissueRuptor (QIAgen, Australia). Después de la adición de cloroformo y la separación de la fase acuosa, las muestras se purificaron en columnas RNeasy MinElute (QIAgen, Australia). La integridad de las muestras de ARN se confirmó en el Bioanalyzer (Agilent Technologies, EE. UU.).

Micromatrices

50 Las muestras de ARN total de los 3 grupos de 10 tumores/ratones cada uno se marcaron e hibridaron con micromatrices Mouse Gene 1.0 ST (Affymetrix, EE. UU.) en el Centro Ramaciotti para el análisis de funciones génicas (Universidad de Nueva Gales del Sur, Australia). Los datos de micromatrices eran de alta calidad; intensidad bruta media de las sondas pm ($\pm\text{de}$) = $398,15 \pm 89,8$; discriminación de sondas de control positivas frente a negativa s = $0,855 \pm 0,024$; desviación mediana absoluta de la media de los residuos = $0,334 \pm 0,05$; expresión logarítmica relativa media = $0,228 \pm 0,07$.

Análisis de red

Los datos de micromatrices se preprocesaron en R empleando el algoritmo Factor Analysis for Robust Microarray Summarization (qFARMS) (Hochreiter S et al. *Bioinformatics*. 15 de abril de 2006; 22(8): 943-9. ID de PubMed: 16473874). Se usó un archivo de descripción de chip personalizado (mogene10stmmmentrezg, versiones 16-18) para cartografiar conjuntos de sondas a genes basados en anotaciones genómicas actuales (Dai M et al *Nucleic Acids Res*. 10 de noviembre de 2005; 33(20): e175. ID de PubMed: 16284200). El algoritmo de llamadas informativas/no informativas se empleó para filtrar conjuntos de sondas ruidosas (Talloen W et al. *Bioinformatics*. 1 de noviembre de 2007; 23(21): 2897-902. ID de PubMed: 17921172). Se construyó una red de coexpresión empleando el algoritmo de análisis de red de coexpresión génica ponderada (WGCNA) (Zhang B y Horvath S. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005; 4: Artículo 17. ID de PubMed: 16646834, Bosco et al. *J. Immunol*. 15 de mayo de 2009; 182(10): 6011-21. ID de PubMed: 19414752). Los genes/módulos asociados con la respuesta al tratamiento se identificaron usando el estadístico t moderado, con control de tasa de descubrimiento falso para múltiples pruebas (Smyth GK. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004; 3: Artículo 3. ID de PubMed: 16646809). El diagrama de conexión de los módulos se reconstruyó usando la Ingenuity Systems KnowledgeBase de datos funcionales seleccionados por expertos de estudios publicados (Ingenuity Systems Knowledgebase; Bosco et al *J Allergy Clin Immunol*. enero de 2012; 129(1): 88-94. ID de PubMed: 22112518). Los centros se priorizaron para los estudios de orientación de fármacos al trazar los datos de expresión génica a lo largo de ejes de expresión diferencial y conectividad de red de coexpresión intramodular (Zhang B y Horvath S. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005; 4: Artículo 17. ID de PubMed: 16646834, Bosco y col. *J. Immunol*. 2009 15 de mayo; 182 (10): 6011-21. ID de PubMed: 19414752).

20 Reposicionamiento informático de fármacos

Este análisis se basó en la base de datos del mapa de conectividad (cMap), que comprende perfiles de expresión génica de un panel de estirpes celulares humanas inducidas por 1309 compuestos farmacológicos (Cordero J et al *Science*. 29 de septiembre de 2006; 313 (5795): 1929-35. ID de PubMed: 17008526). Los módulos asociados con la respuesta al tratamiento se identificaron como se describe anteriormente. Los ortólogos humanos de los genes de ratón dentro de estos módulos de respuesta se identificaron usando una tabla de conversión de la base de datos de Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>). Luego, los ortólogos humanos se cartografiaron en conjuntos de sondas Affymetrix hgu133a usando paquetes de anotación de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Los conjuntos de sondas regulados positiva y negativamente se definieron contrastando los niveles de expresión génica en tumores de ratones respondedores frente a no respondedores. Los conjuntos de sondas se buscaron en la base de datos cMap usando software del Broad Institute (<https://www.broadinstitute.org/cmap/>).

Fármacos y programas de tratamiento para tratamiento en vivo

Para los estudios de intervención en vivo que usan agentes orientados a la red, se inocularon ratones BALB/c con 5×10^5 células de mesotelioma AB1-HA, o células de cáncer de pulmón Line-1, o células de cáncer de riñón Renca, como se indica, s.c. en un flanco. Se administró anti-CTLA-4 i.p. el día 10 a una dosis única de 100 μ g por ratón. Los siguientes fármacos se administraron en combinación con anti-CTLA-4. Se inició la dosificación de todos los fármacos el día 10, junto con el anti-CTLA-4 a menos que se indique lo contrario. Las dosificaciones se basaron en estudios publicados, a menos que se afirme lo contrario.

La *L-NNa* (Cayman Chemicals, Mic, EE. UU.) se disolvió en PBS a una concentración de 1 mg/ml y se sonicó para disolver. Los ratones recibieron inyecciones i.p. de 15 mg/kg de peso corporal cada dos días durante 10 dosis i.p, después del tratamiento con α CTLA4. Este régimen de dosis se basó en la bibliografía (Piotrovskij, V. et al. Dose-ranging study of NG-nitro-L-arginine pharmacokinetics in rats after bolus intravenous administration. *Xenobiotica, the fate of foreign compounds in biological systems* 24, 663-669, doi:10.3109/00498259409043268 (1994)), combinado con un estudio propio de optimización de dosis en el que se trataron secuencialmente 2 grupos ($n = 3$ /grupo) de ratones BALB/c estándares con 15 mg/kg o 30 mg/kg durante 10 días y se monitorizaron el peso y las puntuaciones clínicas. Se observó una pérdida de peso de alrededor del 15 % con la dosis más alta. Por lo tanto, se decidió usar la dosis más baja.

El *dinitrato de isosorbida* (Toronto Research Chemicals Inc, To, Canadá) se disolvió a 4 mg/ml en DMSO. Los ratones recibieron diariamente una inyección i.p. durante 14 días a 200 μ g/ratón después del tratamiento con α CTLA4 (Pipili-Synetos, E. et al. Inhibition of angiogenesis, tumour growth and metastasis by the NO-releasing vasodilators, isosorbide mononitrate and dinitrate. *British Journal of Pharmacology* 116, 1829-1834 (1995)).

El *ácido todo-trans retinoide* (Selleck Chemicals, Tx, EE. UU.) se disolvió en DMSO hasta una concentración de 100 mg/ml en DMSO y se diluyó hasta una concentración final de 10 mg/ml en PBS. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4.

El *VX-680* (AduoQ Bioscience, CA, EE. UU.) se disolvió en DMSO a una concentración de 32 mg/ml. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 80 mg/kg de peso corporal durante 14 días después del tratamiento con α CTLA4 (Li, Y. et al. VX680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both

tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma. *American journal of translational research* 2, 296-308 (2010)).

5 El *meticrano* (Sigma, MO, EE. UU.) se disolvió en DMSO a una concentración de 160 mg/ml. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 400 mg/kg de peso corporal durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4. Esta dosis se basó en estudios propios de optimización de dosis, ya que no se pudieron encontrar estudios de dosificación en ratones en la bibliografía. El diurético meticrano está aprobado como antihipertensivo en Japón y se usa en dosis de 150-300 mg una vez al día; la DL50 reseñada para ratones después de administración i.p. es de 10 g/kg (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/1084-65-7>; Lawton, W. J. & Chatterjee, K. en *Cardiac Drugs* (ed. K. Chatterjee & E.J. Topol) 72-157 (Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., 2013)). Se trataron 3 grupos de ratones 10 BALB/c estándares consecutivamente ($n = 3$ /grupo) con dosis crecientes de meticrano i.p. (100 mg/kg; 200 mg/kg y 400 mg/kg) durante 10 días y se monitorizaron peso y puntuaciones clínicas (Workman, P. et al. *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. British journal of cancer* 102, 1555-1577, doi: 10.1038/sj.bjc.6605642 (2010)). Se observó que los ratones parecían ligeramente alterados durante los últimos 2-3 días de tratamiento con la 15 dosis más alta probada, en ausencia de otros signos clínicos, anomalías de comportamiento o pérdida de peso, por lo que no se aumentó más la dosis.

La *hidrocotamina* (Indofine Chemical Company, NJ, EE. UU.) se disolvió en PBS a una concentración de 80 g/ml y los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 0,4 mg/kg de peso corporal durante 14 días después del tratamiento con α CTLA4 (Ito, K. et al. *Effect of hydrocotamine on cytochrome P450 and P-glycoprotein. Drug metabolism and pharmacokinetics* 24, 108-113 (2009)).

20 El *fasudilo* (Selleck Chemicals, Tx, EE. UU.) se disolvió a 2 mg/ml en H₂O destilada y se colocó en agua potable de la jaula del ratón desde el día del tratamiento con α CTLA4, durante 14 días (Ying, H. et al. *The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. Molecular cancer therapeutics* 5, 2158-2164, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0440 (2006)).

25 La *galantamina* (Abcam, Tx, EE. UU.) se disolvió a una concentración de 1 mg/ml en PBS. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4 (Satapatía, S. K. et al. *Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. Molecular medicine* 17, 599-606, doi:10.2119/molmed.2011.00083 (2011)).

30 La *piridoxina* (Abcam, Tx, EE. UU.) se disolvió a una concentración de 20 mg/ml en PBS. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal durante 7 días después del tratamiento con α CTLA4 (Franca, D. S. et al. *B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. European journal of pharmacology* 421, 157-164 (2001)).

El *PHA665752* (Selleck Chemicals, Tx, EE. UU.) se disolvió a una concentración de 10 mg/ml en DMSO. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal durante 6 días después del tratamiento con α CTLA4.

35 La *adifenina* (Sigma, MO, EE. UU.) se disolvió en PBS a concentraciones de 1 mg/ml. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. de 100 μ g/ratón durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4.

El *flavopiridol* (Cayman Chemicals, Mic, EE. UU.) se disolvió en DMSO a una concentración de 3 mg/ml. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 7,5 mg/kg de peso corporal durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4.

40 La *tomatidina* (Sigma, MO, EE. UU.) se disolvió en PBS a una concentración de 5 mg/ml. Los ratones recibieron una dosis diaria de 50 mg/kg de peso corporal por sonda oral durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4 (Fujiiwara, Y. et al. *Triterpenoids isolated from Zizyphus jujuba inhibit foam cell formation in macrophages. Journal of agricultural and food chemistry* 59, 4544-4552, doi:10.1021/jf200193r (2011)).

45 La *protoporfirina IX de cinc (II)* (Sigma, MO, EE. UU.) se disolvió en DMSO a una concentración de 20 mg/ml. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal durante 7 días después del tratamiento con α CTLA4.

50 El *JS-K* (Sigma, MO, EE. UU.) se disolvió a 260 μ g/ml en DMSO. Los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. durante hasta 10 días a 650 μ g/kg después del tratamiento con α CTLA4 (día 10 después de la inoculación). JS-K es un generador de óxido nítrico activado por GST (un profármaco que libera NO en el metabolismo de las glutatión S-transferasas), un fármaco que está en desarrollo para algunas formas de leucemia (Shami, PJ et al. *Leuk Res* 2009;33(11):1525-29)

Durante el tratamiento, los pesos de los ratones se monitorizaron de cerca y se sacrificaron si se observaba una pérdida de peso significativa (≥ 20 % del peso inicial) u otra toxicidad significativa.

55 Los ratones que estuvieron libres de tumores durante más de 3 meses después del tratamiento se volvieron a exponer a 5×10^5 células de mesotelioma AB1 que no expresaban el antígeno HA. Todos los animales rechazaron esta

segunda exposición, lo que indica que el rechazo del tumor AB1-HA inducido por anti-CTLA-4/fármaco no estaba dominado por una respuesta de células T hacia el neoantígeno de HA, lo cual está en línea con los hallazgos publicados anteriormente (Marzo, A. L., Lake, R. A., Robinson, B. W. & Scott, B. T-cell receptor transgenic análisis of tumor-specific CD8 and CD4 responses in the eradication of solid tumors. *Cáncer Res* 59, 1071-1079 (1999)).

5 **Citocinas recombinantes para tratamiento en vivo**

Se diluyeron IL-12 (Peprotech, NJ, EE. UU.), IL-18 (Novus Biologicals, CO, EE. UU.), IL-1 β (Novus Biologicals, CO, EE. UU.) e IFN γ (Peprotech, NJ, EE. UU.) recombinantes de murino en PBS y se inyectaron i.p. en las siguientes dosis/programas: IL-12, 0,2 μ g/g durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4; IL-18 0,4 μ g/g durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4; IL-1 β 0,5 μ g/g durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4 e IFN γ 2 μ g/g durante 10 días después del tratamiento con α CTLA4.

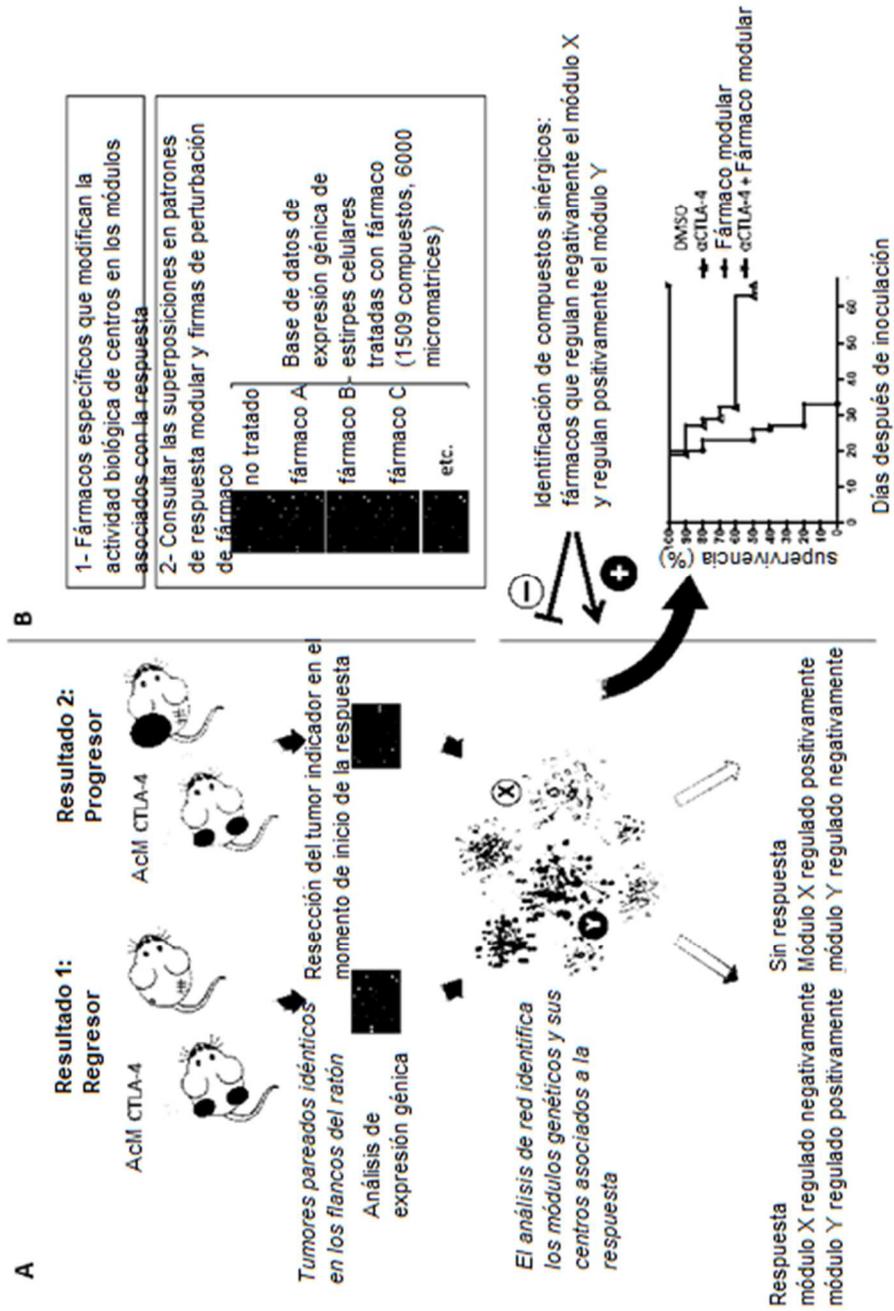
10 **Análisis estadísticos de experimentos con ratones**

Los datos se analizaron usando Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Los datos de crecimiento tumoral se analizaron usando el procedimiento MIXED versión 18 de estadística PASW (IBM SPSS, Chicago IL). Las comparaciones entre los grupos de tratamiento en cada punto temporal se ajustaron para comparaciones múltiples mediante el método Sidak. Los datos de supervivencia del tumor se analizaron según el método de Kaplan Meier y las proporciones de supervivencia se compararon entre grupos usando una prueba de rango logarítmico.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación terapéutica para usar en el tratamiento de una afección maligna que comprende al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario y un agente terapéutico, en la que:
- a. la combinación potencia la respuesta del paciente asociada con la condición maligna,
 - 5 b. el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en: un agente que se orienta a CTLA-4 y un agente que se orienta a GITR, y
 - c. el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un generador de óxido nítrico (NO) y un retinoide.
2. Una combinación terapéutica para usar en el tratamiento del mesotelioma que comprende al menos un agente de bloqueo del punto de control inmunitario y un agente terapéutico, en la que:
- 10 a. la combinación potencia la respuesta del paciente asociada con la condición maligna,
 - b. el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en: un agente que se orienta a PD-1 y un agente que se orienta a PD-L1, y
 - c. el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un generador de óxido nítrico (NO) y un retinoide.
3. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 1, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se orienta a CTLA-4.
4. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 2, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se orienta a PD-1.
5. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 2, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se orienta a PD-L1.
- 20 6. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 1, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se orienta a GITR.
7. La combinación terapéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 6, en la que la afección maligna se selecciona del grupo que consiste en: mesotelioma, cáncer de pulmón y cáncer de riñón.
8. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 7, en la que la afección maligna es mesotelioma.
- 25 9. La combinación terapéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en: ipilimumab, tremelimumab, nivolumab, AMP-224, pidilizumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, TRX518 y MK4166.
10. La combinación terapéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el generador de NO se selecciona del grupo que consiste en: dinitrato de isosorbida y JS-K.
- 30 11. La combinación terapéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el retinoide es ácido todo-trans retinoico.
12. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 1, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es anti-CTLA-4 y el generador de NO se selecciona de dinitrato de isosorbida o JS-K.
- 35 13. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 1, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario es anti-CTLA-4 y el retinoide es el ácido todo-trans retinoico.
14. La combinación terapéutica para usar según la reivindicación 1, en la que el agente de bloqueo del punto de control inmunitario se orienta a GITR y el agente terapéutico se selecciona de dinitrato de isosorbida o ácido todo-trans retinoico.

FIGURA 1



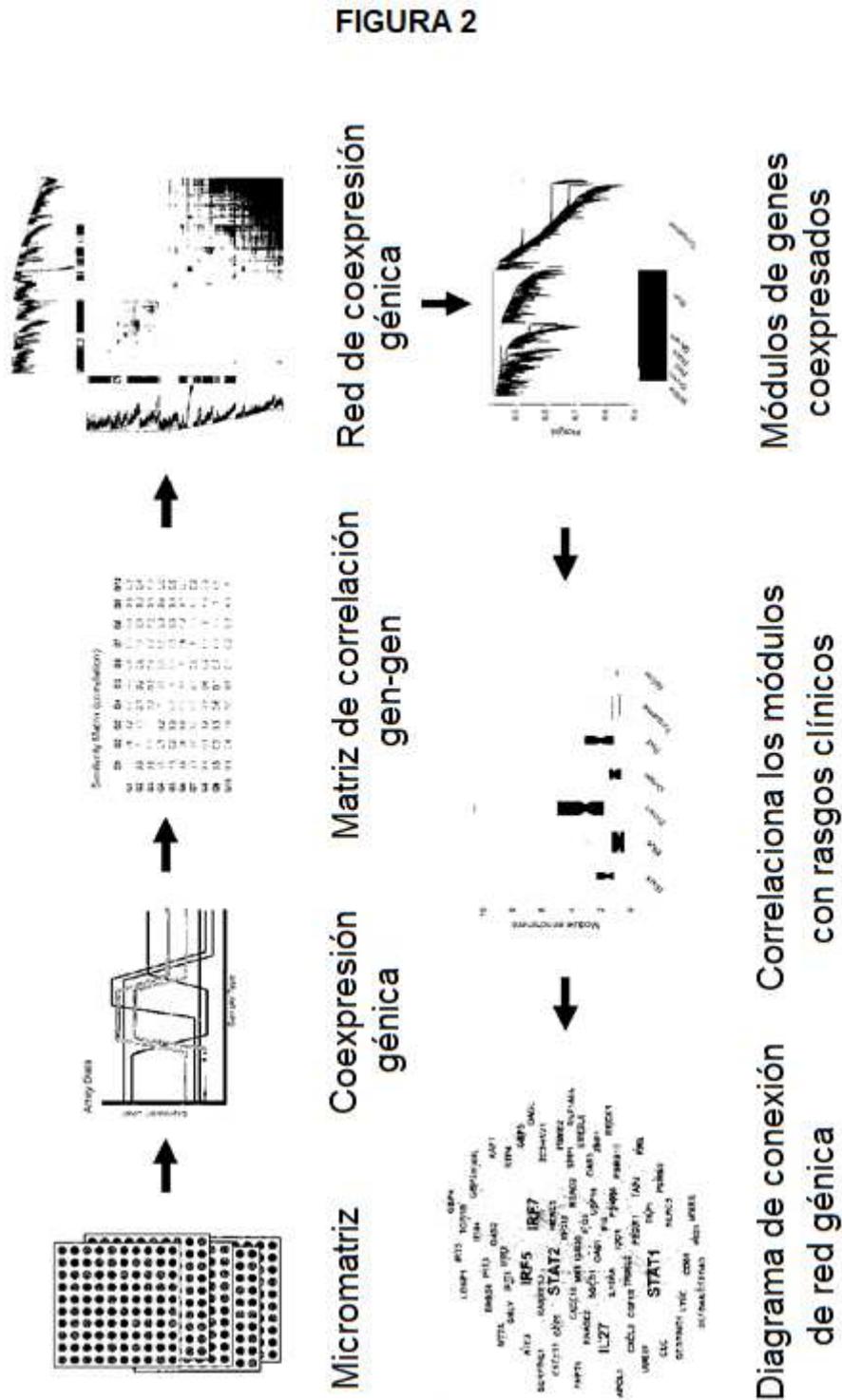


FIGURA 3

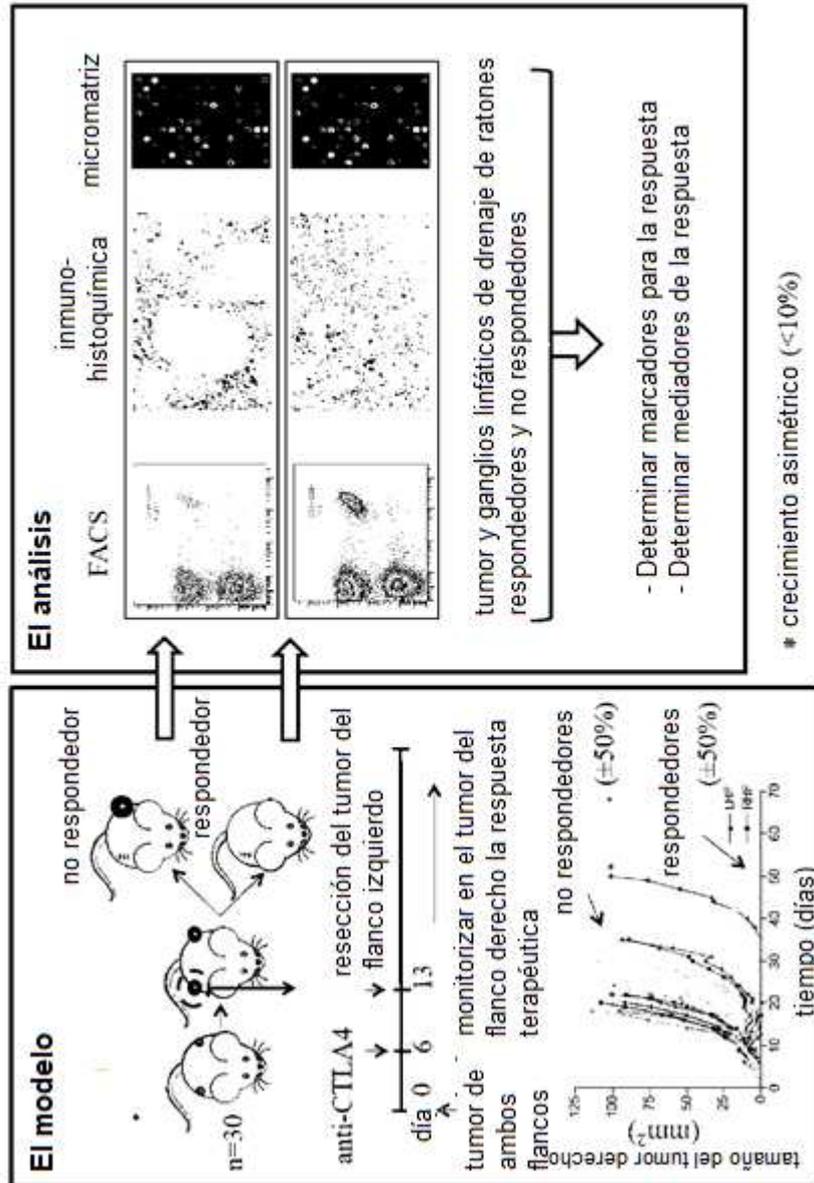


FIGURA 4

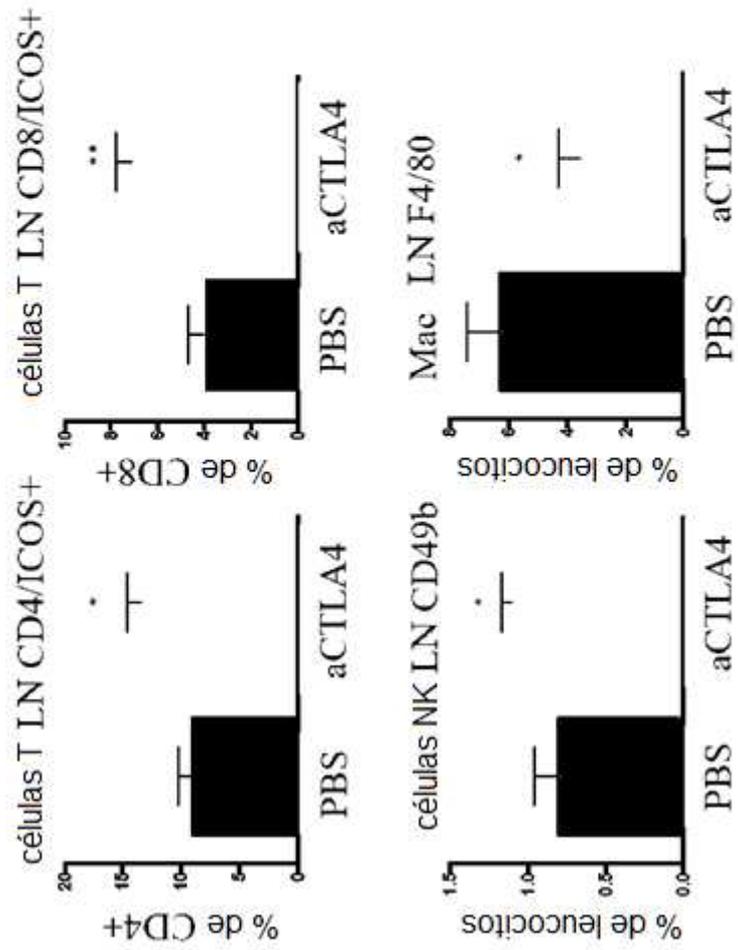


FIGURA 5

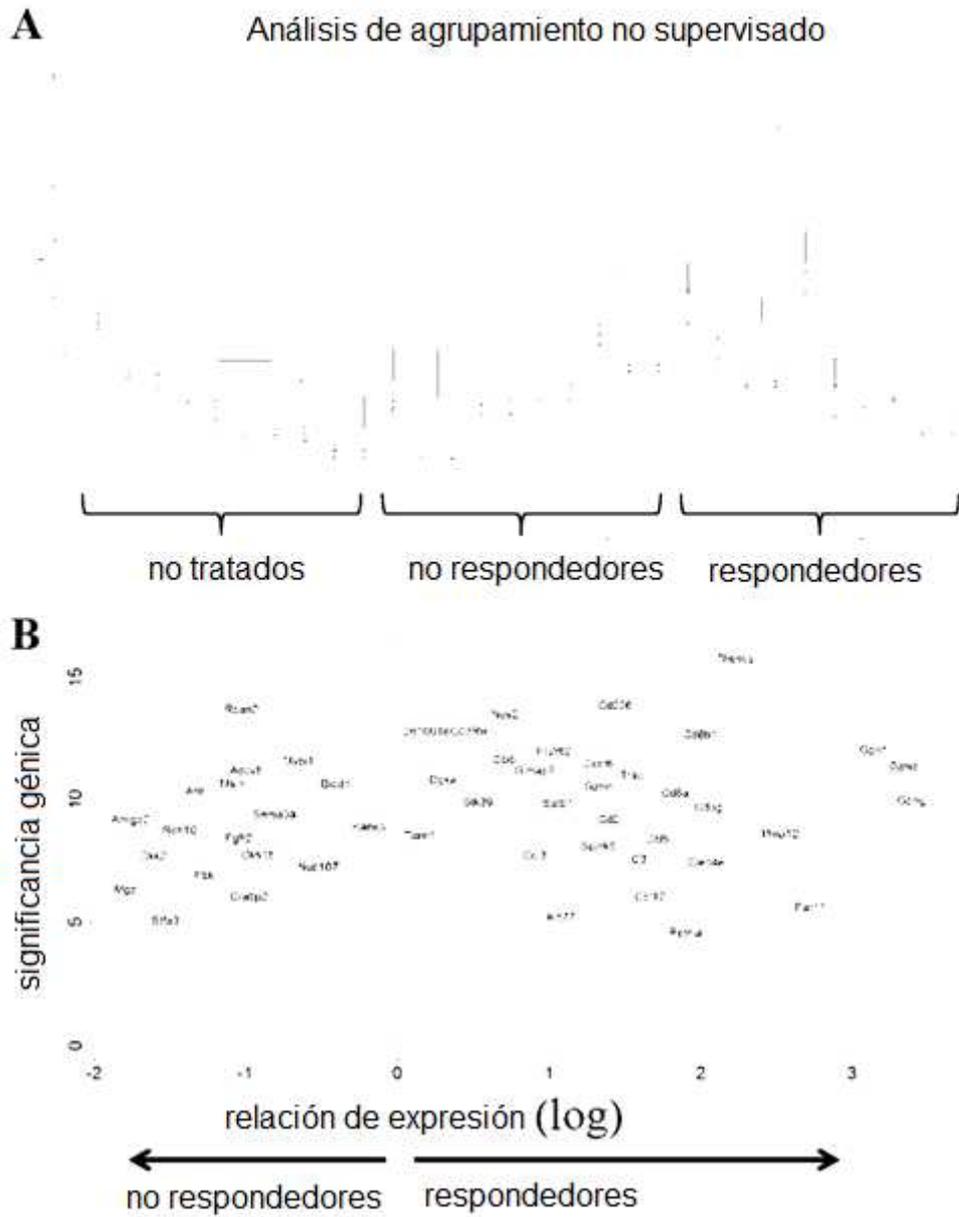


FIGURA 6

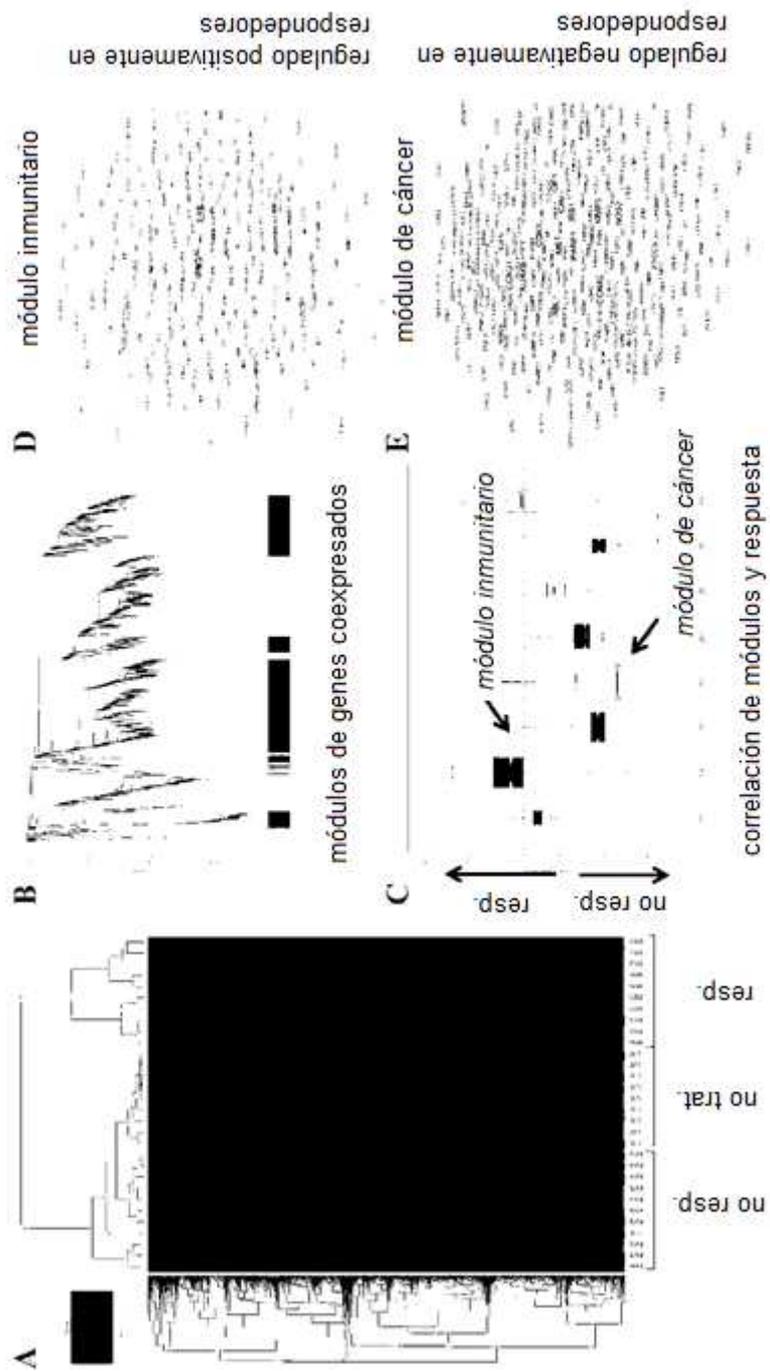


FIGURA 7

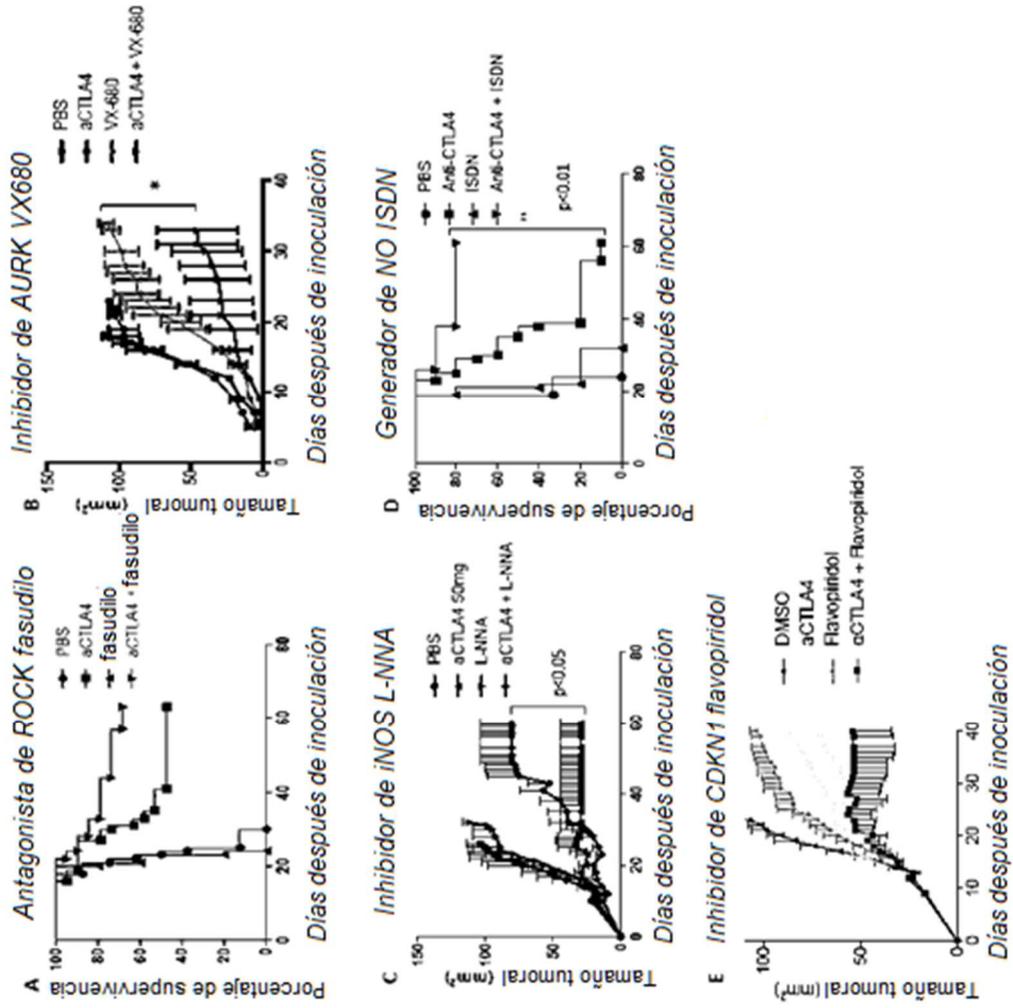


FIGURA 8

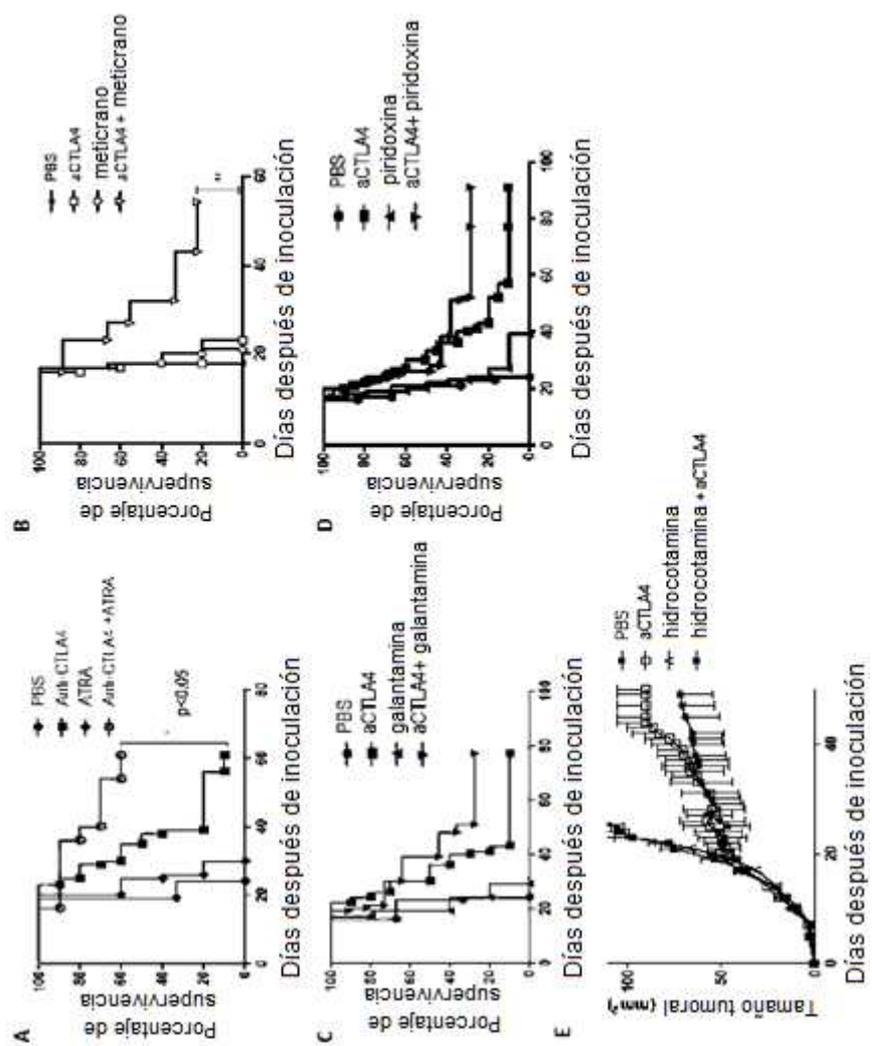


FIGURA 9

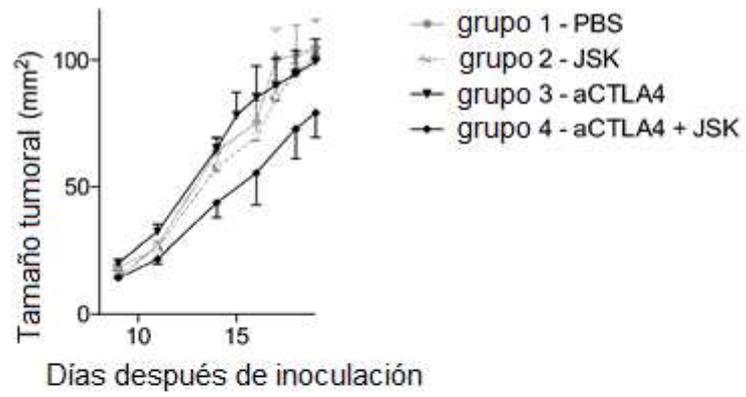


FIGURA 10

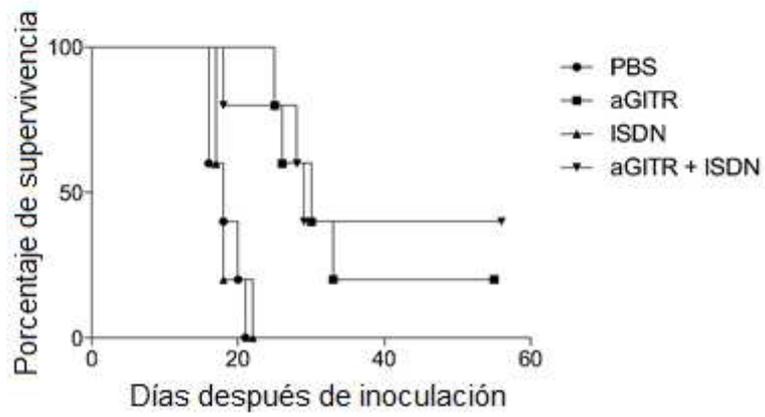


FIGURA 11

