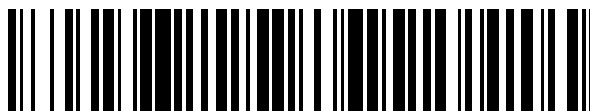


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 380**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/24</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2015 PCT/EP2015/060512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15173259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2015 E 15725258 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3142685**

54 Título: **Método para el tratamiento de melanomas**

30 Prioridad:

**12.05.2014 EP 14305687**

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

**16.03.2020**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75013 Paris, FR;**  
**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE (25.0%);**  
**INSTITUT CLAUDIUS REGAUD (25.0%) y**  
**UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SEGUI, BRUNO;**  
**ANDRIEU-ABADIE, NATHALIE;**  
**LEVADE, THIERRY;**  
**COLACIOS VIATGE, CÉLINE;**  
**ROCHAIX, PHILIPPE;**  
**BERTRAND, FLORIE;**  
**BENOIST, HERVÉ y**  
**ROCHOTTE, JULIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 748 380 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

Método para el tratamiento de melanomas

**Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la oncología y la inmunología.

**5 Antecedentes de la invención**

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es una citocina inflamatoria importante, que se identificó inicialmente en 1975 por su capacidad para desencadenar necrosis del fibrosarcoma cutáneo de ratones in vivo. En desacuerdo con los conocimientos anteriores, un creciente cuerpo de evidencias en modelos de ratones indica que el TNF producido por células cancerosas y/o estromales puede favorecer el establecimiento de un microambiente proinflamatorio, modulando la respuesta inmune específica contra el cáncer y mejorando la angiogénesis tumoral, la progresión tumoral y la metástasis.

Diferentes estudios han ilustrado el papel del TNF en la formación de tumores de la piel. En comparación con sus contrapartes naturales, los ratones deficientes en TNF, los ratones deficientes en TNF-R1 y, aunque en menor medida, los ratones deficientes en TNF-R2 son renuentes a la formación de tumores de piel benignos inducidos por carcinógenos (es decir, papilomas). Sin embargo, la progresión maligna del papiloma de la piel al carcinoma es similar en ratones naturales y deficientes en TNF. La conclusión fue que el TNF desempeña un papel importante en las primeras etapas de la promoción de tumores, muy probablemente a través de su capacidad para desencadenar inflamaciones locales. De hecho, la caracterización de la piel en ratones deficientes en TNF indica un aumento de la infiltración de células T CD8 tras el tratamiento con DMBA/TPA, en comparación con sus homólogos naturales.

El papel del TNF en el melanoma sigue siendo controvertido. La inyección de altos niveles de TNF recombinante desencadena la necrosis del melanoma, no solo en ratones, sino también en seres humanos, y actualmente se usa en la perfusión aislada de extremidades en la práctica clínica (Balkwill F. 2009). El efecto pro-necrótico del TNF probablemente depende de su capacidad para inducir la apoptosis de las células endoteliales. En marcado contraste, se ha demostrado recientemente que el TNF, que se produce en pacientes tratados con inhibidores BRAF V600E (Wilmott et al, 2014), puede conferir resistencia al melanoma humano al aumentar los niveles de Twist1 (Menon, D. R. et al 2013). El papel del TNF en el melanoma se ha investigado más a fondo en ratones que usan células de melanoma B16, que no expresan TNF de forma endógena. Mientras que el TNF de membrana ectópica en las células B16 desencadena la muerte de células mieloides pro-tumorales dependientes de TNF-R2 y el posterior crecimiento in vivo del melanoma, la expresión ectópica del TNF soluble a niveles bajos por B16 tiene un efecto opuesto sobre el crecimiento del melanoma en ratones, muy probablemente a través de su capacidad para mejorar la angiogénesis tumoral (Li, B. et al, 2009). Tanto el crecimiento de células B16 como la angiogénesis tumoral se reducen en ratones deficientes en TNF-R2. Además, la invasión pulmonar de las células de melanoma B16 inyectadas por vía intravenosa disminuye en ratones TNF -/- y TNF-R2 -/-, lo que indica que el TNF probablemente aumenta la diseminación del melanoma de una manera dependiente de TNF-R2 (Chopra, M. et al, 2013). La vacunación contra el TNF desencadena anticuerpos propios anti-TNF e inhibe la invasión pulmonar de las células de melanoma B16 inyectadas por vía intravenosa. Se han obtenido datos similares inyectando anticuerpos neutralizantes anti-TNF o TNF-R1 solubles, lo que indica que el bloqueo de TNF puede representar una estrategia interesante para prevenir la metástasis de melanoma. Un estudio reciente mostró que la deficiencia de TNF puede retrasar el crecimiento tumoral en un modelo espontáneo de melanoma BRAF V600E de ratón (Smith MP et al., 2014). En humanos, diferentes informes de casos han documentado la aparición de melanomas en pacientes con trastornos autoinmunes tratados con anti-TNF. Sin embargo, los metaanálisis recientes no confirman la asociación de los tratamientos anti-TNF y una mayor incidencia de melanomas.

El TNF está involucrado en la modulación de respuestas inmunes innatas y específicas. Mientras que el TNF es producido por células asesinas naturales (NK), éste reduce la susceptibilidad de las células de melanoma B16 a las células NK, al menos en parte, al mejorar la expresión de MHC de clase I en la superficie celular de las células de melanoma (Palmieri G et al, 1992). Se han publicado resultados contradictorios sobre el papel del TNF en la respuesta inmune de las células T CD8 hacia las células cancerosas. Por un lado, el TNF actúa como una molécula efectora en la muerte celular de las células cancerosas desencadenadas por las células T CD8 y una citocina coestimuladora capaz de mejorar la proliferación de células T CD8 no tratadas y la secreción de citocinas. Además, se requiere TNF para el establecimiento de la respuesta inmune antitumoral al facilitar la maduración de las células dendríticas, así como la activación de las células T CD8 y la infiltración tumoral. Por otro lado, TNF desencadena la muerte celular inducida por activación dependiente de TNFR2 (AICD) en las células T CD8, lo que probablemente limita la duración de la respuesta inmune. Además, el TNF puede comportarse como una citocina inmunosupresora, lo que facilita el aumento del número de células T y B reguladoras, así como de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). En un protocolo de terapia de transferencia adoptiva de células T CD8 específicas en ratones, el TNF podría inducir la desdiferenciación de las células de melanoma asociadas con una disminución de la expresión del antígeno melanocítico, lo que probablemente contribuya a la recaída tumoral. El último estudio indica que el TNF supuestamente contribuye al escape inmunitario del melanoma.

Recientemente, se han encontrado algunos vasos sanguíneos tumorales, designados como vénulas tumorales de alto endotelio (HEV), que median la entrada de linfocitos, en tumores humanos de mama y melanoma (Martinet, L., 2012). Los HEV muestran una morfología cuboidal y expresan altos niveles de ligandos de carbohidratos sulfatados para la L-selectina (CD62L), que media el rodamiento de linfocitos a lo largo del endotelio. En humanos, la densidad de las HEV (denominados vasos MECA79+) está altamente correlacionada con la infiltración e inflamación del tumor de células T CD8, según se evalúa por una mayor expresión de citocinas proinflamatorias. En este contexto, no se ha investigado el nivel de expresión de TNF y su supuesto papel en la infiltración de melanoma de células T CD8 y la diferenciación de HEV.

Palmieri, G., et al. muestran que, in vitro, la administración de TNF solo o en combinación con IFN $\gamma$  disminuye la susceptibilidad de las células a ser eliminadas por células asesinas naturales (NK), pero no muestran o sugieren que la administración de un agente bloqueador de TNF $\alpha$  podría utilizarse para tratar con éxito el melanoma (Palmieri, G., et al. "TNF impairs in vivo and in vitro natural killer (NK) susceptibility of B16 melanoma cells". Scandinavian journal of immunology 35.3 (1992): 279-287).

### Sumario de la invención

Tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un agente bloqueador de TNF $\alpha$  para su uso en un método para el tratamiento del melanoma en un sujeto en el que dicho método comprende los pasos de i) el nivel de expresión de MHCI en células de melanoma se determina en una muestra obtenida a partir del sujeto y el nivel de expresión de TNF $\alpha$  en las células estromales se determina en una muestra obtenida del sujeto, ii) los niveles de expresión determinados en el paso i) se comparan con valores de referencia predeterminados y iii) al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho agente bloqueador TNF $\alpha$  cuando los niveles determinados en el paso i) son superiores a su valor de referencia predeterminado en el que el agente de bloqueo TNF $\alpha$  se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anticuerpos anti-TNF-R1 y proteínas de fusión recombinantes que consisten en dos partes extracelulares del receptor 2 (p75) de TNF $\alpha$  soluble unido por el fragmento de Fc de una molécula IgG1 humana.

### Descripción detallada de la invención

Se describe en este documento un agente bloqueante de TNF $\alpha$  para su uso en el tratamiento y la prevención de melanomas en un sujeto en el que las células de melanoma expresan MHCI y en el que las células de estroma exhiben cierta expresión de TNF $\alpha$ .

Como se usa en este documento, el término "MHCI" para el complejo principal de histocompatibilidad de clase I denota que es una de las dos clases principales de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (la otra es MHC clase II) y se encuentra en casi todas las células nucleadas del cuerpo. Su función es mostrar fragmentos de proteínas desde el interior de la célula hasta las células T; las células sanas serán ignoradas, mientras que las células que contienen proteínas extrañas o mutadas serán atacadas por el sistema inmune. Debido a que las moléculas de MHC de clase I presentan péptidos derivados de proteínas citosólicas, la vía de presentación de MHC de clase I a menudo se denomina vía citosólica o endógena.

Como se usa en este documento, la expresión "tratamiento y prevención de melanomas en un sujeto en el que las células de melanoma expresan MHCI" se refiere a un sujeto con células de melanoma que expresan la proteína MHC Clase I según lo evaluado por citometría de flujo, inmunohistoquímica o transferencia Western.

Como se usa en este documento, la expresión "tratamiento y prevención de melanomas en un sujeto en el que las células del estroma exhiben cierta expresión de TNF $\alpha$ " se refiere a un sujeto cuyas células del estroma, tales como las células endoteliales, los fibroblastos y/o los leucocitos, se expresan en la superficie celular y/o secretan la proteína TNF $\alpha$ , según lo evaluado por citometría de flujo, inmunohistoquímica o ELISA.

En particular, el melanoma puede ser un melanoma genético (o melanoma familiar) o melanoma causado por la radiación UV.

En particular, el melanoma está causado por una o varias mutaciones en el gen B-Raf (tal como la mutación V600E).

En particular, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  puede usarse para la prevención de la recaída del melanoma.

El término "TNF $\alpha$ " o "TNF-alfa" se refiere al factor de necrosis tumoral alfa. El TNF-alfa humano es una citocina humana codificada por el gen TNF-alfa. El TNF-alfa, una citocina natural, desempeña un papel central en la respuesta inflamatoria y en la lesión inmune. Está formado por la escisión de una proteína transmembrana precursora, que forma moléculas solubles, que se agregan para formar complejos trimoleculares. Estos complejos luego se unen a los receptores que se encuentran en una variedad de células. La unión produce una serie de efectos proinflamatorios, que incluyen la liberación de otras citocinas proinflamatorias, incluidas IL-6, IL-8 e IL-1; la liberación de metaloproteinasas de matriz; y la regulación ascendente de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, amplificando aún más la cascada inflamatoria e inmune que atrae los leucocitos a los tejidos extravasculares.

- La expresión "agente de bloqueo de TNF $\alpha$ " o "TBA" se refiere a una molécula, tal como una proteína, un anticuerpo o una molécula pequeña que puede reducir significativamente las propiedades de TNF $\alpha$ . Dichos agentes bloqueantes incluyen anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , p. ej. infliximab, adalimumab, CDP571 o D2E7, certolizumab y golimumab. También se han desarrollado proteínas basadas en receptores de TNF recombinantes (por ejemplo, etanercept, una proteína de fusión recombinante que consta de dos partes extracelulares del receptor soluble de TNF $\alpha$  2 (p75) unidas por el fragmento Fc de una molécula de IgG1 humana). Un receptor de TNF tipo 1 soluble pegilado también se puede usar como agente bloqueante de TNF. Además, se ha demostrado que la talidomida es un potente inhibidor de la producción de TNF. Los agentes bloqueantes de TNF $\alpha$  incluyen además inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (IV), análogos de la talidomida y otros inhibidores de la fosfodiesterasa IV.
- El término "etanercept" o "ETA" se refiere al antagonista del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide. El término "etanercept" (ETA, ETN, Enbrel) es una proteína recombinante de fusión IgG-Fc del receptor TNF compuesta por el receptor p75 TNF fusionado genéticamente al dominio Fc de IgG1. Etanercept neutraliza el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral de citocina proinflamatoria (TNF $\alpha$ ) y la linfotóxina  $\alpha$  (Batycka-Baran et al., 2012).
- En particular, el agente de bloqueo de TNF $\alpha$  es un agente anti-TNF-R1 o un agente anti-TNF $\alpha$ , es decir, un agente que bloquea y/o neutraliza el TNF $\alpha$ .
- En particular, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  es un agente anti-TNF-R1.
- En particular, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  es el etanercept.
- En el contexto de la presente descripción, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.
- Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.
- Los agentes bloqueantes de TNF $\alpha$  son bastante conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Konstantinos A. et al, 2000; Marriott J Blake, 1997; Poturoglu S. et al, 2009; Shire Mary G et al., 1998; Wollheim Frank A. 2002).
- En particular, dicho agente de bloqueo de TNF $\alpha$  puede ser un antagonista de bajo peso molecular, p. ej. una molécula orgánica pequeña (natural o no).
- La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula (natural o no) de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en los productos farmacéuticos. La expresión excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas particulares varían en tamaño hasta aproximadamente 10000 Da, más preferiblemente hasta 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y, lo más preferiblemente, hasta aproximadamente 1000 Da.
- En particular, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  de la presente descripción puede ser un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  o anti-TNF-R1 que neutraliza TNF $\alpha$  o el receptor TNF-R1 o un fragmento del mismo que neutraliza TNF $\alpha$  o TNF-R1 (véase, por ejemplo, Xie JH et al. Al., 2003).
- Los anticuerpos dirigidos contra TNF $\alpha$  o TNF-R1 pueden generarse de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epitopo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar varios adyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente descripción pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra TNF $\alpha$  o TNF-R1 pueden prepararse y aislarse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas de producción y aislamiento incluyen, entre otras, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote et al., 1983); y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al. 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-TNF $\alpha$  o anti-TNF-R1. El agente bloqueante de TNF $\alpha$  útil en la práctica de la presente descripción también incluye fragmentos de anticuerpo anti-CXCR3 que incluyen, entre otros, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir una identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada para TNF $\alpha$  o TNF-R1.
- Los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  o anti-TNF-R1 humanizados y sus fragmentos de anticuerpos también se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que

los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como el ratón, la rata, el conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en Winter (Patente de Estados Unidos N° 5.225.539) y Boss (Celltech, Patente de Estados Unidos N° 4.816.397).

Luego, para esta invención, se seleccionan anticuerpos neutralizantes de TNF $\alpha$  o TNF-R1.

Ejemplos de anticuerpos anti-TNF $\alpha$  son infliximab (IFX) (un anticuerpo completo quimérico humano-ratón) (Remicade™; Centocor, Horsham, Pa., EE. UU.), adalimumab (un anticuerpo completo humano recombinante) (Humira; Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, EE. UU.) y Certolizumab pegol (Cimzia™; UCB, Bélgica), que es un fragmento Fab PEGilado de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une y neutraliza el TNF $\alpha$  humano (véase, por ejemplo, Wollheim Frank A. 2002).

En particular, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  es el infliximab.

En particular, el anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo humano completo (como el adalimumab).

Más particularmente, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  puede seleccionarse de aptámeros. Los aptámeros son una clase de moléculas que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S. D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo constreñida conformacionalmente mostrada por una proteína de plataforma, como la tiorredoxina A de E. coli que se selecciona de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

Luego, para esta presente descripción, se seleccionan aptámeros neutralizantes de TNF $\alpha$  o TNF-R1.

En particular, el agente bloqueante de TNF $\alpha$  según la presente descripción es un inhibidor de la expresión de TNF $\alpha$  o TNF-R1.

Los ARN inhibidores pequeños (siRNA) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del gen TNF $\alpha$  o TNF-R1 para su uso en la presente invención. La expresión del gen TNF $\alpha$  o TNF-R1 puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (dsRNA), o un vector o construcción que cause la producción de un ARN bicatenario pequeño, tal que la expresión génica de TNF $\alpha$  o TNF-R1 se inhiba específicamente (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para seleccionar un vector de codificación de dsRNA o dsRNA apropiados son bastante conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. y col. (2001); Hannon, G J. (2002); McManus, M. T. et al. (2002); Brummelkamp, T.R. et al. (2002); Pat. de EE.UU. Nos. 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones internacionales de patentes Nos. WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del gen TNF $\alpha$  o TNF-R1 para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con diseño de horquilla o cabeza de martillo diseñadas que catalizan de forma específica y eficiente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de TNF $\alpha$  o TNF-R1 son, por lo tanto, útiles dentro del alcance de la presente descripción. Los sitios específicos de escisión de ribozima dentro de cualquier diana de ARN potencial se identifican inicialmente escaneando la molécula diana en busca de sitios de escisión de ribozima, que típicamente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar las características estructurales predichas, como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de los candidatos

diana también se puede evaluar probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

Los oligonucleótidos antisentido y las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión del gen de TNF $\alpha$  o TNF-R1 se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para síntesis química tales como, por ejemplo, mediante síntesis química de fosforamada en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de ARN antisentido por transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones a los oligonucleótidos de la presente descripción como un medio para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, entre otras, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces de fosfodiesterasa dentro de la estructura del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido siRNA y ribozimas de la presente descripción pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido o ácido nucleico de ribozima a las células y preferiblemente a las células que expresan TNF $\alpha$  o TNF-R1. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la presente descripción incluyen, entre otros, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido siARN o secuencias de ácido nucleico de ribozima. Los vectores virales son un tipo particular de vector e incluyen, entre otros, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina moloney, el virus del sarcoma murino harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma rouse; adenovirus, virus adenoasociado; virus del tipo SV40; virus del polio; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la polio; y virus de ARN como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero que son conocidos en la técnica.

Los vectores virales particulares se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales han sido reemplazados por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN viral genómico en ADN con la posterior integración proviral en el ADN celular del huésped. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica en humanos. Los más útiles son los retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar partículas infecciosas). Tales vectores de expresión retrovirales genéticamente modificados tienen utilidad general para la transducción de genes de alta eficiencia *in vivo*. Protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en replicación (incluidos los pasos de la incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recolección de partículas virales de medios de cultivo de tejidos, e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991.

Los virus particulares para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para su uso en humanos con terapia génica. Un virus adenoasociado puede ser diseñado para ser deficiente en la replicación y capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies celulares. Tiene además ventajas tales como la estabilidad frente al calor y a disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluidas las células hemopoyéticas; y la falta de inhibición de la sobreinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Según se sabe, un virus adenoasociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, se han seguido infecciones de virus adenoasociados naturales en cultivos de tejidos durante más de 100 pasos en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. Los virus adenoasociados también pueden funcionar de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Se han descrito ampliamente en la técnica vectores plasmídicos y son bastante conocidos por los expertos en la materia. Véase, p. ej., Sambrook et al., 1989. En los últimos años, se han utilizado vectores plasmídicos como vacunas de ADN para administrar genes que codifican antígenos a las células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que con muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso común incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bastante conocidos por los expertos en la materia. Además, los plásmidos pueden diseñarse a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligadura para eliminar y agregar fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse por una variedad de rutas parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intramuscular, ocular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También se puede administrar mediante aerosoles o gotas intranasales, supositorios rectales y por vía oral. También se puede administrar en la epidermis o en la superficie de la mucosa usando una pistola de genes. Los plásmidos se pueden administrar en una

solución acuosa, secar sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración del ADN que incluya, entre otros, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

5 En particular, la secuencia de ácido nucleico de oligonucleótidos antisentidos, siRNA, shRNA o ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo, un promotor heterólogo. El promotor puede ser específico para células gliales de Muller, células de la microglia, células endoteliales, células periciticas y astrocitos. Por ejemplo, una expresión específica en células gliales de Muller puede obtenerse a través del promotor del gen de la glutamina sintetasa. El promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor viral, tal como el promotor CMV o cualquier promotor sintético.

10 En particular, las nucleasas, endonucleasas o meganucleasas que reconocen al gen que codifica para el TNF $\alpha$  o para el TNF-R1 pueden usarse como agente bloqueante de TNF $\alpha$ .

15 El término "nucleasa" o "endonucleasa" significa nucleasas sintéticas que consisten en un sitio de unión al ADN, un enlazante y un módulo de escisión derivado de una endonucleasa de restricción que se usa para esfuerzos de direccionamiento de genes. Las nucleasas sintéticas de acuerdo con la presente descripción exhiben mayor preferencia y especificidad con los sitios objetivo de ADN bipartitos o tripartitos que comprenden la unión de ADN (es decir sitio(s) de reconocimiento de TALE) y sitio objetivo de endonucleasa de restricción mientras se corta en sitios fuera del objetivo que comprenden solo el sitio objetivo de la endonucleasa de restricción.

Los ejemplos de nucleasas que pueden usarse en la presente descripción se describen en los documentos WO 2010/079430, WO2011072246, WO2013045480, Mussolino C, et al (Curr Opin Biotechnol. 2012 Octubre; 23 (5): 644-50) y Papaioannou I. et al (Expert Opinion on Biological Therapy, marzo de 2012, vol. 12, No. 3: 329-342).

20 Para probar la funcionalidad del supuesto agente bloqueador de TNF $\alpha$  en el tratamiento y la prevención del melanoma, es necesaria una prueba in vivo. Para ello, se puede elaborar un modelo singénico de ratones inmunocompetentes inyectados ortotópicamente con células de melanoma que expresan MHC1 (como las células B16K1). Las células de melanoma que expresan MHC1 se inyectan por vía intradérmica en ratones C57BL/6 naturales y se analiza la capacidad de que un agente bloqueante de TNF $\alpha$  prevenga o cure el melanoma.

25 Se describe en este documento un método para tratar o prevenir un melanoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de agente bloqueante de TNF $\alpha$  de acuerdo con la presente descripción a dicho sujeto en el que las células de melanoma expresan MHC1 y en el que las células de estroma exhiben cierta expresión de TNF $\alpha$ .

30 Se describe en este documento también un método para tratar o prevenir un melanoma en un sujeto que comprende los pasos de i) determinar el nivel de expresión de MHC1 en células de melanoma en una muestra obtenida del sujeto y determinar el nivel de expresión de TNF $\alpha$  en células de estroma en una muestra obtenida del sujeto, ii) comparar los niveles de expresión determinados en el paso i) con valores de referencia predeterminados y iii) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente bloqueante de TNF $\alpha$  de acuerdo con la presente descripción cuando los niveles determinados en el paso i) son más altos que su valor de referencia predeterminado.

35 En particular, el método puede usarse para prevenir la recaída del melanoma.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere, por ejemplo, a una muestra de melanoma o una biopsia del entorno del tumor (células en contacto con el tumor como las células de estroma).

40 Típicamente, el valor de referencia predeterminado es un valor umbral o un valor de corte. Un "valor umbral" o "valor de corte" se puede determinar de forma experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente en función de las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería cualquier persona con conocimientos ordinarios en la materia. Por ejemplo, la medición retrospectiva del nivel de expresión de MHC1 y/o TNF $\alpha$  en muestras de sujetos históricos almacenados adecuadamente puede usarse para establecer el valor de referencia predeterminado. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas de acuerdo con la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falso positivo y falso negativo). Por lo general, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar utilizando una curva de Características operativas del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar el nivel de expresión de MHC1 y/o TNF $\alpha$  en un grupo de referencia, se puede usar el análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de los niveles de expresión determinados en las muestras a analizar, y así obtener un estándar de clasificación que sea significativo para la clasificación de la muestra. El nombre completo de la curva ROC es una curva característica del operador receptor, que también se conoce como curva característica de operación del receptor. Se utiliza principalmente para pruebas clínicas de diagnóstico bioquímico. La curva ROC es un indicador integral que refleja las variables continuas de tasa positiva verdadera (sensibilidad) y tasa positiva falsa (especificidad 1). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Una serie de valores de corte diferentes (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados normales y anormales de la prueba de diagnóstico) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego, la sensibilidad se usa como una coordenada vertical y la especificidad se usa como una coordenada horizontal para dibujar una curva.

- En la curva ROC, el punto más cercano a la esquina superior izquierda del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores de alta sensibilidad y alta especificidad. El valor de AUC de la curva ROC está entre 1,0 y 0,5. Cuando  $AUC > 0,5$ , el resultado del diagnóstico mejora cada vez más a medida que se acerca el AUC 1. Cuando AUC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando AUC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es moderada. Cuando AUC es superior a 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con una computadora. El software o los sistemas existentes en la técnica pueden usarse para dibujar la curva ROC, tales como: software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT VI0.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Maryland, EE. UU.), etc.
- 5
- 10 Composiciones Farmacéuticas
- Se describe en este documento también una composición farmacéutica que comprende un agente bloqueante de TNF $\alpha$  de acuerdo con la presente descripción y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- Más particularmente, se describe en este documento una composición farmacéutica que comprende un agente bloqueante de TNF $\alpha$  de acuerdo con la descripción y excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y la prevención de melanomas en un sujeto en el que las células de melanoma expresan MHC1 y en el que las células de estroma exhiben expresión de TNF $\alpha$ .
- 15
- En particular, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción puede usarse para la prevención de la recaída del melanoma.
- Cualquier agente terapéutico de la presente descripción como se describió anteriormente puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.
- 20
- "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o agente auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico auxiliar de cualquier tipo.
- 25
- La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.
- 30 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden formularse para una administración tópica, oral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.
- Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, en agua esterilizada o solución salina fisiológica, permite la constitución de soluciones inyectables.
- 35
- Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de varios parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento.
- 40 Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz de un polipéptido o un ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción puede disolverse o dispersarse en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.
- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de maní o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad inyectable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- 45
- Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.
- 50
- El agente bloqueante de TNF $\alpha$  según la presente descripción puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos



amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos particulares preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

También se contempla la preparación de soluciones más altamente concentradas o altamente concentradas para la inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, entregando altas concentraciones de los agentes activos en un área tumoral pequeña.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se puede tamponar adecuadamente y el diluyente líquido se vuelve primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosis podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarse a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosis necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej. tabletas u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada en la actualidad.

Las composiciones de la presente descripción pueden comprender un agente activo terapéutico adicional. También se describe en este documento un kit que comprende un agente bloqueante de TNF $\alpha$  de acuerdo con la descripción y un agente terapéutico activo adicional.

En particular, dicho agente terapéutico activo es un agente anticancerígeno. Por ejemplo, dichos agentes anticancerígenos incluyen, entre otros, vemurafenib, fotemustina, fludarabina, gemcitabina, capecitabina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiaurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, complejos de platino, cisplatina, carboplatino y oxaliplatina, mitomicina, dacarbazina, procarbizina, tenipósido, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, darrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, L-asparginasa, epimibicm, 5-fluorouracilo, taxanos como docetaxel y paclitaxel, leucovorin, levamisol, irinotecano, estramustina, etopósido, mostazas de nitrógeno, BCNU, nitrosoureas como el carmustina y la lomustina, alcaloides de la vinca como la vinblastina, la vincristina y la vinorelbina, la imatimb mesilato, hexamifemilamina, topotecán, inhibidores de la quinasa, inhibidores de la fosfatasa, inhibidores de la ATPasa, tirfostinas, inhibidores de la proteasa, inhibidores herbimicm A, genisteína, erbatatina y lavendustina A. En particular, se pueden seleccionar otros agentes anticancerígenos, entre otros, de uno o una combinación de la siguiente clase de agentes: agentes alquilantes, alcaloides vegetales, inhibidores de la ADN topoisomerasa, antifolatos, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos de ADN, taxanos, podofilotoxina, terapias hormonales, retinoides, fotosensibilizadores o terapias fotodinámicas, inhibidores de la angiogénesis, agentes antimitóticos, inhibidores de la isoprenilación, inhibidores del ciclo celular, actinomicinas, bleomicinas, antraciclina, inhibidores de MDR e inhibidores de Ca $^{2+}$  ATPasa.

Se pueden seleccionar otros agentes anticancerígenos, entre otros, entre citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores inhibidores del crecimiento, hormonas, receptores solubles, receptores señuelo, anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos mono-específicos, bis-específicos o multi-específicos, monocuerpos, policuerpos.

- 5 Se puede seleccionar otro agente anticancerígeno, entre otros, entre factores de crecimiento o hematopoyéticos tales como eritropoyetina y trombopoyetina, y agentes miméticos de factores de crecimiento de los mismos.

En los presentes métodos para tratar el cáncer, otro agente terapéutico activo puede ser un agente antiemético. Los agentes antieméticos adecuados incluyen, entre otros, metoclopramida, domperidona, proclorperazina, prometazina, clorpromazina, trimetobenzamida, ondansetrón, granisetron, hidroxizina, acetileucina monoemanolamina, alizaprida, azasetron, benzquinamida, bietanautina, bromoprida, buclizina, cleboprida, ciclizina, dunehidrinato, difenidol, dolasetron, meclizina, metallal, metopimazina, nabilona, oxipemdil, pipamazina, escopolamina, sulpirida, tetrahidrocannabinoides, tiefilperazina, tioproperazina y tropisetron. En particular, el agente antiemético es granisetron u ondansetrón.

15 En particular, el agente terapéutico activo adicional puede ser un factor estimulante de colonias hematopoyéticas. Los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas adecuados incluyen, entre otros, filgrastim, sargramostim, molgramostim y epoietina alfa.

Más particularmente, el otro agente activo terapéutico puede ser un agente analgésico opioide o no opioide. Los agentes analgésicos opioides adecuados incluyen, entre otros, morfina, heroína, hidromorfona, hidrocodona, oximorfona, oxicodona, metopon, apomorfina, nomioifina, etoipbina, buprenorfina, mepedina, lopermida, anileddina, etoheptazina, piminidina, betaprodina, difenoxilato, fentanilo, sufentanilo, alfentanilo, remifentanil, levorfanol, dextrometorfano, fenazodone, pemazocina, ciclazocino, metadona, isometadona y propoxifeno. Los agentes analgésicos no opioides adecuados incluyen, entre otros, aspirina, celecoxib, rofecoxib, diclofinac, diflusal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, indometacina, ketorolac, meclofenamato, ácido mefamámico, nabumetolona, naproxeno, piroxicam y sulindac.

25 Más particularmente, otro agente activo terapéutico puede ser un agente ansiolítico. Los agentes ansiolíticos adecuados incluyen, entre otros, buspirona y benzodiazepinas tales como diazepam, lorazepam, oxazepam, clorazepato, clonazepam, clordiazepóxido y alprazolam.

La presente descripción se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

### 30 Figuras

FIG. 1: crecimiento de melanoma B16 en ratones naturales y deficientes en TNF.

A, se incubaron células B16F10 y B16K1 con anti-MHCI (H2-K<sup>b</sup>) y anticuerpos secundarios anti-ratón acoplados a FITC (línea continua) o anticuerpo secundario solo (línea de puntos) antes del análisis por citometría de flujo.

35 B y C, se inyectaron por vía intradérmica y bilateral 3 x 10<sup>5</sup> células B16F10 (A) y B16K1 (B) en ratones C57BL/6 naturales y deficientes en TNF. El volumen tumoral se calculó utilizando un calibrador en los días indicados. Paneles izquierdos: los datos son medias ± sem de 3 experimentos independientes e incluyen de 7 a 15 ratones por cada grupo. Paneles derechos: se representan los valores determinados en los días indicados para cada tumor individual. D, un millón de células B16K1 se inyectaron por vía intradérmica y bilateral en ratones C57BL/6 WT y deficientes en TNF, y los ratones se sacrificaron 12 días después. Se recogieron tumores (n = 7-11) y se determinó la proporción de las poblaciones celulares indicadas por citometría de flujo. B-D, las barras representan valores medios (\*: p <0,05; \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,001).

FIG. 2: Impacto del agotamiento de las células T CD8 en el crecimiento del melanoma en ratones naturales y deficientes en TNF.

45 A, los ratones WT fueron inyectados o no con anticuerpo anti-CD8 y 3 días después, la proporción de células T CD8 circulantes se determinó por citometría de flujo.

50 B, se inyectaron ratones WT y deficientes en TNF cada 3 días con vehículo o anticuerpo anti-CD8. Tres días después de la primera inyección, se inyectaron 3 x 10<sup>5</sup> células B16K1 por vía intradérmica y bilateral. El volumen tumoral se calculó utilizando un calibrador en los días indicados. Paneles izquierdos: los datos son medias ± sem de 3 experimentos independientes e incluyen de 7 a 8 ratones por cada grupo. Paneles derechos: se indican valores para tumores individuales. Las barras representan valores medios (\*: p <0,05; \*\*\*: p <0,001).

FIG. 3: Impacto del bloqueo farmacológico del TNF en el crecimiento del melanoma en ratones naturales y deficientes en CD8.

fueron inyectados intraperitonealmente ratones WT (A y C) y con deficiencia de CD8 (B) cada 3 días con vehículo o Etanercept (3 mg/Kg). Tres días después de la primera inyección, se inyectaron 3 x 10<sup>5</sup> (A y B) o 1 millón (C) de

5 células B16K1 por vía intradérmica y bilateral. A y B, el volumen del tumor se calculó utilizando un calibrador en los días indicados. Paneles izquierdos: los datos son medias  $\pm$  sem de 2 experimentos independientes e incluyen de 6 a 7 ratones por cada grupo. Paneles derechos: en los días indicados, se representan valores para tumores individuales. Las barras representan valores medios. (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ). C, los ratones fueron sacrificados 12 días después de la inyección de B16K1. Se recogieron tumores ( $n = 5-6$ ) y se determinó la proporción de las poblaciones celulares indicadas por citometría de flujo. Se representan los valores determinados para cada tumor individual. Las barras representan valores medios (\*:  $p < 0,05$ ).

FIG. 4: Etanercept inhibe el crecimiento tumoral en el melanoma establecido.

10 Se inyectaron por vía intradérmica y bilateral  $3 \times 10^5$  células B16K1 en ratones naturales. Diez días después, se inyectó intraperitonealmente vehículo o Etanercept (3 mg/Kg) cada 3 días. El volumen tumoral se calculó utilizando un calibrador en los días indicados. Paneles izquierdos: los datos son medias  $\pm$  sem de 2 experimentos independientes e incluyen de 7 a 8 ratones por cada grupo. Paneles derechos: en los días indicados, se representan los valores para cada tumor individual. Las barras representan valores medios. (\*:  $p < 0,05$ ).

### Ejemplos

15 Materiales y métodos

Reactivos y Anticuerpos:

20 Las concentraciones o diluciones finales y las fuentes de reactivos fueron las siguientes: se adquirió TNF de ratón (1-50 ng/ml) de Peprotech. La inmunohistoquímica en melanoma humano y de ratón se realizó con TNF policlonal antihumano (Abcam, N°. ab6671, 1:600), TNF monoclonal antihumano (Abcam, N°. ab1793, 1:600), anticuerpo policlonal MECA79 (hibridoma proporcionado por el Dr. Girard, Instituto IPBS, Toulouse, Francia), CD8 anti-ratón (BD Pharmingen, N°. 550281, 1:100), CD31 anti-ratón (Abcam, N°. ab28364, 1:100). Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP o fluoróforo eran de Invitrogen. Los análisis de citometría de flujo se realizaron usando CD45 anti-ratón (eBioscience, N°. 48-0451-80, eFluor450), CD3 anti-ratón (Biolegend, N°. 100312, APC), CD8 anti-ratón (BD Pharmingen, N°. 557959, A700), CD4 anti-ratón (eBioscience, N°. 46-0041-80, PerCP eFluor 710), CD69 anti-ratón (BD Pharmingen, N°. 553236, FITC), MHC- anti-ratón I (hibridoma de ratón Y3), TNF-R1 anti-ratón (Biolegend, N°. 113006, APC), anticuerpos TNF-R2 anti-ratón (BD Pharmingen, N°. 550086), dextrámeros MHC I (H-2 K<sup>b</sup>/SVYDFVWL, SEQ ID NO: 1) (Immudex, 1:100, APC). Los controles de isotipo y los reactivos vivos muertos para citometría de flujo fueron de BD Pharmingen e Invitrogen, respectivamente. Etanercept fue proporcionado por el Dr. Astudillo (CHU, Toulouse, Francia).

30 Pacientes:

La aprobación del estudio se obtuvo de la junta de revisión científica del Instituto Claudius Regaud (ICR, Toulouse, Francia). Las muestras de melanoma primario fueron de pacientes operados entre 2000 y 2012 en el ICR y el CHU Toulouse Purpan.

Análisis inmunohistoquímico en muestras de melanoma humano:

35 La inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones consecutivas de 5  $\mu$ m de espesor de bloques tumorales embebidos en parafina usando un procesador de portaobjetos Techmate Horizon (Dako). Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron usando una cadena principal de polímero conjugado con peroxidasa acoplado a un sistema de anticuerpo secundario (EnVision; Dako) y cromógeno de 3,30-diamino-bencidina (Dako).

40 Líneas celulares:

45 Las líneas celulares C57BL/6 de melanoma B16F10, fibrosarcoma LPB y carcinoma pulmonar de Lewis se adquirieron de ATCC. B16K1 es una línea celular modificada genéticamente obtenida de células B16F10, que expresan de manera estable la molécula MHC de clase I H-2Kb. Las células Yumm son melanoma primario de ratón derivado de ratones *Braf*<sup>V600E/+</sup>, *PTEN*<sup>-/-</sup>, *Cdkn2a*<sup>-/-</sup> C57BL/6. Las células se cultivaron en medio DMEM que contenía 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS).

Ratones:

50 Se compraron en los laboratorios Jackson ratones C57BL/6 deficientes en TNF (N°. 5540), deficientes en TNF-R1 (N°. 2818) y deficientes en TNF-R2 (N°. 2620). Los ratones WT C57BL/6 eran de Janvier. Los ratones CD8 KO fueron un regalo del profesor J. Van Meerwijk (Inserm U1043, Toulouse, Francia). Los ratones fueron alojados en habitaciones con temperatura controlada en una instalación específica para animales sin patógenos (plataforma Anexplo, Toulouse, Francia), mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y con acceso ilimitado a alimentos y agua. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las políticas nacionales e internacionales y fueron aprobados por el comité local para la experimentación con animales.

Tumorigenesis in vivo:

Se inyectaron por vía intradérmica y bilateral  $3 \times 10^5$  células B16F10 o B16K1 en ratones naturales, TNF KO, TNF-R1 KO, TNF-R2 KO y CD8 KO C57BL/6. En algunos experimentos, se inyectó intraperitonealmente Etanercept (3 mg/Kg) o vehículo (NaCl 0,9%) cada tres días antes (tratamiento preventivo) o después (tratamiento curativo) del injerto B16K1. El volumen tumoral se calculó utilizando un calibrador en los días indicados.

#### 5 Análisis de respuesta inmune en ratones:

Un millón de células B16K1 se inyectaron por vía intradérmica y bilateral en ratones C57BL/6 TNF KO o TNF-R1 KO o naturales. En los días 10-12, se sacrificaron los ratones y se recogieron los ganglios linfáticos de drenaje de cada extremidad, se agruparon las células de los ganglios linfáticos y se contaron con una reja (Beckman Coulter) y se incubaron con los anticuerpos indicados y el reactivo vivo-muerto. Las células se analizaron por citometría de flujo (BD LSRFortessa), los análisis se restringieron a células viables. Alternativamente, las células de los ganglios linfáticos se reestimularon con B16K1 irradiado con 120 Gy durante 3 días, y las citocinas secretadas en el medio de cultivo se midieron mediante conjuntos de cuentas citométricas (BD Cytometric Bead Assay, ratón Th1/Th2/Th17, N°. 560485), según las instrucciones del fabricante. Los tumores se recogieron y se digirieron con colagenasa D (Roche Diagnostics, N°. 11088866001) durante 30 minutos a 37°C. Las células se tiñeron con los anticuerpos indicados o dextrámeros MHC I (H-2 K<sup>b</sup> conjugado con APC/SVYDFFVWL, SEQ ID NO: 1) y reactivos vivos-muertos antes del análisis por citometría de flujo. Alternativamente, los tumores se incrustaron en OCT (compuesto Tissus Tek OCT, Sakura, N°. 62550-01), se congelaron bajo nitrógeno y se cortaron usando un criostato. Los portaobjetos se tiñeron con DAPI y los anticuerpos indicados para la inmunohistoquímica y se analizaron por microscopía confocal (Zeiss, LSM510). Al menos, se analizaron dos portaobjetos por tumor para determinar la frecuencia de HEV. Las células CD8<sup>+</sup> que exhiben morfología linfoide se cuantificaron en una región de 100  $\mu$ m de diámetro alrededor de los vasos HEV (MECA79+) y no HEV (CD31+ MECA79-).

#### Análisis de células T CD8 purificadas:

Se purificaron células T CD8 del bazo de ratones TNF-R1 KO y TNF-R2 KO y naturales sin tratar utilizando el kit de purificación de células T CD8 de ratón (Miltenyi Biotec, N°. 130-104-075). Las células T CD8 se activaron, o no, con perlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 (Life Technologies, N°. 11456D) en presencia de IL-2 (Invitrogen, N°. PMC0025, 200 U/ml) entre 7 y 10 días previos al análisis para la expresión de TNF-R1 y 2 por citometría de flujo. Las células T CD8 recién preparadas y activadas se incubaron durante 72 h en presencia de TNF de ratón recombinante (Peprotek, N°. 315-01A, 1-50 ng/ml). La muerte celular se evaluó monitoreando el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática hacia 7-AAD (eBioscience, N°. 00-6993-50, 1:30) por citometría de flujo.

#### 30 Transferencia adoptiva en ratones con deficiencia de CD8:

Se aislaron células T CD8<sup>+</sup> de ratones WT y TNFR1<sup>-/-</sup> y se activaron como se describió anteriormente. Después de 7 días, la pureza celular y la viabilidad promediaron 90% para las células T CD8<sup>+</sup> WT y deficientes en TNFR1. Tres millones de estas células T WT o TNFR1<sup>-/-</sup> CD8<sup>+</sup> se inyectaron en los tumores B16K1 de ratones con deficiencia de CD8, que se inyectaron 10 días antes con 1 millón de células B16K1. Tres días después, se sacrificaron los animales y se analizó el contenido de células T CD8<sup>+</sup> tumorales mediante citometría de flujo.

#### Análisis estadístico:

Los resultados se expresan como medias de al menos tres determinaciones independientes por experimento. Los valores medios se compararon mediante la prueba t de Student (versión Préciser del software Prism). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando  $P < 0,05$  (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; n.s.: no significativo).

#### Resultados

El TNF es abundante en el melanoma primario humano con infiltración masiva de células T CD8.

Dos estudios recientes indican que la alta densidad de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) está asociada con la formación de HEV en el melanoma primario humano. Inicialmente, se evaluaron por inmunohistoquímica la expresión de TNF en melanoma primario humano que presentaba un contenido bajo o alto de CD8<sup>+</sup> TIL y densidad de HEV. Mientras que el TNF se expresaba mínimamente, o incluso no se expresaba en absoluto, en la región de la piel peritumoral y los nevos normales, el TNF se expresaba a niveles altos en melanomas que exhibían una fuerte infiltración de células T CD8 y una alta densidad de HEV (datos no mostrados). De hecho, la inmunodetección de TNF fue obvia en las regiones de melanoma que exhibían una alta infiltración de linfocitos, en la que diferentes tipos de células del estroma, incluidos fibroblastos, células mieloides y células endoteliales, se tiñeron con anticuerpos anti-TNF (datos no mostrados). El TNF también se expresó en las células de melanoma, que estaban muy cerca de las TIL (datos no mostrados). En marcado contraste, el melanoma sin TIL, así como las regiones infiltradas no linfocitarias del melanoma con TIL, mostraron una expresión de TNF nula o mínima en las células del estroma y el melanoma (datos no mostrados). Se hicieron observaciones similares usando otro anticuerpo anti-TNF (datos no mostrados).

Por lo tanto, la alta expresión de TNF se asoció con la infiltración de melanoma de linfocitos, lo que está de acuerdo con informes anteriores que muestran que las citocinas inflamatorias están reguladas por aumento en el melanoma que exhibe alta densidad de HEV y TIL CD8+.

El crecimiento de células inmunógenas de melanoma B16 está deteriorado en ratones con deficiencia de TNF.

5 Para evaluar si el TNF es instrumental en la respuesta inmune dependiente de las células T anti-melanoma CD8+, se expusieron a los ratones naturales (WT) y deficientes en TNF a una inyección ortotópica (es decir, intradérmica) de líneas celulares de melanoma de ratón B16. Se seleccionaron B16F10 y B16K1, que expresan constitutivamente MHC1 a niveles bajo y alto, respectivamente (Figura 1A). Ambas líneas celulares de melanoma B16 exhibieron tasas de proliferación celular in vitro similares (datos no mostrados) y expresaron TNF-R1, pero no TNF-R2 (datos no mostrados). El TNF exógeno no alteró la proliferación de células B16 in vitro (datos no mostrados) y el crecimiento de esferoides (datos no mostrados). Por lo tanto, de acuerdo con un informe anterior, es poco probable que el TNF ejerza directamente un potente efecto pro- o anti-proliferativo hacia las células de melanoma B16. Las células B16F10 crecieron mucho más rápido en ratones WT (es decir, inmunocompetentes) que las células B16K1 (Figuras 1B y 1C), lo que indica que las células B16K1 son, de hecho, más inmunogénicas. Mientras que el crecimiento tumoral in vivo de B16F10 se redujo mínimamente en ratones TNF-/- (Figura 1B), el de B16K1 se vio drásticamente afectado en todo momento (Figura 1C).

El papel de los receptores de TNF del huésped se evaluó a continuación comparando el crecimiento tumoral B16 en ratones WT y TNF-R1 -/- o TNF-R2 -/- (datos no mostrados). Mientras que B16F10 crecía de manera similar en ratones WT y con deficiencia de TNF-R (datos no mostrados), el crecimiento tumoral de B16K1 se redujo significativamente en ratones TNF-R1 -/-, pero no en ratones TNF-R2 -/- (datos no mostrados). Por lo tanto, nuestros datos indican que el TNF del huésped desempeña un papel principal de promoción del tumor dependiente del TNF-R1 del huésped en el desarrollo del melanoma de ratón inmunogénico (es decir, que expresa MHC1 a niveles altos).

La contribución del TNF del huésped al crecimiento tumoral se evaluó luego usando dos líneas celulares de melanoma adicionales. El crecimiento tumoral de B16-BL6 (MHC1<sup>blaj6</sup>) no se vio afectado significativamente en ratones TNF-/- (datos no mostrados). En contraste, células primarias BrafV600E/+, Pten-/-, Cdkn2a-/- C57BL/6 de melanoma de ratón (células Yumm), que expresaban constitutivamente MHC1 a niveles altos, mostraban una reducción significativa del crecimiento tumoral en ratones TNF-/- (datos no mostrados). El papel del TNF del huésped en la tumorigénesis también se evaluó hacia el fibrosarcoma LPB y el carcinoma de pulmón de Lewis, que expresaba espontáneamente MHC1 a niveles altos y bajos, respectivamente (datos no mostrados). Mientras que el crecimiento tumoral de fibrosarcoma LPB se veía gravemente afectado en ratones con deficiencia de TNF en todo momento, el carcinoma de pulmón de Lewis se veía mínimamente afectado (datos no mostrados).

En conjunto, los datos de los inventores indican que el nivel de expresión de MHC1 en la superficie celular de las células tumorales está correlacionado con el grado de inhibición del crecimiento inducido por la deficiencia de TNF.

La respuesta inmune dependiente de células T CD8 y la infiltración tumoral se potencian en ratones con deficiencia de TNF.

Las consecuencias de la deficiencia de TNF del huésped en la respuesta inmune se investigaron a continuación. Con este fin, se inyectó ortotópicamente a los ratones WT y deficientes en TNF 1 millón de células B16K1 y se sacrificaron 12 días después. Según el protocolo experimental de los inventores, los pesos de los tumores B16K1 se redujeron significativamente en ratones con deficiencia de TNF (datos no mostrados), lo que confirmaba aún más el papel promotor del tumor del TNF del huésped hacia el melanoma de ratón inmunogénico. Los números absolutos de leucocitos CD45+, así como las células T CD4+ y CD8+ aumentaron significativamente en el drenaje de los ganglios linfáticos de ratones con deficiencia en TNF (datos no mostrados). El análisis de CD69, un marcador de activación de células T, indicó que el número de células T CD4 y CD8 activadas fue mayor en ratones con deficiencia de TNF (datos no mostrados). Tras la reestimulación de las células de los ganglios linfáticos con células B16K1 irradiadas, la producción de IFN $\gamma$ , IL-6 e IL-10 se mejoró por la deficiencia de TNF (datos no mostrados). Es de destacar que IL-17 e IL-4 no se detectaron en las condiciones experimentales de los inventores.

El análisis del contenido tumoral leucocitario por citometría de flujo indicó un aumento importante de la infiltración tumoral de células CD45+ y CD3+ en ratones deficientes en TNF en comparación con ratones WT (Figura 1D). Además, la proporción del contenido de leucocitos se alteró en los tumores derivados de ratones con deficiencia en TNF, con un aumento significativo de las células T CD4+ y CD8+ (Figura 1D), incluidas las células Treg (Foxp3+ CD4+) y CD8+ específicas de melanoma B16, según lo evaluado por la tecnología de dextrámeros (datos no mostrados). Es de destacar que la proporción de células T CD8+ frente a células T CD4+ fue significativamente mayor en tumores de ratones con deficiencia en TNF (datos no mostrados). Además, la proporción de MDSC intratumoral (Gr1 + CD11b +) no se vio afectada por la deficiencia de TNF (datos no mostrados).

55 Estudios recientes han indicado que la densidad de HEV está directamente relacionada con la infiltración de células T CD8 en tumores humanos y de ratón, incluidos los melanomas (32-36). Se ha intentado evaluar mediante inmunohistoquímica si la infiltración de células T CD8 se asociaba con la diferenciación de HEV en tumores de ratón B16 desarrollados en ratones WT y con deficiencia en TNF (datos no mostrados). Doce días después de la inyección

intradérmica de células B16K1, mientras que solo el 20% de los tumores de ratones WT mostraban HEV (denominados vasos MECA-79+), el 65% de los tumores de ratones deficientes en TNF eran positivos para HEV (datos no mostrados). Luego se cuantificó el número de células T CD8 (células CD8+ con características morfológicas linfoides) que rodeaban los vasos HEV (CD31+ MECA79+) y no HEV (CD31+ MECA79-) (datos no mostrados). Tanto en ratones WT como con deficiencia en TNF, el número de células T CD8 era mayor junto a los vasos HEV que alrededor de los vasos MECA79- CD31+ (datos no mostrados). Estos datos indican que los HEV son funcionales y representan una puerta de entrada principal para la infiltración de tumores de células T CD8 en melanoma, independientemente de la expresión de TNF en células estromales. Además, la densidad de las células T CD8 fue mayor junto a los vasos no HEV de ratones TNF-/- en comparación con sus contrapartes WT, argumentando además que el TNF huésped reduce la infiltración de melanoma de células T CD8. También se encontraron abundantes vasos HEV en tumores derivados de ratones TNF-R1-/- y TNF-R2-/- (datos no mostrados). De hecho, la densidad de células T CD8 junto a los HEV se incrementó significativamente en ratones TNF-R1 -/- (datos no mostrados), lo que indica que el TNF huésped perjudica la infiltración de melanoma de células T CD8 principalmente de una manera dependiente de TNF-R1.

En conjunto, los datos de los inventores indican que el TNF es poco probable instrumental en la diferenciación de HEV y la infiltración de células T CD8 dentro del melanoma, sino que constituye una retroalimentación negativa para ambos eventos en las condiciones experimentales de los inventores.

El contenido de linfocitos infiltrantes de tumor CD8+ (TIL) aumenta en ratones con deficiencia de TNF-R1.

El papel de los receptores de TNF del huésped se evaluó luego comparando el crecimiento tumoral de B16K1 en ratones WT y TNF-R1-/- o TNF-R2-/- . El crecimiento del tumor B16K1 se redujo significativamente en ratones que carecen de TNF-R1 pero no TNF-R2 (datos no mostrados), lo que indica que el eje TNF/TNF-R1 del huésped promueve el desarrollo de melanoma de ratón inmunogénico. Se presume que la señalización de TNF dependiente de TNF-R1 del huésped deteriora la respuesta inmune dependiente de células T CD8+. De acuerdo con este principio, el contenido de CD8+ TIL se incrementó en ratones con deficiencia de TNF-R1 de manera similar a los ratones con deficiencia de TNF (datos no mostrados), incluidas las células T CD8+ específicas de TRP2 (datos no mostrados), según se evaluó usando tecnología de dextrámero MHC-I. Además, abundantes vasos HEV rodeados por una alta densidad de células T CD8 se encontraron con frecuencia en tumores derivados de ratones TNF-R1-/- (5 de 6 tumores exhibieron HEV) (datos no mostrados). Por lo tanto, el huésped TNF-R1 reduce el contenido de HEV y células T CD8+ dentro del melanoma.

El TNF desencadena la muerte de células T CD8 activada principalmente en una forma dependiente de TNF-R1.

Se intentó evaluar si las células T CD8 deficientes en TNF mostraban alteraciones intrínsecas que podían explicar las observaciones anteriores. Las células T CD8 de ratones no tratados WT y deficientes en TNF se purificaron, se estimularon con perlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28, y se evaluó la proliferación (datos no mostrados) y la secreción de IFN $\gamma$  (datos no mostrados). Ninguna de esas respuestas biológicas fue alterada por la deficiencia de TNF, lo que indica que las células T CD8 deficientes en TNF no exhiben alteraciones intrínsecas importantes en las condiciones experimentales de los inventores.

El análisis de la expresión del receptor de TNF en células T CD8 purificadas, indicó que las células T CD8 recién aisladas expresaban TNF-R2 pero no TNF-R1 (datos no mostrados). Tras la estimulación policlonal, la expresión de TNF-R2 estaba fuertemente regulada al alza. Además, TNF-R1 se expresaba significativamente en la superficie de las células T CD8 activadas (datos no mostrados). Ni la proliferación celular ni la muerte celular se vieron afectadas por la deficiencia de TNF-R1 tras la activación policlonal (datos no mostrados). Siete días después de la activación policlonal, se inyectaron células T CD8+ deficientes en TNF-R1 o competentes en los tumores B16K1 desarrollados en ratones deficientes en CD8. Tres días después, se sacrificaron los ratones y se analizó el contenido de células T CD8+ en los tumores. De hecho, la deficiencia de TNF-R1 mejoró significativamente la acumulación de células T CD8+ vivas en los tumores (datos no mostrados). Los últimos datos sugieren que TNF perjudica el contenido de CD8+ TIL a través de un efecto directo sobre las células T CD8+ activadas de una manera dependiente de TNF-R1. Un supuesto mecanismo subyacente podría ser la inducción de la muerte celular de las células T CD8+ activadas. Debido a que esta hipótesis es técnicamente difícil de evaluar in vivo, se examinó a continuación la sensibilidad in vitro de las células T CD8+ purificadas al TNF exógeno mediante el monitoreo de la captación de 7AAD para analizar la permeabilidad de la membrana plasmática (datos no mostrados). Las células T WT CD8 recién aisladas fueron completamente resistentes al TNF en todas las dosis. Diez días después de la estimulación policlonal, el TNF desencadenó la muerte activada de células T CD8 naturales (datos no mostrados). Cabe destacar que el efecto citotóxico del TNF sobre las células T CD8 naturales activadas ya se detectaba a una concentración tan baja como 5 ng/ml (datos no mostrados). Además, la muerte de células T CD8 inducida por TNF se asociaba con la activación de caspasa-3, según lo evaluado por citometría de flujo (datos no mostrados). La deficiencia de TNF-R1 y, en menor medida, la deficiencia de TNF-R2 deterioraron la muerte celular exógena inducida por TNF (datos no mostrados) y la activación de caspasa 3 (datos no mostrados) en células T CD8 activadas.

En conjunto, estos hallazgos indican que la muerte de células T CD8 activada por TNF, principalmente de una manera dependiente de TNF-R1, probablemente contribuye a la resolución de la respuesta inmune de las células T CD8.

El efecto pro-tumorogénico del TNF hacia el crecimiento del melanoma B16 se anula en ratones con deficiencia de CD8.

5 Para evaluar si la deficiencia de TNF del huésped perjudica el crecimiento de células de melanoma B16 al mejorar la infiltración tumoral de células T CD8, las células T CD8 se agotaron tanto en ratones WT como con deficiencia en TNF (Figura 2). De hecho, la inyección de anticuerpos anti-CD8 redujo eficazmente las células T CD8 + (Figura 2A) y restableció completamente el crecimiento tumoral B16K1 en ratones con deficiencia de TNF (Figura 2B). Es de destacar que el crecimiento del tumor B16K1 era idéntico en ratones con deficiencia de TNF y prósperos agotados para las células T CD8+, lo que indica que los efectos promotores del melanoma del TNF del huésped probablemente dependen de la modulación de la respuesta inmune dependiente de células T CD8.

10 Para investigar más a fondo el papel del TNF en el crecimiento del melanoma B16 y la respuesta inmune, se inyectó intraperitonealmente a ratones naturales Etanercept, un TNF-R2 humano soluble que neutraliza eficientemente el TNF de ratón. Se inyectó etanercept 3 días antes de inyectar células B16K1 y cada tres días hasta 23 días. En todo momento, Etanercept neutralizó eficazmente el TNF (datos no mostrados) e impidió significativamente el crecimiento de B16K1 en ratones inmunocompetentes (Figura 3A). En marcado contraste, Etanercept no tuvo efecto sobre el crecimiento de B16K1 en ratones con deficiencia de CD8 (Figura 3B) y en ratones desnudos (datos no mostrados).  
15 En consecuencia, Etanercept mejoraba la respuesta inmune dependiente de células T CD8 en los ganglios linfáticos (datos no mostrados) y la infiltración tumoral de células T CD8 (Figura 3C).

20 Posteriormente se evaluó si Etanercept podía representar un supuesto agente terapéutico contra el melanoma inmunogénico. Con este fin, se desarrolló un protocolo curativo injertando a ratones WT con células B16K1 e inyectándoles 10 días después Etanercept. Curiosamente, el Etanercept redujo significativamente el crecimiento tumoral en ratones WT que tenían tumores establecidos (Figura 4), lo que indica que el bloqueo de TNF puede ser una estrategia terapéutica útil para luchar contra el melanoma inmunogénico. Cabe destacar que una sola inyección de Etanercept desencadenaba tanto la diferenciación del HEV como la infiltración de las células T CD8 en el melanoma según lo evaluado por inmunohistoquímica (datos no mostrados).

25 Colectivamente, los datos de los inventores demuestran que la acción promotora de tumores del TNF del huésped en el crecimiento del melanoma B16 depende completamente de su capacidad para bloquear la activación de las células T CD8 y la infiltración tumoral. El bloqueo de TNF mejora el contenido de CD8+ TIL y perjudica el crecimiento de melanoma inmunogénico en ratones.

#### Conclusión

30 En conclusión, los resultados de los inventores (véase también Bertrand F. et al, en prensa) permiten identificar una nueva población de pacientes con melanoma y susceptibles de responder positivamente a un tratamiento con un agente bloqueador anti-TNF como el Etanercept. Esta población tiene células de melanoma, que sobreexpresan el MHC1, y células de estroma, que producen TNF $\alpha$ . Esta es la primera vez que se identifica a dicha población. El bloqueo de TNF o TNF-R1 puede mejorar el contenido de CD8+ TIL y, por lo tanto, limitar la progresión del melanoma en dicha población.  
35

#### Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

Balkwill, F. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9:361-371.

40 Batycka-Baran Aleksandra, Michael Flaig, Sonja Molin, Thomas Ruzicka & Joerg C Prinz. Etanercept-induced injection site reactions: potential pathomechanisms and clinical assessment. *Expert Opin. Drug Saf.* (2012) 11(6).

Bertrand Florie, Julia Rochotte, Céline Colacios, Anne Montfort, Anne Françoise Tilkin-Mariamé, Christian Touriol, Philippe Rochaix, Isabelle Lajoie-Mazenc, Nathalie Andrieu-Abadie, Thierry Levade, Hervé Benoist and Bruno Ségui. Blocking Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  enhances CD8 T cell-dependent immunity in experimental melanoma. *Cancer Research* in press.

45 Chopra, M., Riedel, S.S., Biehl, M., Krieger, S., von Krosigk, V., Bauerlein, C.A., Brede, C., Jordan Garrote, A.L., Kraus, S., Schafer, V., et al. 2013. Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis* 34:1296-1303.

Konstantinos A. Papadakis and Stephan R. Targan. Tumor Necrosis Factor: Biology and Therapeutic Inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119:1148-1157.

50 Li, B., Vincent, A., Cates, J., Brantley-Sieders, D.M., Polk, D.B., and Young, P.P. 2009. Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res* 69:338-348.

Marriott J Blake. TNF- $\alpha$  antagonists: monoclonal antibodies, soluble receptors, thalidomide and other novel approaches. *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1997) 6(8):1105-1108.

- Martinet, L., Le Guellec, S., Filleron, T., Lamant, L., Meyer, N., Rochaix, P., Garrido, I., and Girard, J.P. 2012. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 1:829-839.
- 5 Menon, D.R., Wels, C., Bonyadi Rad, E., Joshi, S., Knausz, H., Lade-Keller, J., Brandner, J.M., and Schaidler, H. 2013. TGF-beta1 and TNF-alpha differentially regulate Twist 1 mediated resistance towards BRAF/MEK inhibition in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:912-916.
- Palmieri G1, Morrone S, Lollini PL, De Giovanni C, Nicoletti G, Nanni P, Frati L, Santoni A. TNF impairs in vivo and in vitro natural killer (NK) susceptibility of B16 melanoma cells. *Scand J Immunol.* 1992 Mar;35(3):279-87.
- 10 Poturoglu Sule, Sabahattin Kaymakoglu, Nuray Gurel Polat, Duygu Ibrism, Emel Ahishali, Filiz Akyuz, Selim Badur, Kadir Demir & Zeynel Mungan. A new agent for tumour necrosis factor-alpha inhibition. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation.* Vol. 69, No. 6, October 2009, 696-702.
- Shire Mary G & George W Muller. TNF-a inhibitors and rheumatoid arthritis. *Exp. Opin. Ther. Patents* (1998) 8(5):531-544.
- 15 Smith Michael P., Berta Sanchez-Laorden, Kate O'Brien, Holly Brunton, Jennifer Ferguson, Helen Young, Nathalie Dhomen, Keith T. Flaherty, Dennie T. Frederick, Zachary A. Cooper, Jennifer A. Wargo, Richard Marais and Claudia Wellbrock. The Immune Microenvironment Confers Resistance to MAPK Pathway Inhibitors through Macrophage-Derived TNF $\alpha$ . *Cancer Discovery* October 2014 4; 1214.
- 20 Wilmott JS1, Haydu LE, Menzies AM, Lum T, Hyman J, Thompson JF, Hersey P, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Dynamics of chemokine, cytokine, and growth factor serum levels in BRAF-mutant melanoma patients during BRAF inhibitor treatment. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2505-13. doi: 10.4049/jimmunol.1302616. Epub 2014 Jan 31.
- Wollheim Frank A. TNF inhibition as therapy for rheumatoid arthritis. *Exp. Opin. Investig* (2002) 11(7):947-953.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agente bloqueador de TNF $\alpha$  para su uso en un método para el tratamiento del melanoma en un sujeto en el que dicho método comprende los pasos de: i) el nivel de expresión de MHC1 en las células de melanoma se determina en una muestra obtenida del sujeto y el nivel de expresión de TNF en células de estroma se determina en una muestra obtenida del sujeto, ii) los niveles de expresión determinados en el paso i) se comparan con los valores de referencia predeterminados y iii) el sujeto se administra con una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho agente bloqueador TNF $\alpha$  cuando los niveles determinados en el paso i) son superiores a su valor de referencia predeterminado en el que el agente de bloqueo TNF $\alpha$  se selecciona del grupo formado por anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anticuerpos anti-TNF-R1 y proteínas de fusión recombinante que consisten en dos partes extracelulares del receptor 2 (p75) de TNF $\alpha$  soluble unido por el fragmento de Fc de una molécula IgG1 humana.
- 10 2. El agente de bloqueo de TNF $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de bloqueo de TNF $\alpha$  es el etanercept.
3. El agente de bloqueo de TNF $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de bloqueo de TNF $\alpha$  es un anticuerpo monoclonal.
- 15 4. El agente de bloqueo de TNF $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal es el infliximab o el adalimumab.
5. El agente de bloqueo de TNF $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de bloqueo de TNF $\alpha$  es un anticuerpo TNF-R1.

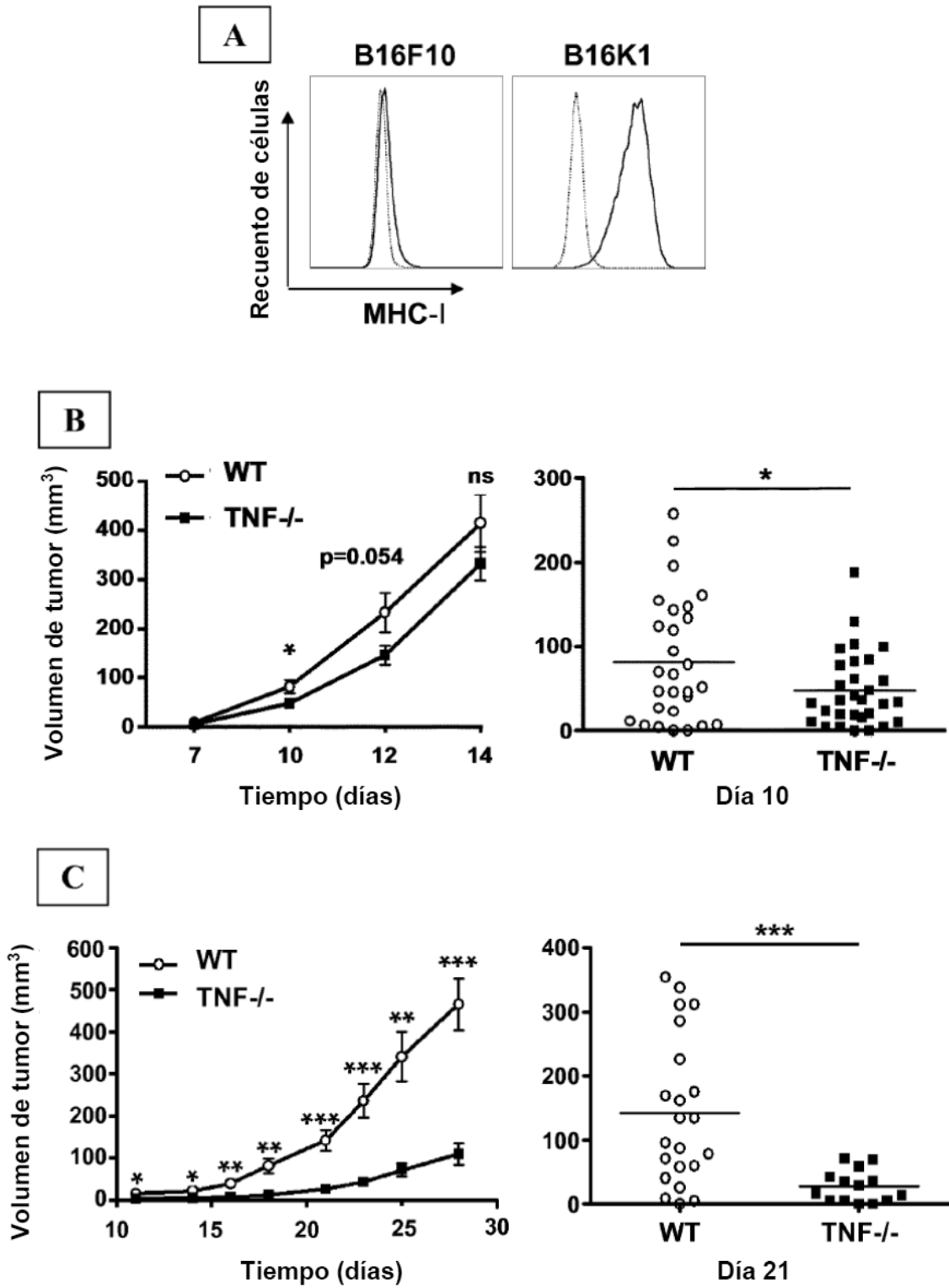


Figura 1 A, B y C

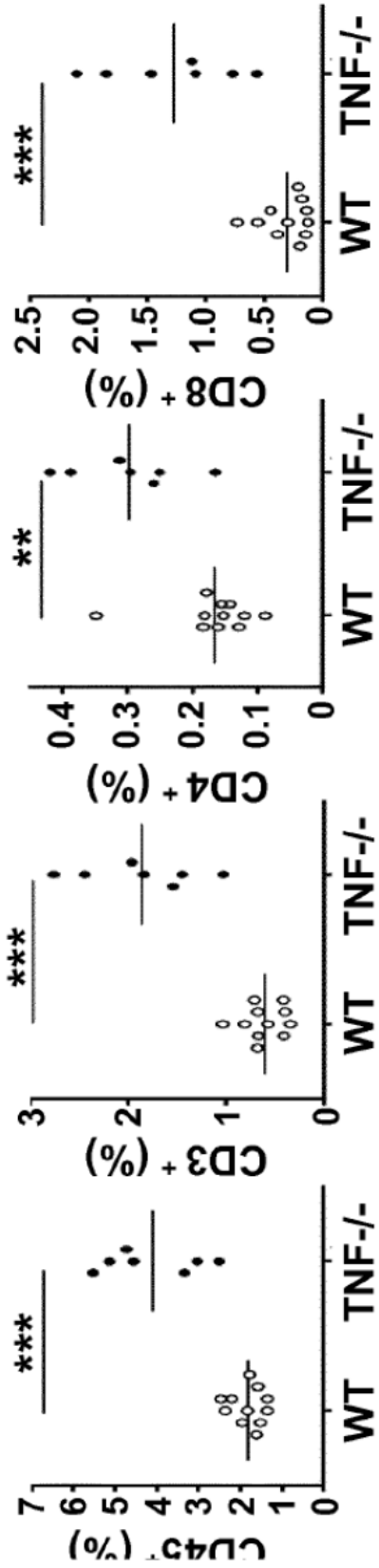


Figura 1 D

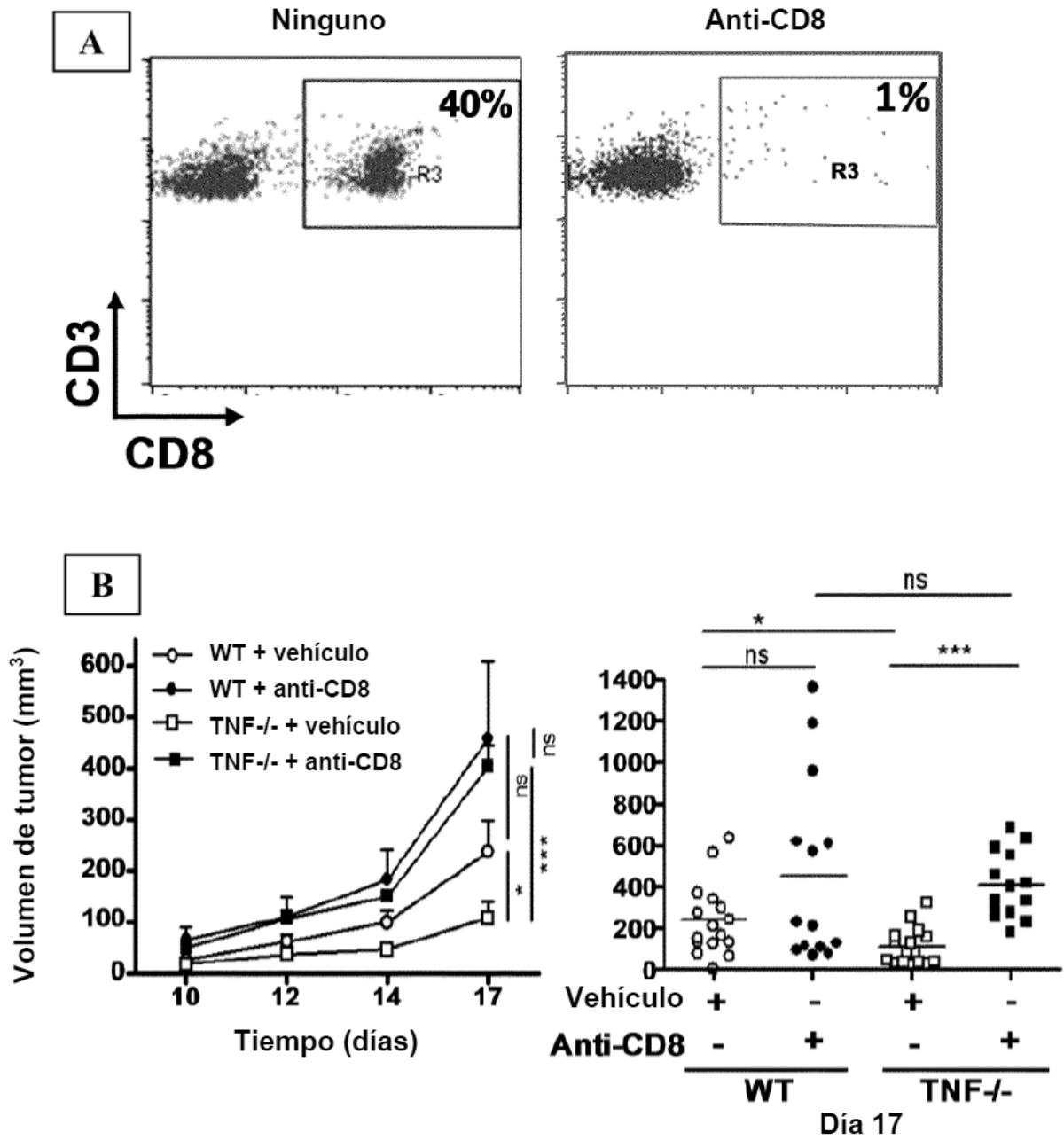
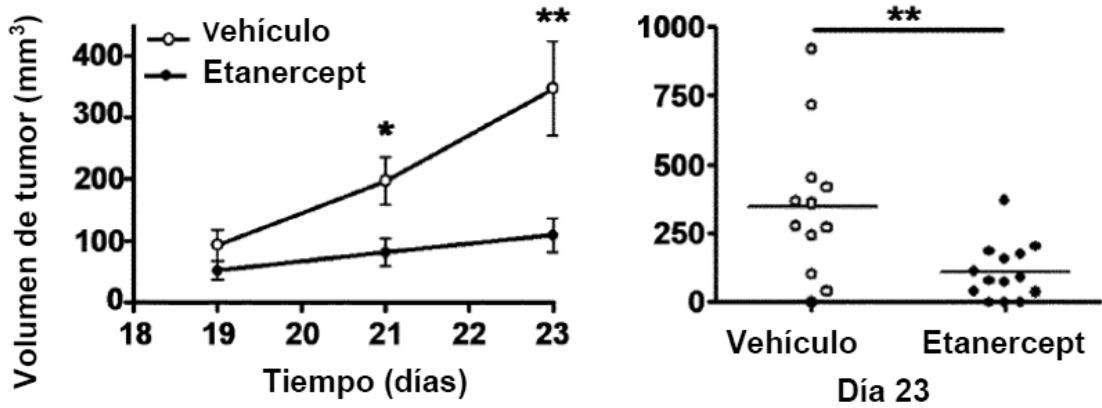
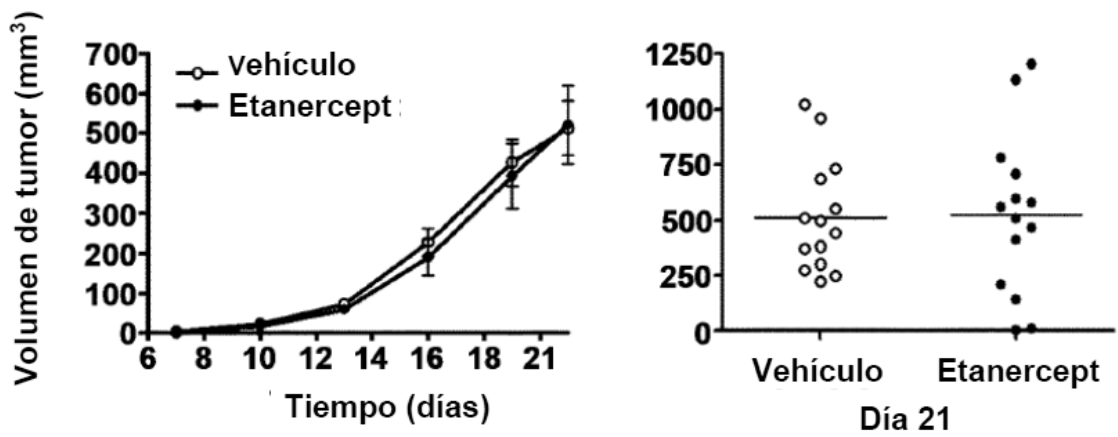


Figura 2 A y B

**A**



**B**



**C**

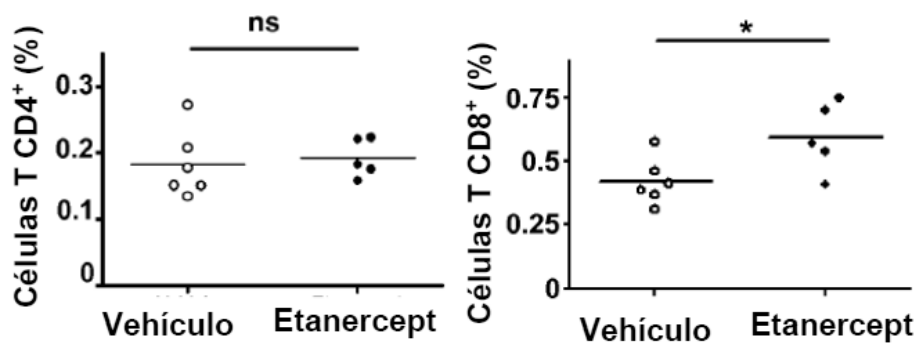


Figura 3 A, B y C

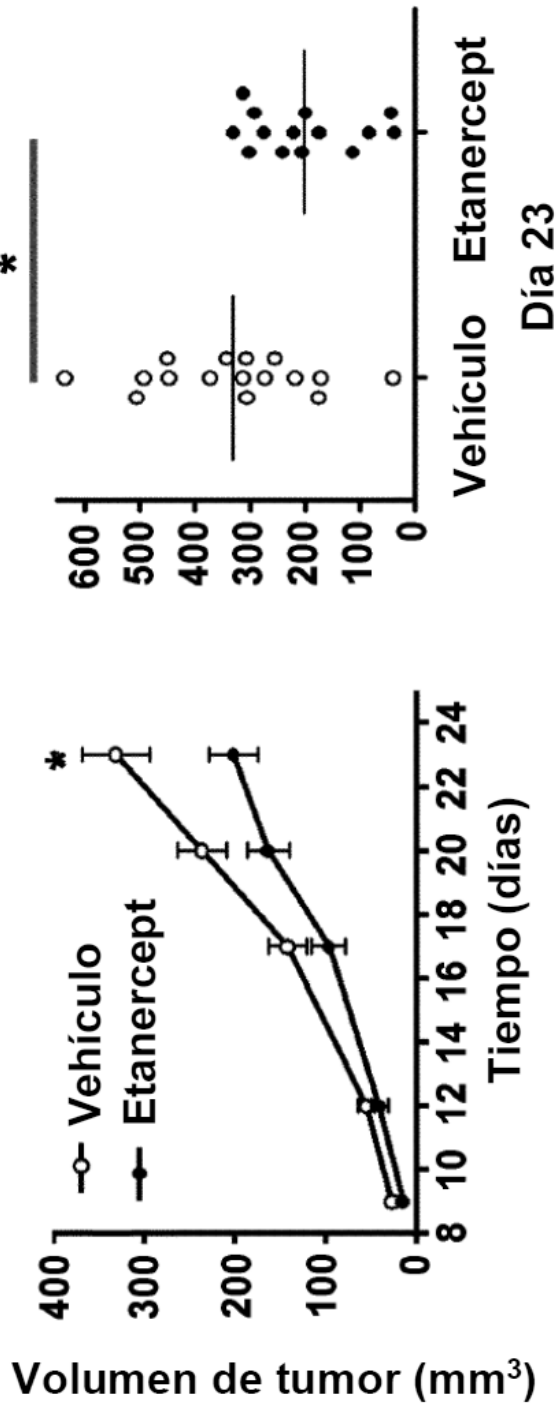


Figura 4