

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 741**

51 Int. Cl.:

| | | |
|---------------------|------------------------------|-----------|
| A61K 31/133 | (2006.01) A61P 35/00 | (2006.01) |
| A61K 31/137 | (2006.01) A61K 45/06 | (2006.01) |
| A61K 31/40 | (2006.01) G01N 33/569 | (2006.01) |
| A61K 31/415 | (2006.01) G01N 33/574 | (2006.01) |
| A61K 31/4245 | (2006.01) | |
| A61K 31/426 | (2006.01) | |
| A61K 31/4535 | (2006.01) | |
| A61K 39/395 | (2006.01) | |
| A61K 39/00 | (2006.01) | |
| C07K 16/28 | (2006.01) | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017 PCT/EP2017/051812**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129769**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017 E 17703076 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2022 EP 3407912**

54 Título: **Métodos para incrementar la potencia de los inhibidores del punto de control inmunitario**

30 Prioridad:

28.01.2016 EP 16305084

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2022

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III
(33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
TOULOUSE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LEVADE, THIERRY;
MEYER, NICOLAS;
COLACIOS VIATGÉ, CÉLINE;
IMBERT, CAROLINE;
ANDRIEU-ABADIE, NATHALIE y
SEGUI, BRUNO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 924 741 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

Métodos para incrementar la potencia de los inhibidores del punto de control inmunitario

5 **Campo**

La presente divulgación se encuentra en el campo de la medicina, en particular la oncología y la inmunología.

10 **Antecedentes**

10 La capacidad del sistema inmunitario para detectar y eliminar el cáncer se propuso por primera vez hace más de 100 años. Desde entonces, se han detectado células T reactivas contra antígenos asociados a tumores en la sangre de pacientes con muchos tipos de cánceres diferentes, lo que sugiere un papel del sistema inmunitario en la lucha contra el cáncer. Sin embargo, los tumores pueden escapar de la inmunidad del huésped mediante la manipulación del microentorno tumoral y la impulsión de la inmunosupresión, lo que significa que los pacientes 15 no pueden generar una respuesta inmunitaria suficientemente potente como para eliminar por completo las células cancerosas. El objetivo de la inmunoterapia es restablecer o aumentar las respuestas inmunitarias antitumorales. Una mayor comprensión de la inmunología tumoral ha conducido a la identificación de novedosas dianas para los nuevos enfoques basados en el sistema inmunitario, incluyendo un grupo de moléculas de superficie celular conocidas como proteínas del punto de control inmunitario. En particular, los anticuerpos monoclonales que inhiben CTLA-4 (ipilimumab) o PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) han demostrado una eficacia significativa en el tratamiento de melanoma metastásico, fomentando una alta tasa de respuesta y un control tumoral de larga duración. A pesar de los resultados prometedores, aproximadamente el 40% de los 20 pacientes no muestran una respuesta terapéutica y una proporción significativa de los pacientes que responden al tratamiento experimentan una recaída tumoral en los 2 años posteriores a la inducción del tratamiento. Además, ensayos clínicos recientes que combinan inhibidores del punto de control y BRAF han demostrado una alta toxicidad hepática para los pacientes con melanoma con mutación en BRAF. Por consiguiente, se necesita de manera urgente el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas con el fin de incrementar la potencia del inhibidor del punto de control inmunitario.

30 Los metabolitos esfingolípidos, incluyendo ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina y esfingosina-1-fosfato (S1P), han surgido como moléculas de señalización bioactivas que regulan la motilidad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia celular, así como la angiogénesis, la inflamación y la inmunidad. Recientemente se demostró una producción aumentada de SIP en células de melanoma (2, 3). Este metabolito esfingolípido bioactivo se produce principalmente por la esfingosina cinasa 1 (SKI), que se sobreexpresa en tumores de melanoma humano en comparación con los nevos (2). En muchos tumores, SIP transmite señales oncogénicas como segundo mensajero intracelular y/o a través de la estimulación de una familia de receptores acoplados a proteínas G (S1PR1-5) expresados tanto en células cancerosas como en su microentorno circundante (4, 5). En tumores de melanoma, la desregulación de la producción de S1P en células cancerosas provoca una respuesta 40 fibrótica en el microentorno tumoral, que a su vez estimula la migración de células de melanoma (2). Además, el tratamiento de ratones con el modulador del receptor de SIP FTY720, que hace que las células no respondan a la activación de SIP mediante el secuestro interno de S1PR1, redujo la progresión del melanoma mediante la inhibición de la vascularización tumoral (6). Estos hallazgos ilustran la acción paracrina de SIP exportado por células de melanoma a través de S1PR en interacciones tumor-estroma. Sin embargo, estudios recientes demuestran que el eje SK1/S1P/S1PR desempeña un papel esencial en el desarrollo de cáncer asociado a inflamación (7). De hecho, se ha demostrado que la regulación por disminución basada en ARNhc de SKI o S1PR1 bloquea la activación persistente del factor de transcripción STAT3 y el nivel de citocinas proinflamatorias y reduce la progresión del cáncer en modelos de ratón de inflamación (8, 9). Además, SIP contribuye al tráfico y a las funciones efectoras de los linfocitos y otras células hematopoyéticas (10). Por tanto, se notificó el uso de un 50 inhibidor de SKI para el tratamiento de melanoma (Madhunapantula, SubbaRao V., *et al.* "Targeting sphingosine kinase - 1 to inhibit melanoma". *Pigment cell & melanoma research* 25,2 (2012): 259-274). Sin embargo, la técnica anterior no sugiere que la inhibición de SKI pueda incrementar la potencia de los inhibidores del punto de control inmunitario. Por ejemplo, se notificó la combinación de un inhibidor de MAPK (tal como un inhibidor de BRAF) con un inhibidor del punto de control inmunitario (Kim, Teresa, *et al.* "Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma". *Cancer biology & medicine* 11.4 (2014): 237).

55 **Sumario de la invención**

60 La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, en el que el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-CTLA4 y anticuerpos anti-PD-1. La siguiente descripción detallada, las figuras y el ejemplo no se encuentran dentro del alcance de la presente invención y se presentan 65 únicamente con propósitos de comprensión e ilustración.

Descripción detallada

Los inventores demostraron que interferir con el metabolismo de los esfingolípidos altera de manera eficiente la progresión tumoral en un modelo preclínico de melanoma e incrementa la respuesta inmunitaria antitumoral obtenida con el inhibidor del punto de control inmunitario. En particular, los inventores observaron que la regulación por disminución de SKI incrementa la proliferación y la activación de células T CD8+ dentro de los tumores. De gran interés es el hallazgo de que la atenuación génica de SKI en melanoma incrementa la expresión de CTLA-4 y PD-1 en TIL CD8+, ambos de los cuales se regulan por incremento tras la activación de células T y ejercen un potente bucle de retroinhibición sobre la activación de células T. Esta última observación destaca por primera vez que SKI de melanoma altera la respuesta inmunitaria dependiente de células T CD8+. Sin embargo, es probable que la regulación por incremento tanto de PD-1 como de CTLA-4 en células T CD8+ esté implicada en el escape inmunitario del melanoma tras la atenuación génica de SKI observada en puntos de tiempo posteriores. Por tanto, es poco probable que la selección como diana de SKI de melanoma sea suficiente para desencadenar una regresión tumoral total. En conjunto, los datos llevaron a los inventores a investigar la combinación de la inhibición de SKI con la inhibición de puntos de control inmunitarios y demostraron que dicha combinación proporciona respuestas inmunitarias anticancerosas sinérgicas.

Por consiguiente, el primer objeto de la presente divulgación se refiere a un método para incrementar la proliferación y la activación de células T CD8+ infiltrantes de tumor en un paciente que padece cáncer, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de SKI.

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula T CD8+” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD8 en su superficie. Están restringidas por CMH de clase I y funcionan como células T citotóxicas. Las “células T CD8+” también se denominan linfocitos T citotóxicos (CTL), células T citolíticas o células T supresoras. Los antígenos CD8 son miembros de la familia de supergenes de inmunoglobulina y son elementos de reconocimiento asociativos en las interacciones restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Tal como se usa en el presente documento, el término “célula T CD8+ infiltrante de tumor” se refiere al grupo de células T CD8+ del paciente que han abandonado el torrente circulatorio y han migrado a un tumor.

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método para incrementar la potencia de un inhibidor del punto de control inmunitario administrado a un sujeto como parte de un régimen de tratamiento, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de SKI en combinación con el inhibidor del punto de control inmunitario.

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína del punto de control inmunitario” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una molécula expresada por las células T que aumentan una señal (moléculas estimuladoras del punto de control) o reducen una señal (moléculas inhibitoras del punto de control). En la técnica se reconoce que las moléculas del punto de control inmunitario constituyen las rutas del punto de control inmunitario similares a las rutas dependientes de CTLA-4 y PD-1 (véase, por ejemplo, Pardoll, 2012. *Nature Rev Cancer* 12:252-264; Mellman *et al.*, 2011. *Nature* 480:480-489). Los ejemplos de moléculas inhibitoras del punto de control incluyen A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, CD277, IDO, KIR, PD-1, LAG-3, TIM-3 y VISTA. El receptor de adenosina A2A (A2AR) se considera como un punto de control importante en la terapia contra el cáncer porque el microentorno tumoral tiene niveles relativamente altos de adenosina, lo que conduce a un bucle de retroinhibición inmunitaria a través de la activación de A2AR. B7-H3, también denominado CD276, se consideró originalmente como una molécula coestimuladora, pero ahora se considera como coinhibidora. B7-H4, también denominado VTCN1, se expresa por las células tumorales y los macrófagos asociados a tumores y desempeña un papel en el escape tumoral. El atenuador de linfocitos B y T (BTLA), también denominado CD272, es un ligando de HVEM (mediador de la entrada de virus del herpes). La expresión de BTLA en la superficie celular se regula por disminución gradualmente durante la diferenciación de células T CD8+ humanas desde un fenotipo de célula indiferenciada a uno de célula efectora, sin embargo, las células T CD8+ humanas específicas de tumor expresan altos niveles de BTLA. CTLA-4, proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4, y también denominada CD152 que se sobreexpresa en células Treg, sirve para controlar la proliferación de células T. IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa, es una enzima catabólica de triptófano, una enzima inmunoinhibidora relacionada. Otra molécula importante es TDO, triptófano 2,3-dioxigenasa. Se sabe que IDO suprime las células T y NK, genera y activa Treg y células supresoras de origen mieloide y fomenta la angiogénesis tumoral. KIR, receptor similar a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos, es un receptor para las moléculas de CMH de clase I en linfocitos citolíticos naturales. LAG3, gen de activación de linfocitos 3, funciona para suprimir una respuesta inmunitaria mediante la acción sobre Treg, así como los efectos directos sobre las células T CD8+. PD-1, receptor de muerte programada 1 (PD-1), tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. Este punto de control es la diana del fármaco contra el melanoma de Merck & Co., Keytruda, que obtuvo la aprobación por parte de la FDA en septiembre de 2014. Una ventaja de seleccionar como diana PD-1 es que puede restablecer la función inmunitaria en el microentorno tumoral. TIM-3, abreviatura de dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3, se expresa en células T CD4+ humanas activadas y regula las citocinas Th1 y Th17. TIM-3 actúa como regulador negativo de la función de Th1/Tc1 desencadenando la muerte celular tras la interacción con su ligando, galectina-9. VISTA, abreviatura de supresor de Ig de dominio V de la activación de células T, se

expresa principalmente en células hematopoyéticas, de modo que la constante expresión de VISTA en leucocitos dentro de los tumores puede permitir que el bloqueo de VISTA sea eficaz en una amplia gama de tumores sólidos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “inhibidor del punto de control inmunitario” tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que inhibe la función de una proteína inhibidora del punto de control inmunitario. La inhibición incluye la reducción de la función y el bloqueo total. Inhibidores del punto de control inmunitario preferidos son anticuerpos que reconocen específicamente proteínas del punto de control inmunitario. Se conocen varios inhibidores del punto de control inmunitario, y de manera
10 análoga a estos inhibidores de proteínas del punto de control inmunitario conocidos, pueden desarrollarse inhibidores del punto de control inmunitario alternativos en un futuro (cercano). Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen péptidos, anticuerpos, moléculas de ácido nucleico y moléculas pequeñas. En particular, el inhibidor del punto de control inmunitario de la presente divulgación se administra para incrementar la proliferación, la migración, la persistencia y/o la actividad citotóxica de las células T CD8+ en el sujeto, y en particular la infiltración tumoral de células T CD8+ del sujeto.
15

Por tanto, la expresión “incrementar la potencia de un punto de control inmunitario” se refiere a la capacidad del inhibidor de SKI para aumentar la capacidad del inhibidor del punto de control inmunitario para incrementar la proliferación, la migración, la persistencia y/o la actividad citotóxica de las células T CD8+.
20

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” o “tratar” se refiere tanto al tratamiento profiláctico o preventivo como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluyendo el tratamiento de un paciente en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que haya contraído la enfermedad, así como pacientes que están enfermos o que se les ha diagnosticado como que padecen una enfermedad o un estado médico, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que tiene un trastorno médico o que en última instancia puede adquirir el trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar la aparición de, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Por “régimen terapéutico” se entiende el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión “régimen de inducción” o “periodo de inducción” se refiere a un régimen terapéutico (o a la parte de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel fármaco a un paciente durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un “régimen de carga”, que puede incluir administrar una mayor dosis del fármaco que la que emplearía un médico durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con mayor frecuencia con la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La expresión “régimen de mantenimiento” o “periodo de mantenimiento” se refiere a un régimen terapéutico (o a la parte de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al paciente en remisión durante largos periodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo, tratamiento discontinuo, tratamiento intermitente, tratamiento en caso de recaída o tratamiento tras lograr unos criterios predeterminados particulares [por ejemplo, dolor, manifestación de la enfermedad, etc.]).
25
30
35
40
45

En particular, el sujeto padece un cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer” tiene su significado general en la técnica e incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores de transmisión hemática. El término cáncer incluye enfermedades de la piel, los tejidos, los órganos, el hueso, el cartílago, la sangre y los vasos. El término “cáncer” abarca además cánceres tanto primarios como metastásicos. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante los métodos y las composiciones dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de la vejiga, la sangre, el hueso, la médula ósea, el cerebro, la mama, el colon, el esófago, el tracto gastrointestinal, la encía, la cabeza, el riñón, el hígado, el pulmón, la nasofaringe, el cuello, el ovario, la próstata, la piel, el estómago, el testículo, la lengua o el útero. Además, el cáncer puede ser específicamente uno de los siguientes tipos histológicos, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma gigantomucinoso y fusocelular; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma epidermoide; carcinoma linfocelular; carcinoma basocelular; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenoide; adenocarcinoma en pólipos adenomatosos; adenocarcinoma, poliposis colónica familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; adenocarcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma corticosuprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; ceruminoso; adenocarcinoma; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar;
50
55
60
65

cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor estromal de ovario, maligno; tecoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; y
 5 roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomiomasarcoma;
 10 rhabdomiomasarcoma embrionario; rhabdomiomasarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto de Müller; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; bocio del ovario, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma;
 15 osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor gigantocelular de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma,
 20 maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, gigantocelular, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; mastocitoma; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia plasmocítica; eritroleucemia; leucemia de células de linfomasarcoma;
 25 leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia mastocítica; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y tricoleucemia.

En particular, el sujeto padece melanoma. Tal como se usa en el presente documento, "melanoma" se refiere a
 30 un estado caracterizado por el crecimiento de un tumor que surge a partir del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. La mayoría de los melanocitos se producen en la piel, pero también se hallan en las meninges, el tracto digestivo, los ganglios linfáticos y los ojos. Cuando el melanoma se produce en la piel, se denomina melanoma cutáneo. El melanoma también puede producirse en los ojos, y se denomina melanoma ocular o intraocular. En raras ocasiones, el melanoma se produce en las meninges, el tracto digestivo, los ganglios
 35 linfáticos u otras zonas en las que se hallan los melanocitos. El 40-60% de los melanomas portan una mutación activante en el gen que codifica para la serina-treonina proteína cinasa B-RAF (BRAF). Entre las mutaciones de BRAF observadas en el melanoma, más del 90% se encuentran en el codón 600, y entre estas, más del 90% son una mutación de un solo nucleótido que da como resultado la sustitución de ácido glutámico por valina (BRAFV600E).

En particular, el sujeto padece un melanoma resistente a los inhibidores de BRAF. Tal como se usa en el
 40 presente documento, el término "resistente" se refiere a la aparición repetida de melanoma, o a una progresión del melanoma independientemente de si la enfermedad estaba curada antes de dicha aparición o progresión. Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de BRAF" se refiere a un agente que puede inhibir
 45 la actividad de la cinasa BRAF o la cinasa BRAF mutada (una o más formas mutadas de serina-treonina proteína cinasa B-RAF (BRAF)) (por ejemplo, BRAFV600E). Por consiguiente, el término "inhibidores de BRAF" abarca, dentro de su alcance, un compuesto que puede inhibir BRAF o su forma mutada; o un compuesto que puede inhibir la forma mutada en V600 de BRAF. Los ejemplos de inhibidores de BRAF incluyen, pero no se limitan a,
 50 BAY43-9006 (sorafenib, Bayer), vemurafenib (PLX4032, Plexxikon; RG7204, RO5185426, Hofmann-LaRoche), GDC-0879 (GlaxoSmithKline), dabrafenib (GSK21 18436, GlaxoSmithKline), PLX4720 (Hofmann-LaRoche), BMS-908662 (XL281, Bristol-Myers Squibb), LGX818 (Novartis), PLX3603 (RO5212054, Hofmann-LaRoche), ARQ-736 (ArQule), DP-4978 (Deciphera) o RAF265 (Novartis).

En particular, el sujeto padece un melanoma con lactato deshidrogenasa (LDH) en plasma elevada. La LDH en
 55 plasma puede considerarse "elevada" según el método de la presente divulgación si supera los niveles de LDH en plasma hallados normalmente en un control negativo, es decir, un mamífero sano de la misma especie. Normalmente, la LDH en plasma puede considerarse "elevada" si supera aproximadamente 212 UI/ml. Preferiblemente, la LDH en plasma se considera "elevada" si supera aproximadamente 250 UI/ml. Más preferiblemente, la LDH en plasma se considera "elevada" si supera aproximadamente 287 UI/ml.

Por consiguiente, un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer en
 60 un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una combinación terapéuticamente eficaz de un inhibidor del punto de control inmunitario con un inhibidor de SKI, en el que la administración de la combinación da como resultado una eficacia terapéutica incrementada en relación con la administración del inhibidor del punto
 65 de control inmunitario solo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “eficacia terapéutica incrementada”, en relación con el cáncer, se refiere a un retardo o a una disminución del crecimiento de células cancerosas o de un tumor sólido, o a una reducción en el número total de células cancerosas o la carga tumoral total. Por tanto, un “resultado terapéutico mejorado” o una “eficacia terapéutica incrementada” significa que existe una mejora en el estado del paciente según cualquier criterio clínicamente aceptable, incluyendo, por ejemplo, tamaño tumoral disminuido, aumento en el tiempo hasta la progresión tumoral, supervivencia sin progresión aumentada, tiempo de supervivencia global aumentado, aumento en la esperanza de vida o mejora en la calidad de vida. En particular, “mejorado” o “incrementado” se refiere a una mejora o a un incremento del 1%, el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 75%, el 100% o más del 100% de cualquier indicador clínicamente aceptable de la eficacia o del resultado terapéutico. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “en relación con”, cuando se usa en el contexto de comparar la actividad y/o la eficacia de una composición de combinación que comprende el inhibidor del punto de control inmunitario con el inhibidor de SKI con la actividad y/o la eficacia del punto de control inmunitario solo, se refiere a una comparación que usa cantidades que se sabe que son comparables según un experto en la técnica.

En particular, el método de la presente divulgación es particularmente adecuado para el tratamiento de cáncer caracterizado por una baja infiltración tumoral de células T CD8+. Normalmente, dicha infiltración tumoral de células T CD8+ se determina mediante cualquier método convencional en la técnica. Por ejemplo, dicha determinación comprende cuantificar la densidad de células T CD8+ en una muestra tumoral obtenida del sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de tejido tumoral” significa cualquier muestra de tejido tumoral derivada del paciente. Dicha muestra de tejido se obtiene con el propósito de la evaluación *in vitro*. En particular, la muestra tumoral puede ser el resultado del tumor resecado a partir del paciente. En particular, la muestra tumoral puede ser el resultado de una biopsia realizada en el tumor primario del paciente o realizada en una muestra metastásica distante del tumor primario del paciente. Por ejemplo, una biopsia endoscópica realizada en el intestino del paciente afectado por un cáncer colorrectal. En particular, la muestra de tejido tumoral abarca (i) un tumor primario global (en su conjunto), (ii) una muestra de tejido de la parte central del tumor, (iii) una muestra de tejido a partir del tejido directamente circundante del tumor, tejido que puede denominarse más específicamente “margen invasivo” del tumor, (iv) los islotes linfoides en las proximidades cercanas del tumor, (v) los ganglios linfáticos ubicados en las proximidades más cercanas del tumor, (vi) una muestra de tejido tumoral recogida antes de la cirugía (para el seguimiento de pacientes después del tratamiento, por ejemplo) y (vii) una metástasis distante. Tal como se usa en el presente documento, “margen invasivo” tiene su significado general en la técnica y se refiere al entorno celular circundante del tumor. En particular, la muestra de tejido tumoral, independientemente de si se deriva de la parte central del tumor, del margen invasivo del tumor o de los ganglios linfáticos más cercanos, abarca trozos o porciones de tejido que se han retirado de la parte central del tumor o del margen invasivo circundante del tumor, incluyendo tras una resección quirúrgica del tumor o tras la recogida de una muestra de tejido para biopsia, para la cuantificación adicional de uno o varios marcadores biológicos, en particular mediante métodos de histología o inmunohistoquímica, mediante métodos de citometría de flujo y mediante métodos de análisis de la expresión de genes o proteínas, incluyendo análisis genómico y proteómico. Por supuesto, la muestra de tejido tumoral puede someterse a una variedad de técnicas preparativas posteriores a la recogida y de almacenamiento bien conocidas (por ejemplo, fijación, almacenamiento, congelación, etc.). La muestra ser reciente, estar congelada, estar fijada (por ejemplo, fijada con formalina) o estar incrustada (por ejemplo, incrustada en parafina).

En particular, la cuantificación de la densidad de células T CD8+ se determina mediante inmunohistoquímica (IHC). Por ejemplo, la cuantificación de la densidad de células T CD8+ se realiza poniendo en contacto la muestra de tejido tumoral con una pareja de unión (por ejemplo, un anticuerpo) específica para un marcador de superficie celular de dichas células. Normalmente, la cuantificación de la densidad de células T CD8+ se realiza poniendo en contacto la muestra de tejido tumoral con una pareja de unión (por ejemplo, un anticuerpo) específica para CD8. Normalmente, la densidad de células T CD8+ se expresa como el número de estas células que se cuentan por una unidad de área superficial de muestra de tejido, por ejemplo, como el número de células que se cuentan por cm^2 o mm^2 de área superficial de muestra de tejido tumoral. En particular, la densidad de células también puede expresarse como el número de células por una unidad de volumen de muestra, por ejemplo, como el número de células por cm^3 de muestra de tejido tumoral. En particular, la densidad de células también puede consistir en el porcentaje de las células específicas por células totales (establecido como el 100%). Normalmente, la inmunohistoquímica incluye las siguientes etapas i) fijar la muestra de tejido tumoral con formalina, ii) incrustar dicha muestra de tejido tumoral en parafina, iii) cortar dicha muestra de tejido tumoral en secciones para la tinción, iv) incubar dichas secciones con la pareja de unión específica para el marcador, v) enjuagar dichas secciones, vi) incubar dicha sección con un anticuerpo secundario normalmente biotinilado y vii) revelar el complejo antígeno-anticuerpo normalmente con un complejo avidina-biotina-peroxidasa. Por consiguiente, la muestra de tejido tumoral se incuba en primer lugar con las parejas de unión. Después del lavado, los anticuerpos marcados que se unen al marcador de interés se revelan mediante la técnica apropiada, dependiendo de la clase de marcador que porte el anticuerpo marcado, por ejemplo, marcador radiactivo, fluorescente o enzimático. Puede realizarse un marcaje múltiple simultáneamente. Alternativamente, el método de la presente divulgación puede usar un anticuerpo secundario acoplado a un sistema de amplificación (para intensificar la señal de tinción) y moléculas enzimáticas. Tales anticuerpos secundarios acoplados están

disponibles comercialmente, por ejemplo, de Dako, EnVision Systems. Puede usarse contratinción, por ejemplo, H&E, DAPI, Hoechst. Pueden lograrse otros métodos de tinción usando cualquier método o sistema adecuado tal como resultaría evidente para un experto en la técnica, incluyendo sistemas automáticos, semiautomáticos o manuales. Por ejemplo, pueden unirse uno o más marcadores al anticuerpo, permitiendo de ese modo la

5 detección de la proteína diana (es decir, el marcador). Los marcadores a modo de ejemplo incluyen isótopos radiactivos, fluoróforos, ligandos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el marcador es un punto cuántico. Los ejemplos no limitativos de marcadores que pueden conjugarse con ligandos de afinidad primarios y/o secundarios incluyen metales o colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, fluorescamina), colorantes cromóforos (por ejemplo, rodopsina),

10 compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, luminal, imidazol) y proteínas bioluminiscentes (por ejemplo, luciferina, luciferasa), haptenos (por ejemplo, biotina). Se describen una variedad de otros fluoróforos y cromóforos útiles en Stryer L (1968) Science 162:526-533 y Brand L y Gohlke J R (1972) Annu. Rev. Biochem. 41:843-868. Los ligandos de afinidad también pueden marcarse con enzimas (por ejemplo, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-lactamasa), radioisótopos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I) y partículas (por ejemplo, oro).

15 Los diferentes tipos de marcadores pueden conjugarse con un ligando de afinidad usando diversas químicas, por ejemplo, la reacción de amina o la reacción de tiol. Sin embargo, pueden usarse otros grupos reactivos distintos de las aminas y los tioles, por ejemplo, aldehídos, ácidos carboxílicos y glutamina. En la técnica se conocen diversos métodos de tinción enzimática para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones enzimáticas pueden visualizarse usando diferentes enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa

20 alcalina o diferentes cromógenos tales como DAB, AEC o Fast Red. En otros ejemplos, el anticuerpo puede conjugarse con péptidos o proteínas que pueden detectarse a través de un anticuerpo o una pareja de unión marcada. En un ensayo indirecto de IHC, es necesario un anticuerpo secundario o una segunda pareja de unión para detectar la unión de la primera pareja de unión, ya que no está marcada. Se obtienen imágenes de cada una de las muestras teñidas resultantes usando un sistema para visualizar la señal detectable y adquirir una

25 imagen, tal como una imagen digital de la tinción. Los métodos para la adquisición de imágenes son bien conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, una vez que se ha teñido la muestra, puede usarse cualquier dispositivo de obtención de imágenes óptico o no óptico para detectar la mancha o la marca del biomarcador, tal como, por ejemplo, microscopios ópticos verticales o invertidos, microscopios confocales de barrido, cámaras, microscopios electrónicos de barrido o tunelización, microscopios de sonda de barrido y detectores infrarrojos de obtención de imágenes. En algunos ejemplos, la imagen puede capturarse digitalmente. Luego pueden usarse las imágenes obtenidas para determinar de manera cuantitativa o semicuantitativa la cantidad del marcador en la muestra. En la técnica hay disponibles diversos sistemas de procesamiento, examen y análisis de muestras automáticos adecuados para su uso con la inmunohistoquímica. Tales sistemas pueden incluir tinción automática y examen microscópico, análisis de imágenes computarizado, comparación de

35 secciones en serie (para controlar la variación en la orientación y el tamaño de una muestra), generación de informes digitales, y archivado y monitorización de muestras (tal como portaobjetos sobre los que se colocan las secciones de tejido). Hay disponibles comercialmente sistemas de obtención de imágenes celulares que combinan microscopios ópticos convencionales con sistemas de procesamiento de imágenes digitales para realizar el análisis cuantitativo en células y tejidos, incluyendo muestras inmunoteñidas. Véase, por ejemplo, el sistema CAS-200 (Becton, Dickinson & Co.). En particular, la detección puede realizarse manualmente o mediante técnicas de procesamiento de imágenes que implican procesadores informáticos y software. Usando tal software, por ejemplo, las imágenes pueden configurarse, calibrarse, normalizarse y/o validarse basándose en factores que incluyen, por ejemplo, calidad de la mancha o intensidad de la mancha, usando procedimientos conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense publicada

40 n.º US20100136549). La imagen puede analizarse de manera cuantitativa o semicuantitativa y puntuarse basándose en la intensidad de tinción de la muestra. Histoquímica cuantitativa o semicuantitativa se refiere a un método de examen y puntuación de muestras que se han sometido a histoquímica, para identificar y cuantificar la presencia del biomarcador especificado (es decir, el marcador). Los métodos cuantitativos o semicuantitativos pueden emplear un software de obtención de imágenes para detectar las densidades de tinción o la cantidad de tinción, o métodos de detección de la tinción a simple vista, en los que un operario cualificado clasifica los resultados numéricamente. Por ejemplo, las imágenes pueden analizarse de manera cuantitativa usando algoritmos de recuento de píxeles (por ejemplo, el software Aperio Spectrum), la plataforma de análisis cuantitativo automático (plataforma AQUA®) y otros métodos convencionales que miden o cuantifican o semicuantifican el grado de tinción; véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.023.714; la patente estadounidense n.º 7.257.268; la patente estadounidense n.º 7.219.016; la patente estadounidense n.º 7.646.905; la publicación de patente estadounidense publicada n.º US20100136549 y 20110111435; Camp *et al.* (2002) Nature Medicine, 8:1323-1327; Bacus *et al.* (1997) Analyt Quant Cytol Histol, 19:316-328). Puede calcularse y puntuarse una razón de mancha positiva fuerte (tal como mancha marrón) con respecto a la suma de área teñida total. La cantidad del biomarcador detectado (es decir, el marcador) se cuantifica y se proporciona

55 como porcentaje de píxeles positivos y/o puntuación. Por ejemplo, la cantidad puede cuantificarse como porcentaje de píxeles positivos. En algunos ejemplos, la cantidad se cuantifica como porcentaje de área teñida, por ejemplo, el porcentaje de píxeles positivos. Por ejemplo, una muestra puede tener al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente el 0%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22%, el 23%, el 24%, el 25%, el 26%, el 27%, el 28%, el 29%, el 30%, el 31%, el 32%, el 33%, el 34%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o más de píxeles positivos

60

65

en comparación con el área de tinción total. En particular, se le da una puntuación a la muestra que es una representación numérica de la intensidad o cantidad de tinción histoquímica de la muestra, y representa la cantidad de biomarcador diana (por ejemplo, marcador) presente en la muestra. A los valores de densidad óptica o área en porcentaje se les puede dar una puntuación escalada, por ejemplo, en una escala de números enteros.

5 Por tanto, en particular, el método de la presente divulgación comprende las etapas que consisten en i) proporcionar una o más porciones inmunoteñidas de sección de tejido obtenidas mediante un sistema de tinción de porciones automático mediante el uso de una pareja de unión que puede interaccionar selectivamente con el marcador (por ejemplo, un anticuerpo tal como se describió anteriormente), ii) proceder a la digitalización de las porciones de la etapa a. mediante captura por barrido de alta resolución, iii) detectar la porción de sección de tejido en la imagen digital, iv) proporcionar una cuadrícula de referencia de tamaño con unidades uniformemente distribuidas que tienen una misma superficie, adaptándose dicha cuadrícula al tamaño de la sección de tejido que va a analizarse, y v) detectar, cuantificar y medir la intensidad de células teñidas en cada unidad, mediante lo cual se evalúa el número o la densidad de células teñidas de cada unidad.

15 En particular, la densidad celular de células T CD8+ se determina en toda la muestra de tejido tumoral, se determina en el margen invasivo o en la parte central de la muestra de tejido tumoral o se determina tanto en la parte central como en el margen invasivo de la muestra de tejido tumoral.

20 Por consiguiente, un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende i) cuantificar la densidad de células T CD8+ en una muestra de tejido tumoral obtenida del sujeto, ii) comparar la densidad cuantificada en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y iii) administrar al sujeto una combinación terapéuticamente eficaz de un inhibidor del punto de control inmunitario con un inhibidor de SKI cuando la densidad cuantificada en la etapa i) es menor que el valor de referencia predeterminado.

25 Normalmente, el valor de referencia predeterminado se correlaciona con el tiempo de supervivencia del sujeto. Los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo de supervivencia OS se basa generalmente en y se expresa como el porcentaje de personas que sobreviven a un determinado tipo de cáncer durante una cantidad de tiempo específica. Con frecuencia, los parámetros estadísticos del cáncer usan una tasa de supervivencia a los cinco años global. En general, las tasas de OS no especifican si los supervivientes al cáncer todavía están sometiéndose a tratamiento a los cinco años o si han pasado a estar libres de cáncer (han logrado la remisión). La DSF proporciona información más específica y es el número de personas con un cáncer particular que logran la remisión. Además, las tasas de supervivencia libre de progresión (PFS) (el número de personas que todavía tienen cáncer, pero su enfermedad no progresa) incluye personas que han tenido cierto éxito con el tratamiento, pero el cáncer no ha desaparecido por completo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "tiempo de supervivencia corto" indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia que será inferior a la mediana (o media) observada en la población general de pacientes que padecen dicho cáncer. Que el paciente tenga un tiempo de supervivencia corto quiere decir que el paciente tendrá un "mal pronóstico". A la inversa, la expresión "tiempo de supervivencia largo" indica que el paciente tendrá un tiempo de supervivencia que será superior a la mediana (o media) observada en la población general de pacientes que padecen dicho cáncer. Que el paciente tenga un tiempo de supervivencia largo quiere decir que el paciente tendrá un "buen pronóstico".

45 En particular, el valor predeterminado es un valor umbral o un valor de corte. Normalmente, un "valor umbral" o "valor de corte" puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse de manera arbitraria basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como reconocería una persona habitual en la técnica. Por ejemplo, puede usarse la medición retrospectiva de las densidades de células en muestras de pacientes históricas almacenadas en bancos de manera apropiada para establecer el valor de referencia predeterminado. El valor umbral debe determinarse con el fin de obtener la sensibilidad y la especificidad óptimas según la función de la prueba y la relación beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Normalmente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por tanto, el valor umbral) pueden determinarse usando una curva característica operativa del receptor (ROC) basándose en los datos experimentales. Por ejemplo, después de cuantificar la densidad de células T CD8+ en un grupo de referencia, pueden usarse un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las densidades medidas en muestras que van a someterse a prueba y, por tanto, obtener un patrón de clasificación que tiene significación para la clasificación de muestras. El nombre completo de la curva ROC es curva característica operativa del receptor, que también se conoce como curva característica de operación del receptor. Se usa principalmente para pruebas diagnósticas bioquímicas clínicas. La curva ROC es un indicador exhaustivo que refleja las variables continuas de tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre la sensibilidad y la especificidad con el método de composición de imágenes. Se establecen una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre resultados normales y anómalos de la prueba diagnóstica) como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego se usa la sensibilidad como coordenada vertical y se usa la especificidad como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor es la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano a la parte superior izquierda del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores de alta sensibilidad y de alta especificidad. El valor de AUC de la curva ROC está entre 1,0 y 0,5. Cuando $AUC > 0,5$, el resultado de

diagnóstico mejora cada vez más a medida que AUC se aproxima a 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 mayor de 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Pueden usarse softwares o sistemas existentes en la técnica para dibujar la curva ROC, tales como: el software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT V10.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Md., EE.UU.), etc.

En particular, el valor de referencia predeterminado se determina llevando a cabo un método que comprende las etapas de a) proporcionar una colección de muestras de tejido tumoral del sujeto que padece el cáncer de interés; b) proporcionar, para cada muestra de tejido tumoral proporcionada en la etapa a), información relacionada con el resultado clínico real para el paciente correspondiente (es decir, la duración de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y/o la supervivencia global (OS)); c) proporcionar una serie de valores de cuantificación arbitrarios; d) cuantificar la densidad de células T CD8+ para cada muestra de tejido tumoral contenida en la colección proporcionada en la etapa a); e) clasificar dichas muestras de tejido tumoral en dos grupos para un valor de cuantificación arbitrario específico proporcionado en la etapa c), respectivamente: (i) un primer grupo que comprende muestras de tejido tumoral que presentan un valor de cuantificación para un nivel que es inferior a dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación; (ii) un segundo grupo que comprende muestras de tejido tumoral que presentan un valor de cuantificación para dicho nivel que es superior a dicho valor de cuantificación arbitrario contenido en dicha serie de valores de cuantificación; mediante lo cual se obtienen dos grupos de muestras de tejido tumoral para dicho valor de cuantificación específico, en los que las muestras de tejido tumoral de cada grupo se enumeran por separado; f) calcular la significación estadística entre (i) el valor de cuantificación obtenido en la etapa e) y (ii) el resultado clínico real de los pacientes de los que derivan las muestras de tejido tumoral contenidas en los grupos primero y segundo definidos en la etapa f); g) reiterar las etapas f) y g) hasta someter a prueba cada valor de cuantificación arbitrario proporcionado en la etapa d); h) establecer que dicho valor de referencia predeterminado consiste en el valor de cuantificación arbitrario para el cual se ha calculado la significación estadística más alta (más significativa) en la etapa g). Por ejemplo, la densidad de células T CD8+ se ha evaluado para 100 muestras de tejido tumoral de 100 pacientes. Las 100 muestras se clasifican según la densidad de células T CD8+. La muestra 1 tiene la densidad más alta y la muestra 100 tiene la densidad más baja. Una primera agrupación proporciona dos subconjuntos: por un lado la muestra n.º 1 y por otro lado las otras 99 muestras. La siguiente agrupación proporciona por un lado las muestras 1 y 2 y por otro lado las 98 muestras restantes, etc., hasta la última agrupación: por un lado las muestras 1 a 99 y por otro lado la muestra n.º 100. Según la información relacionada con el resultado clínico real para el paciente con cáncer correspondiente, se preparan curvas de Kaplan-Meier para cada uno de los 99 grupos de los dos subconjuntos. Además, para cada uno de los 99 grupos, se calculó el valor de p entre ambos subconjuntos. Luego se selecciona el valor de referencia predeterminado de tal manera que la discriminación basada en el criterio del valor de p mínimo sea la más fuerte. Dicho de otro modo, la densidad de células T CD8+ correspondiente al límite entre ambos subconjuntos para los cuales el valor de p es mínimo se considera como el valor de referencia predeterminado. Debe señalarse que el valor de referencia predeterminado no es necesariamente el valor de la mediana de las densidades de células. Por tanto, en particular, el valor de referencia predeterminado permite la discriminación entre un mal pronóstico y un buen pronóstico con respecto a DFS y OS para un paciente. En la práctica, generalmente se obtienen altos valores de significación estadística (por ejemplo, bajos valores de P) para un intervalo de valores de cuantificación arbitrarios sucesivos, y no sólo para un único valor de cuantificación arbitrario. Por tanto, en lugar de usar un valor de referencia predeterminado definido, se proporciona un intervalo de valores. Por tanto, se establece de manera arbitraria un valor de significación estadística mínimo (umbral de significación mínimo, por ejemplo, valor de P umbral máximo) y se conserva un intervalo de una pluralidad de valores de cuantificación arbitrarios para los cuales el valor de significación estadística calculado en la etapa g) es mayor (más significativo, por ejemplo, valor de P más bajo), de modo que se proporciona un intervalo de valores de cuantificación. Este intervalo de valores de cuantificación incluye un valor "de corte" tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, el resultado puede determinarse comparando la densidad de células T CD8+ con el intervalo de valores que se identifican. Por tanto, en particular, un valor de corte consiste en un intervalo de valores de cuantificación, por ejemplo, centrado en el valor de cuantificación para el cual se halla el valor de significación estadística más alto (por ejemplo, generalmente el mínimo valor de p que se halla).

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de SK-1 en combinación con una vacuna contra el cáncer.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vacuna contra el cáncer" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una composición que puede inducir una inmunidad activa frente a al menos un antígeno de cáncer. La vacuna contra el cáncer puede dar como resultado la producción de anticuerpos o simplemente la activación de determinadas células, en particular células presentadoras de antígeno, linfocitos T (en particular células T CD8+) y linfocitos B. La vacuna contra el cáncer puede ser una composición con propósitos profilácticos o con propósitos terapéuticos, o ambos. Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula a la cual puede unirse específicamente un anticuerpo o un receptor de células T (TCR) si se procesa y presenta por moléculas de CMH. El término "antígeno", tal como se usa en el

- presente documento, también abarca epítomos de células T. Además, un antígeno puede ser reconocido por el sistema inmunitario y/o puede inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T. Un antígeno puede tener uno o más epítomos o sitios antigénicos (epítomos de células B y T). Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno de cáncer” se refiere a un antígeno que es característico de un tejido tumoral. Existen múltiples tipos de vacunas contra el cáncer. Los ejemplos no limitativos de vacunas contra el cáncer incluyen vacunas contra las células tumorales, vacunas contra los antígenos, vacunas contra las células dendríticas, vacunas de ADN y vacunas basadas en vectores.
- Normalmente, la vacuna contra el cáncer de la presente divulgación comprende un antígeno asociado a tumor (“TAA”) o una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica para un antígeno asociado a tumor. En la técnica se conocen numerosos antígenos asociados a tumor. Los antígenos asociados a tumor a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 5-alfa-reductasa, alfa-fetoproteína, AM-1, APC, April, BAGE, beta-catenina, Bell 2, bcr-abl, CA-125, CASP-8/FLICE, catepsinas, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33, CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55, CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, farnesil-transferasa, FGF8b, FGF8a, FLK-1/KDR, receptor de ácido fólico, G250, familia GAGE, gastrina 17, hormona liberadora de gastrina, GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, gp15, gp75/TRP-I, hCG, heparansa, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERC, IGFRI, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, familia MAGE, mamaglobina, MAP 17, melan-A/MART-1, mesotelina, MIC A B, MT-MMP, mucina, NY-ESO-1, osteonectina, p15, P170/MDR1, p53, p97/melanotransferrina, PAI-1, PDGF, uPA, PRAME, probasina, proenipoyentina, PSA, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, familia SSX, STAT3, STn, TAG-72, TGF-alfa, TGF-beta, timosina-beta-15, TNF-alfa, TYRP-1, TYRP-2, tirosinasa, VEGF, ZAG, p16INK4 y glutatión-S-transferasa.
- En particular, la vacuna es una vacuna de ADN. Pueden diseñarse por ingeniería vectores para contener ADN específicos que pueden inyectarse a un sujeto, lo que conduce a la captación del ADN por parte de las células. Una vez que las células captan el ADN, el ADN programará las células para producir antígenos específicos, que luego pueden provocar la respuesta inmunitaria deseada.
- En particular, la vacuna consiste en un virus recombinante que codifica para o expresa un antígeno de cáncer. En particular, el virus recombinante es un poxvirus (virus de la viruela) que expresa un antígeno tumoral y más particularmente un ortopoxvirus tal como, pero sin limitarse a, un virus vaccinia, un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) o MVA-BN. Ejemplos de cepas de virus vaccinia son las cepas Temple of Heaven, Copenhagen, Paris, Budapest, Dairen, Gam, MRIVP, Per, Tashkent, TBK, Tom, Bern, Patwadangar, BIEM, B-15, Lister, EM-63, New York City Board of Health, Elstree, Ikeda y WR. Una cepa de virus vaccinia (W) preferida es la cepa Wyet (DRYVAX) (patente estadounidense 7.410.644). Otra cepa W preferida es un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) (Sutter, G. *et al.*, *Vaccine* 12: 1032-40). Otra cepa W preferida es MVA-BN. Ejemplos de cepas de virus MVA que son útiles en la práctica de la presente divulgación y que se han depositado en cumplimiento con los requisitos del Tratado de Budapest son las cepas MVA 572, depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC), Laboratorio de Investigación y Producción de Vacunas, Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Centro de Investigación y Microbiología Aplicada, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido, con el número de depósito ECACC 94012707 el 27 de enero de 1994, y MVA 575, depositada como ECACC 00120707 el 7 de diciembre de 2000. MVA-BN, depositada el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) con el número V00083008, y sus derivados, son cepas a modo de ejemplo adicionales. En particular, la presente divulgación abarca el uso de ortopoxvirus recombinantes, preferiblemente un virus vaccinia (W), una cepa Wyet, ACAM 1000, ACAM 2000, MVA o MVA-BN para la terapia contra el cáncer. Los ortopoxvirus recombinantes se generan mediante la inserción de secuencias heterólogas en un ortopoxvirus. En particular, el poxvirus recombinante que expresa un antígeno tumoral es un virus de la viruela aviar tal como, pero sin limitarse a, un virus de la viruela de la gallina. El término “virus de la viruela aviar” se refiere a cualquier virus de la viruela aviar, tal como virus de la viruela de la gallina, virus de la viruela del canario, uncopoxvirus, virus de la viruela de la miná, virus de la viruela de la paloma, virus de la viruela de psitaciformes, virus de la viruela de la codorniz, virus de la viruela del pavo real, virus de la viruela del pingüino, virus de la viruela del gorrión, virus de la viruela del estornino y virus de la viruela del pavo. Virus de la viruela aviar preferidos son el virus de la viruela del canario y el virus de la viruela de la gallina.
- En particular, la composición de vacuna comprende al menos una población de células presentadoras de antígeno que presentan el antígeno seleccionado. La célula presentadora de antígeno (o célula estimuladora) tiene normalmente una molécula de CMH de clase I o II en su superficie, y más particularmente es sustancialmente incapaz de cargar por sí misma la molécula de CMH de clase I o II con el antígeno seleccionado. Preferiblemente, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas. De manera adecuada, las células dendríticas son células dendríticas autólogas que se pulsan con el antígeno de interés (por ejemplo, un péptido). La terapia de células T que usa células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos de un antígeno asociado a tumor se da a conocer en Murphy *et al.* (1996) *The Prostate* 29, 371-380 y Tjua *et al.* (1997) *The Prostate* 32, 272-278. Por tanto, en particular, la composición de vacuna que contiene al menos una célula presentadora de antígeno se pulsa o carga con uno o más péptidos antigénicos. Como alternativa, la célula presentadora de antígeno comprende un constructo de expresión que codifica para un péptido antigénico. El

polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido adecuado y se prefiere que pueda transducir la célula dendrítica, dando como resultado de ese modo la presentación de un péptido y la inducción de una respuesta inmunitaria.

5 En particular, la composición de vacuna incluye uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que incrementan o potencian inespecíficamente la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuestas inmunitarias mediadas por células T positivas para CD8 y células T cooperadoras (TH)) a un antígeno y, por tanto, se considerarían útiles en el medicamento de la presente divulgación. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos TLR5 derivados de la flagelina, ligando FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas tales como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta, o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y a base de poli(lactida-co-glicolida) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, QS21 stimulon de Aquila, que se deriva de la saponina, extractos micobacterianos e imitadores sintéticos de la pared celular bacteriana, y otros adyuvantes patentados tales como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren adyuvantes tales como Freund o GM-CSF. Se han descrito previamente varios adyuvantes inmunológicos (por ejemplo, MF59) específicos para células dendríticas y su preparación (Allison y Krummel, 1995). También pueden usarse citocinas. Varias citocinas se han relacionado directamente con la influencia en la migración de células dendríticas a los tejidos linfoides (por ejemplo, TNF-), la aceleración de la maduración de células dendríticas en células presentadoras de antígeno eficientes para linfocitos T (por ejemplo, GM-CSF, IL-1 e IL-4) (patente estadounidense n.º 5.849.589) y la actuación como inmunoadyuvantes (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich *et al.*, 1996).

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a una vacuna contra el cáncer que comprende un inmunoadyuvante junto con uno o más antígenos de cáncer para inducir una respuesta inmunitaria frente a dichos uno o más antígenos de cáncer, en la que el inmunoadyuvante es un inhibidor de SK-1.

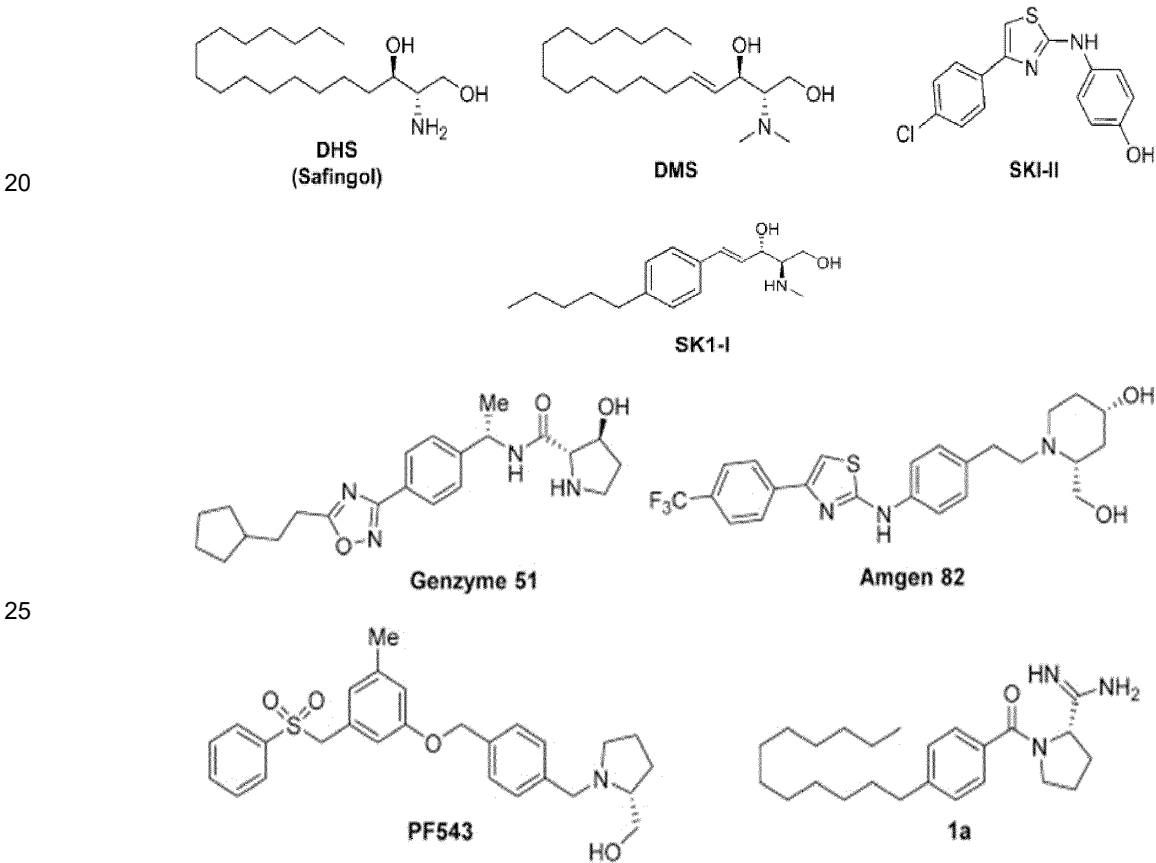
30 El término “esfingosina cinasa-1” o “SKI” se refiere a una enzima que cataliza la transformación de esfingosina en esfingosina-1-fosfato (SIP), es decir, fosforila la esfingosina para dar SIP. Las propiedades y las actividades de SKI, por ejemplo, la secuencia de proteína de SKI, las propiedades estructurales de SKI, las propiedades bioquímicas de SKI y la regulación de SKI, se describen en Taha *et al.* (2006, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 39(2): 113-131). Por tanto, tal como se usa en el presente documento, el término “inhibidor de SKI” se refiere a cualquier compuesto que puede inhibir la expresión o actividad de SKI. Tal como se usa en el presente documento, el término “actividad de SK1” se refiere a la producción, liberación, expresión, función, acción, interacción o regulación de SKI, incluyendo, por ejemplo, aspectos temporales, de sitio o de distribución. La actividad de SKI incluye modificaciones, por ejemplo, modificaciones covalentes o no covalentes del polipéptido de SKI, modificaciones covalentes o no covalentes que induce SKI en otras sustancias, cambios en la distribución del polipéptido de SKI y cambios que induce SKI en la distribución de otras sustancias. Puede evaluarse cualquier aspecto de la actividad de SKI. Pueden hallarse métodos y técnicas conocidos por los expertos en la técnica en diversas referencias, por ejemplo, Ausubel *et al.*, ed., Current Protocols in Mol. Biology, Nueva York: John Wiley & Sons, 1990; Sambrook *et al.*, Mol. Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, N. Y. (1989). Los ejemplos de actividad de SKI que pueden evaluarse incluyen la actividad de unión del polipéptido de SKI a una molécula de unión; el efecto del polipéptido de SKI sobre la modificación posterior a la traducción o la estabilidad de un gen diana; el nivel de proteína SKI; el nivel de ARNm de SKI; o el nivel de modificación de SKI, por ejemplo, fosforilación, acetilación, metilación, carboxilación o glicosilación. Por molécula de unión se entiende cualquier molécula a la que puede unirse SKI, por ejemplo, un ácido nucleico, por ejemplo, una región reguladora de ADN, una proteína, un metabolito, un imitador peptídico, un imitador no peptídico, un anticuerpo o cualquier otro tipo de ligando. La unión puede mostrarse, por ejemplo, mediante análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA), mediante ensayos de dos híbridos o de tres híbridos de levadura o de mamífero, mediante la competencia con el marcador de fotoafinidad dimetilesfingosina o la unión biotina-SK1. La transactivación de un gen diana mediante SKI puede determinarse, por ejemplo, en un ensayo de transfección transitoria en el que el promotor del gen diana se une a un gen indicador, por ejemplo, β-galactosidasa o luciferasa, y se transfecta conjuntamente con un vector de expresión de SKI. Los niveles de proteína, ARNm o modificación de SKI pueden medirse, por ejemplo, en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, por ejemplo, células endoteliales en vasos sanguíneos, linfocitos T y B de sangre u órganos linfáticos, corazón, músculos o articulaciones óseas. En particular, las evaluaciones se realizan *in vitro*; más particularmente las evaluaciones se realizan *in vivo*.

65 El experto conocen bien los inhibidores de SKI. Por ejemplo, el experto puede identificar fácilmente tales inhibidores a partir de las siguientes publicaciones de patente: WO2003105840, WO2006138660, WO2010033701, WO2010078247, WO2010127093, WO2011020116, WO2011072791, WO2012069852, WO2013119946, WO2014118556 y WO2014157382.

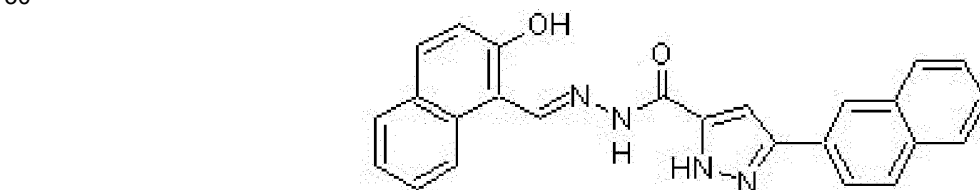
En particular, el inhibidor de SKI se selecciona del grupo que consiste en isopropilamiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; ciclopropilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (2-etilsulfanil-etil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; fenilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (4-hidroxi-fenil)-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; (4-hidroxi-fenil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; éster 4-[[3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]-fenílico del ácido acético; (2,4-dihidroxi-fenil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (3-hidroximetil-fenil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (4-cianometil-fenil)-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; (4-cianometil-fenil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-terc-butil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-metilsulfanil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3,5-bis-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3-fluoro-5-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 2-fluoro-4-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3,5-difluoro-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3,4-difluoro-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3,4,5-trifluoro-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3-cloro-4-fluoro-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-fluoro-3-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 2-cloro-4-fluoro-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-cloro-3-trifluorometil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3-aminometil-2,4,5,6-tetracloro-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [1-(4-cloro-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [1-(4-bromo-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-metanosulfonil-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-dimetilamino-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-trifluorometoxi-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3-trifluorometoxi-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-fenoxi-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3,4-dihidroxi-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 3,4-dihidroxi-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; fenetil-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(4-fluoro-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(4-bromo-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(4-hidroxi-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; 4-fenoxi-bencilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(3-bromo-4-metoxi-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(3,4-dihidroxi-fenil)-etil]-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; [2-(3,4-dihidroxi-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (2-benzodioxol-5-il-etil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(3-fenoxi-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(4-fenoxi-fenil)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (3-fenil-propil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (bifenil-4-ilmetil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (1-metil-piperidin-4-il)-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; (1-metil-piperidin-4-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (4-metil-piperazin-1-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (3-terc-butilamino-propil)-amiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; (3-pirrolidin-1-il-propil)-amiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; [3-(2-oxo-pirrolidin-1-il)-propil]-amiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; [2-(1-metil-pirrolidin-2-il)-etil]-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; [2-(1-metil-pirrolidin-2-il)-etil]-amiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; (2-morfolin-4-il-etil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (2-piperazin-1-il-etil)-amiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; (piridin-4-ilmetil)-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; (piridin-4-ilmetil)-amiduro del ácido 3-(4-fluoro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (piridin-4-ilmetil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (piridin-4-ilmetil)-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; (2-piridin-4-il-etil)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (3-imidazol-1-il-propil)-amiduro del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico; (2-metil-1H-indol-5-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (1H-tetrazol-5-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (9-etil-9H-carbazol-3-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [4-(4-cloro-fenil)-tiazol-2-il]-amiduro del ácido adamantano-1-carboxílico; [4-(4-cloro-fenil)-tiazol-2-il]-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; benzotiazol-2-ilamiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (5-cloro-benzooxazol-2-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; (9H-purin-6-il)-amiduro del ácido 3-(4-cloro-fenil)-adamantano-1-carboxílico; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-isopropil-amina; 4-[[3-(4-clorofenil)-adamantan-1-ilmetil]-amino]-fenol; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[4-trifluorometil-bencil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[2-fluoro-4-trifluorometil-bencil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[4-fluoro-3-trifluorometil-bencil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[4-trifluorometoxi-bencil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[2-(3-fenoxi-fenil)-etil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[1-metil-piperidin-4-il]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[4-metil-piperazin-1-il]-amina; N-terc-butil-N'-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-propano-1,3-diamina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[3-pirrolidin-1-il-propil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[2-(1-metil-pirrolidin-2-il)-etil]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[2-morfolin-4-il-etil]-amina; [3-(4-clorofenil)-adamantan-1-ilmetil]-piridin-4-ilmetil-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[9-etil-9H-carbazol-3-il]-amina; [3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-ilmetil]-[5-(4-cloro-fenil)-tiazol-2-il]-amina; 1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etilamina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-isopropil-amina; fenil-[1-(3-fenil-adamantan-1-il)-etil]-amina; {1-[3-(4-fluoro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-fenil-amina; {1-[3-(4-cloro-

fenil)-adamantan-1-il]-etil]-fenil-amina; (1-adamantan-1-il-etil)-bencil-amina; bencil-[1-(3-fenil-adamantan-1-il)-etil]-amina; bencil-[1-[3-(4-fluoro-fenil)-adamantan-1-il]-etil]-amina; bencil-[1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil]-amina; (4-terc-butil-bencil)-{1-[3-(4-clorofenil)-adamantan-1-il]-etil]-amina; [1-(4-bromo-fenil)-etil]-{1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil]-amina; (1-adamantan-1-il-etil)-[2-(4-bromo-fenil)-etil]-amina; [2-(4-bromo-fenil)-etil]-{1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil]-amina; (1-adamantan-1-il-etil)-(1-metil-piperidin-4-il)-amina; (1-metil-piperidin-4-il)-[1-(3-fenil-adamantan-1-il)-etil]-amina; {1-[3-(4-fluoro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(1-metil-piperidin-4-il)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(1-metil-piperidin-4-il)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(4-metil-piperazin-1-il)-amina; {1-[3-(fenil)-adamantan-1-il]-etil}-piridin-4-ilmetil-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(6-cloro-piridin-3-ilmetil)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(2-piridin-4-il-etil)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(3H-imidazol-4-ilmetil)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(2-metil-1H-indol-5-il)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-amina; {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(9-etil-9H-carbazol-3-ilmetil)-amina; á{1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-amiduro del ácido 9-etil-9H-carbazol-3-carboxílico; 1-[1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil]-3-(4-cloro-3-trifluorometilfenil)-urea; 1-[1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil]-3-(4-cloro-3-trifluorometilfenil)-urea; (4-bromotiofen-2-ilmetil)-{1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-amina; y {1-[3-(4-cloro-fenil)-adamantan-1-il]-etil}-(4-feniltiofen-2-ilmetil)-amina.

En particular, el inhibidor de SKI de la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en:



En particular, el inhibidor de SKI es N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-3-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-5-carbohidrazida que tiene la fórmula de:



En particular, el inhibidor de SKI es un inhibidor de la expresión de SKI. Un "inhibidor de expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen. En particular, dicho inhibidor de la expresión génica es un ARNip, un oligonucleótido antisentido o una ribozima. Por ejemplo,

los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción de ARNm de SKI mediante la unión al mismo y, por tanto, impidiendo la traducción de la proteína o aumentando la degradación del ARNm, disminuyendo de ese modo el nivel de SK1 y, por tanto, la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcrito de ARNm que codifica para SKI, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales. En la técnica se conocen bien métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732). Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de expresión para su uso en la presente divulgación. La expresión génica de SKI puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o una célula con un ARN bicatenario (ARNbc) pequeño, o un vector o constructo que provoca la producción de un ARN bicatenario pequeño, de tal manera que se inhibe específicamente la expresión génica de SKI (es decir, interferencia por ARN o iARN). Los oligonucleótidos antisentido, los ARNip, los ARNhc y las ribozimas dados a conocer en el presente documento pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo que puede facilitar la transferencia del ácido nucleico de oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhc o ribozima a las células, y normalmente células que expresan SKI. Normalmente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría como resultado en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhc o ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus de tumor mamario murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus del tipo SV40; virus del poliovirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus del poliomielitis; y virus de ARN tales como un retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no mencionados pero conocidos en la técnica.

En particular, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-L2, anticuerpos anti-TIM-3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7H3, anticuerpos anti-B7H4, anticuerpos anti-BTLA y anticuerpos anti-B7H6.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se usa, por tanto, para referirse a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a antígeno, tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de un solo dominio (DAB), dímeros TandAc, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, bicuerpo, tricuerpo (fusiones scFv-Fab, biespecíficos o triespecíficos, respectivamente); sc-diacuerpo; kappa(lambda) cuerpos (fusiones scFv-CL); BiTE (atacante de células T biespecífico, scFv-scFv en tándem para atraer a las células T); DVD-Ig (anticuerpo de dominio variable dual, formato biespecífico); SIP (inmunoproteína pequeña, una clase de minicuerpo); SMIP (dímero scFv-Fc "inmunofarmacéutico modular pequeño"); DART (diacuerpo estabilizado con ds "redireccionamiento de afinidad dual"); imitadores de anticuerpos pequeños que comprenden una o más CDR, y similares. En la técnica se conocen bien las técnicas para preparar y usar diversos fragmentos y constructos basados en anticuerpos (véase Kabat *et al.*, 1991). Los diacuerpos, en particular, se describen adicionalmente en los documentos EP 404 097 y WO 93/11161; mientras que los anticuerpos lineales se describen adicionalmente en Zapata *et al.* (1995). Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los enlaces disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. También pueden sintetizarse Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAc, TandAc, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos mediante técnicas recombinantes, o pueden sintetizarse químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpo se conocen bien y se describen en la técnica. Por ejemplo, cada uno de Beckman *et al.*, 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall *et al.*, 2004; Reff y Heard, 2001; Reiter *et al.*, 1996; y Young *et al.*, 1995 describen adicionalmente y permiten la producción de fragmentos de anticuerpo eficaces. En particular, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monocatenario. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo de un solo dominio" tiene su significado general en la técnica y se refiere al único dominio variable de cadena pesada de anticuerpos del tipo que puede hallarse en mamíferos carnívoros que están desprovistos de manera natural de cadenas ligeras. Tal anticuerpo de un solo dominio también es un "Nanobody®". Para una descripción general de anticuerpos de (un solo) dominio, también se hace referencia a la técnica anterior citada anteriormente, así como al documento EP 0 368 684, a Ward *et al.* (Nature 12 de octubre de 1989; 341 (6242): 544-6), a Holt *et al.*, Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; y al documento WO 06/030220, al documento WO 06/003388.

En particular, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Tal como se usa en el presente documento, "humanizado" describe anticuerpos en los que parte de, la mayoría de o todos los aminoácidos fuera de las

regiones CDR se reemplazan por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205.

5 En particular, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos también pueden prepararse inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584. Estos animales se han modificado genéticamente de tal manera que existe una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican adicionalmente para contener la totalidad o una porción del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, de tal manera que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Tras la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), los anticuerpos monoclonales pueden prepararse según la tecnología del híbrido convencional. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por tanto, no provocarán respuestas de anticuerpo humano anti-IgG de ratón (KAMA) cuando se administren a seres humanos. También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de presentación en fagos (patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes estadounidenses n.ºs 5.229.275 y 5.567.610).

20 En particular, el anticuerpo comprende secuencias de regiones constantes de cadena pesada humanas, pero no agotarán las células T CD8+ a las que están unidos y preferiblemente no comprenden una porción Fc que induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Tal como se usa en el presente documento, el término "agotar", con respecto a células T CD8+ significa un procedimiento, método o compuesto que puede destruir, eliminar, lisar o inducir tal destrucción, eliminación o lisis, para afectar negativamente al número de células T CD8+ presentes en una muestra o en un sujeto. Los términos "dominio Fc", "porción Fc" y "región Fc" se refieren a un fragmento C-terminal de una cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido (aa) 230 hasta aproximadamente el aa 450 de la cadena pesada gamma humana o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpo (por ejemplo, α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo que se produce de manera natural de las mismas. A menos que se especifique lo contrario, se usa la enumeración de aminoácidos de Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulinas a lo largo de esta divulgación (véase Kabat *et al.* (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5ª ed., Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD). En particular, el anticuerpo de la presente divulgación no conduce, directa o indirectamente, al agotamiento de células T CD8+ (por ejemplo, no conduce a una eliminación o disminución del 10%, el 20%, el 50%, el 60% o superior en el número de células T CD8+). En particular, el anticuerpo de la presente divulgación no comprende ningún dominio Fc que pueda unirse sustancialmente a un polipéptido Fc γ RIIIA (CD16). En particular, el anticuerpo de la presente divulgación carece de un dominio Fc (por ejemplo, carece de un dominio CH2 y/o CH3) o comprende un dominio Fc de isotipo IgG2 o IgG4. En particular, el anticuerpo de la presente divulgación consiste en o comprende un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, un diacuerpo, un fragmento de anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos de anticuerpo diferentes. En particular, el anticuerpo de la presente divulgación no está unido a un resto tóxico. En particular, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácido pueden reemplazarse por un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tenga unión a C2q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o eliminada. Este enfoque se describe con mayor detalle en la patente estadounidense n.º 6.194.551 concedida a Idusogie *et al.*

50 Se describen ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 en las patentes estadounidenses n.ºs 5.811.097; 5.811.097; 5.855.887; 6.051.227; 6.207.157; 6.682.736; 6.984.720; y 7.605.238. Un anticuerpo anti-CTLA-4 es tremelimumab, (ticilimumab, CP-675,206). En particular, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab (también conocido como 10D1, MDX-D010), un anticuerpo IgG monoclonal completamente humano que se une a CTLA-4.

55 Se describen ejemplos de anticuerpos contra PD-1 y PD-L1 en las patentes estadounidenses n.ºs 7.488.802; 7.943.743; 8.008.449; 8.168.757; 8.217.149 y en las solicitudes de patente PCT publicadas n.ºs WO03042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 y WO2011161699. En particular, los bloqueadores de PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1. En particular, los bloqueadores de PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1 y proteínas de unión similares tales como nivolumab (MDX 1106, BMS 936558, ONO 4538), un anticuerpo IgG4 completamente humano que se une a y bloquea la activación de PD-1 mediante sus ligandos PD-L1 y PD-L2; lambrolizumab (MK-3475 o SCH 900475), un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado contra PD-1; CT-011, un anticuerpo humanizado que se une a PD-1; AMP-224, que es una proteína de fusión de B7-DC; una porción Fc de anticuerpo; BMS-936559 (MDX-1105-01) para el bloqueo de PD-L1 (B7-H1).

65 Otros inhibidores del punto de control inmunitario incluyen inhibidores del gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), tales como IMP321, una proteína de fusión de Ig soluble (Brignone *et al.*, 2007, J. Immunol. 179:4202-4211). Otros inhibidores del punto de control inmunitario incluyen inhibidores de B7, tales como los inhibidores B7-H3 y

B7-H4. En particular, el anticuerpo anti-B7-H3 MGA271 (Loo *et al.*, 2012, Clin. Cancer Res. 15 de julio (18) 3834). También se incluyen inhibidores de TIM3 (dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3) (Fourcade *et al.*, 2010, J. Exp. Med. 207:2175-86 y Sakuishi *et al.*, 2010, J. Exp. Med. 207:2187-94). Tal como se usa en el presente documento, el término "TIM-3" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una molécula que contiene dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3. El ligando natural de TIM-3 es la galectina 9 (Gal9). Por consiguiente, el término "inhibidor de TIM-3", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto, a una sustancia o a una composición que puede inhibir la función de TIM-3. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir la expresión o actividad de TIM-3, modular o bloquear la ruta de señalización de TIM-3 y/o bloquear la unión de TIM-3 a galectina-9. Los anticuerpos que tienen especificidad por TIM-3 se conocen bien en la técnica, y normalmente son los descritos en los documentos WO2011155607, WO2013006490 y WO2010117057.

En particular, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor deIDO. Se describen ejemplos de inhibidores deIDO en el documento WO 2014150677. Los ejemplos de inhibidores deIDO incluyen, sin limitación, 1-metil-triptófano (IMT), β -(3-benzofuranil)-alanina, β -(3-benzo(b)tienil)-alanina, 6-nitro-triptófano, 6-fluoro-triptófano, 4-metil-triptófano, 5-metil-triptófano, 6-metil-triptófano, 5-metoxi-triptófano, 5-hidroxi-triptófano, indol-3-carbinol, 3,3'-diindolilmetano, galato de epigalocatequina, 1,3-diacetato de 5-bromo-4-cloro-indoxilo, 9-vinilcarbazol, acemetacina, 5-bromo-triptófano, diacetato de 5-bromoindoxilo, ácido 3-amino-naftoico, ditiocarbamato de pirrolidina, 4-fenilimidazol, un derivado de brassinina, un derivado de tiohidantoína, un derivado de β -carbolina o un derivado de brassilexina. Preferiblemente, el inhibidor deIDO se selecciona de 1-metil-triptófano, β -(3-benzofuranil)-alanina, 6-nitro-1-triptófano, ácido 3-amino-naftoico y β -[3-benzo(b)tienil]-alanina, o un derivado o fármaco de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "administrar conjuntamente", tal como se usa en el presente documento, significa un procedimiento mediante el cual se administra la combinación del inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario al mismo paciente. El inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario pueden administrarse simultáneamente, esencialmente al mismo tiempo o secuencialmente. Si la administración tiene lugar secuencialmente, el inhibidor deSKI se administra antes que el inhibidor del punto de control inmunitario. No es necesario que el inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario se administren por medio del mismo vehículo. El inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario pueden administrarse una o más veces, y el número de administraciones de cada componente de la combinación puede ser el mismo o diferente. Además, no es necesario que el inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario se administren en el mismo sitio.

Tal como se usa en el presente documento, el término "combinación terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad o dosis de un inhibidor deSKI junto con la cantidad o dosis del inhibidor del punto de control inmunitario que es suficiente para tratar la enfermedad (por ejemplo, cáncer). La cantidad del inhibidor deSKI en una combinación terapéuticamente eficaz dada puede ser diferente para individuos diferentes y tipos de tumores diferentes, y dependerá del uno o más agentes o tratamientos adicionales incluidos en la combinación. La "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina usando procedimientos empleados de manera rutinaria por los expertos en la técnica, de tal manera que resulte un "resultado terapéutico mejorado". Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente divulgación lo decidirá el médico responsable dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier sujeto particular dependerá de varios factores, incluyendo el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, se encuentra bien dentro de la habilidad de la técnica iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse a lo largo de un amplio intervalo desde 0,01 hasta 1,000 mg por adulto al día. Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación para el sujeto que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo, preferiblemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se administra normalmente a un nivel de dosificación de desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

Según la presente divulgación, el inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario se administran al sujeto en forma de una composición farmacéutica. Normalmente, el inhibidor deSKI y el inhibidor del punto de control inmunitario pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y a composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un

mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, a un diluyente, a un material de encapsulación o a una formulación no tóxicos auxiliares de cualquier tipo. En las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias comprenden formas para vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal. Normalmente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estos pueden ser, en particular, disoluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones especialmente liofilizadas secas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones 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 jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las disoluciones que comprenden los compuestos dados a conocer en el presente documento como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. El inhibidor de SKI y el inhibidor del punto de control inmunitario pueden 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 tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales 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 férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína, y similares. El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como 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 microorganismos puede lograrse mediante 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 lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las disoluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos típicos de preparación son las técnicas de secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos. También se contempla la preparación de disoluciones más, o altamente, concentradas para inyección directa, en la que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos a un área tumoral pequeña. Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar tamponada de manera adecuada si fuera necesario y, en primer lugar, hacer que el diluyente líquido sea isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, pueden emplearse medios acuosos estériles que conocerán los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Se producirá necesariamente cierta variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que esté tratándose. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

La presente divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y estas figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la

presente divulgación.

Figuras

5 Figura 1. La regulación por disminución de SK1 reduce el desarrollo de tumor de melanoma en ratones. (A) Se midió la actividad enzimática de SKI en células Yumm transfectadas de manera estable con un control (shCtrl) o dos ARNhc dirigidos a SK1: shSK1 y shSK1(2). Se compara la actividad enzimática (calculada como pmol/min/mg de proteínas) en células transfectadas con shSK1 con la de las células shCtrl. Los datos son medias \pm eem de 3 experimentos independientes. (B-D) Se inyectaron células Yumm shCtrl o shSK1 (3,105) en la dermis de ratones C57BL/6 de tipo natural (WT) (B y C) o ratones deficientes en CD8 (D). Se determinó el volumen tumoral en los días indicados (B y D) o al final del experimento (C, día 26). Los perfiles de crecimiento se presentan como la media del volumen tumoral \pm EEM y son representativos de al menos dos experimentos independientes. (B y C n=12 por grupo, D n=8 por grupo). Se compararon las muestras usando la prueba de Mann-Whitney. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

15 Figura 2. La regulación por disminución de SK1 aumenta la proliferación y activación de células T CD8+ y, a la inversa, reduce las Treg. Se inyectaron células de melanoma murino Yumm shCtrl o shSK1 en ratones C57BL/6 y se analizaron los TIL el día 11 mediante el uso de citometría de flujo. (A) Porcentajes de células T CD8+, Foxp3+ CD4+ (Treg) y Foxp3- CD4+ y razón CD8+/Treg en tumores el día 11. (B y C) Se evaluó la proporción de células CD8+ (B) y Treg (C) que expresan Ki67, PD-1 y CTLA-4. Cada símbolo representa un tumor independiente (n = 9 ratones por grupo). Los resultados son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Se compararon las muestras usando la prueba de Mann-Whitney. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

25 Figura 3. La regulación por disminución de SK1 en células tumorales incrementa la eficacia de la terapia anti-CTLA-4 o anti-PD-1. Se provocaron los ratones con 3,105 células Yumm shCtrl o shSK1 el día 0, y luego se trataron con anticuerpo de control (paneles superiores), α -CTLA-4 (días 7, 10 y 13) o/y α -PD-1 (días 5, 7 y 10). (A y B) Se representan curvas individuales para cada tumor (n=6-11 ratones por grupo). Insertos: los números indican el porcentaje de ratones libres de tumores el día 25. (C) Se representan curvas de supervivencia acumulada (prueba de rangos logarítmicos: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). (D) Se representa la razón CD8/Treg en tumores el día 11 como caja de Tukey (n=10 por grupo). Los resultados son representativos de al menos 2 experimentos independientes. Se compararon las muestras usando la prueba de Mann-Whitney. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

35 Figura 4. La inhibición farmacológica de SK1 sinergiza con el bloqueo de CTLA-4 para erradicar los tumores de melanoma. Se provocaron los ratones con 3,105 células Yumm no transfectadas el día 0, y luego se trataron o no con SKI-I los días 5, 7, 10, 13 y 15. Se inyectó anticuerpo de control o α -CTLA-4 los días 7, 10 y 13. (A) Se representan los volúmenes tumorales determinados en los días indicados para tumores individuales (n=6 ratones por grupo). Insertos: los números indican el porcentaje de ratones libres de tumores el día 30. (B) Curvas de supervivencia acumulada (prueba de rangos logarítmicos: *p<0,05).

45 Figura 5. La inhibición farmacológica de SK1 sinergiza con el bloqueo del anticuerpo anti-PD-1 para reducir el crecimiento tumoral en melanoma y carcinoma de colon. (A) Se provocaron los ratones con 3,105 células Yumm no transfectadas el día 0, y luego se trataron o no con SKI-I los días 5, 7, 10, 13 y 15. Se inyectó anticuerpo de control o α -PD-1 los días 5, 7 y 10 (n=11-12 ratones por grupo). (B) Se inocularon los ratones con 3,105 células MC38 el día 0, y luego se trataron o no con SKI-I los días 5, 7, 10, 13 y 15. Se inyectó anticuerpo de control o α -PD-1 los días 7 y 10 (n=4-6 ratones por grupo). Se determinó el volumen tumoral (medias \pm eem para cada grupo) en los días indicados. Se compararon las muestras usando la prueba de Mann-Whitney. *p < 0,05.

50 Ejemplo

Material y métodos

Cultivo celular

55 Las células de melanoma murino Yumm, que albergan la mutación BRAFV600E, delección Pten y Cdkn2a [1], fueron proporcionadas amablemente por el Dr. S. Tartare-Deckert (INSERM U1065 Niza, Francia). Se hicieron crecer las células Yumm como monocapas en medio OptiMEM complementado con suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor al 3% en presencia del 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada a 37°C. Para garantizar la autenticidad de la línea celular, se usaron líneas de células Yumm para un número limitado de pases y se sometieron a prueba de manera rutinaria para detectar la expresión de proteínas del linaje de melanocitos tales como MelanA/MART1. Las células MC38 fueron proporcionadas amablemente por los Dr. T. Chardes y A. Pélegrin (INSERM U1194, Montpellier, Francia) y se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM y Hepes 10 mM.

65

Transfección de células

Se transfectaron conjuntamente las células Yumm, en una razón 1:10, con el vector vacío pEGFP-N y un plásmido de ARNhc de SK1 (shSK1 o shSK1(2)) (ARNhc de Thermoscientific) o un plásmido de ARNhc no de direccionamiento de control (shCtrl) (pLK01, Addgene). En resumen, se sembraron 500.000 células en matraces de cultivo celular T25. Se diluyeron los plásmidos en medio OptiMEM (Thermofisher) sin suero. Se transfectaron las células con 10 µg de oligómero de ARNhc usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron las células transfectadas con 0,4 mg/ml de G418 y 1,5 µg/ml de puromicina y se clasificaron las células que expresan GFP mediante FACS. Se mantuvieron los transfectantes estables en medio que contenía 1 µg/ml de puromicina; para los experimentos, se cultivaron las células en medio sin puromicina.

Ensayo enzimático de SK1

Se determinó la actividad de SK1 tal como se describe (Lavieu, Scarlatti *et al.* 2008) con pequeñas modificaciones.

Inyecciones de células tumorales y tratamientos en ratones

Se llevaron a cabo los experimentos con animales según las directrices nacionales e internacionales, y el protocolo de la presente invención fue aprobado por el Comité de Ética Regional de Mediodía-Pirineos. Se inyectaron por vía intradérmica 3,105 de las líneas de células Yumm (no transfectadas, shCtrl, shSK1 o shSK1(2)) en el costado de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad (Charles River, L'Arbresle, Francia). Los ratones C57BL/6 deficientes en CD8 fueron un obsequio del Prof. J. van Meerwijk (INSERM U1043, Toulouse, Francia). Se calculó el volumen tumoral usando un compás calibrador los días indicados tal como se describe (Albinet, Bats *et al.* 2014). Para los experimentos de combinación que implican células Yumm shCtrl o shSK1, se provocaron los ratones por vía intradérmica (i.d.) con 3,105 células el día 0 en su costado derecho. Luego, a los ratones se les inyectó por vía i.p. tres veces anticuerpo anti-CTLA-4 (200 µg por ratón en D7 y 100 µg por ratón en D10 y D13) y/o anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo de control de isotipo (200 µg por ratón en D5, D7 y D10). Se midieron los volúmenes tumorales cada 2-3 días. Los anticuerpos anti-CTLA-4 (9H10), anti-PD-1 (RMP1-14) y de control de isotipo (2A3) se adquirieron de BioXcell.

Para el tratamiento con SKI-I, 5 días después de la implantación de células Yumm o MC38, se trataron o no los ratones con 50 mg/kg de SKI-I (N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metilideno]-3-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-5-carbohidrazida, Enamine) en 50 µl de una mezcla de DMSO (10%), Cremophor (5%), Tween-80 (5%) y glucosa (80%) (i.p.). Los ratones recibieron tratamientos adicionales de SKI-I los días 7, 10, 13 y 15. A los ratones con tumores Yumm se les inyectaron por vía i.p. anticuerpo anti-CTLA-4 o anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo de control tal como se describió anteriormente. Para los tumores MC38, a los ratones se les inyectó por vía i.p. dos veces anticuerpo anti-PD-1 (100 µg por ratón en D7 y D10).

Análisis del contenido de leucocitos en tumores

Se inyectaron por vía intradérmica células Yumm (3,105) en ratones C57BL/6. El día 11, se sacrificaron los ratones, y se recogieron los tumores y se digirieron con kit de disociación de tumores de ratón y GentleMacs (Miltenyi). Se contaron las células y se tiñeron con los anticuerpos indicados y colorantes reactivos LIVE/DEAD (Invitrogen) antes del análisis por citometría de flujo (BD LSRFortessa X-20). Los análisis se restringieron a células viables y se realizaron usando anticuerpo anti-CD45 de ratón (BD Biosciences), anticuerpo anti-Thy1 de ratón (Biolegend), anticuerpo anti-CD8 de ratón (Biolegend), anticuerpo anti-CD4 de ratón (BD Biosciences), anticuerpo anti-Foxp3 de ratón (eBioscience), anticuerpo anti-Ki-67 de ratón (BD Bioscience), anticuerpo anti-PD-1 de ratón (eBioscience) o anticuerpo anti-CTLA-4 de ratón (eBioscience). Los controles de isotipo eran de BD Biosciences, Biolegend o eBioscience.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados se expresan como medias ± eem. Se usó la prueba de la t de Student para las comparaciones estadísticas entre grupos, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Los datos de supervivencia tumoral se analizaron con el método de Kaplan-Meier. Se usó la prueba de rangos logarítmicos para comparar las curvas de supervivencia para los diferentes subgrupos en análisis univariantes.

Resultados

La regulación por disminución de SK1 reduce el crecimiento tumoral e incrementa las respuestas antitumorales al melanoma

Con el fin de evaluar el efecto de SKI en un modelo de ratón C57BL/6 singénico de melanoma, se usó una línea de células tumorales trasplantable (células Yumm) establecida a partir de un ratón BrafV600E/+; Pten-/-; CDKN2A-/- (Pencheva, Buss *et al.* 2014). Se generaron células Yumm con atenuación génica de SKI estables mediante el uso de una tecnología de silenciamiento mediado por ARNhc. Se obtuvieron dos líneas celulares resistentes a puromicina; shSK1 y shSK1(2), que presentaban una actividad enzimática marcadamente reducida de SKI (alrededor del 60% de inhibición) (figura 1 A). Luego, se inyectaron por vía intradérmica las células Yumm, con atenuación génica de SKI o sin ella (shCtrl) para SKI, en ratones C57BL/6, y se monitorizó el crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral de células Yumm shSK1 y shSK1(2) era significativamente menor que el de células Yumm shCtrl (figuras 1B y C). Curiosamente, se observó una regresión tumoral después del día 11 en ratones WT inyectados con células ShSK1 que pudo reflejar una respuesta inmunitaria anti-melanoma aumentada. Sin embargo, este efecto probablemente no era suficiente para obtener una respuesta inmunitaria de larga duración, supuestamente debido a los mecanismos de escape inmunitario. De manera importante, la atenuación génica de SKI no pudo alterar el crecimiento del melanoma Yumm en ratones deficientes en CD8 (figura 1D).

Para evaluar el impacto de la regulación por disminución de SKI sobre la composición del infiltrado de linfocitos intratumorales, se analizaron los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) el día 11. De interés fue el hallazgo de que la regulación por disminución de SK1 aumentó la proporción de células T CD8+ y disminuyó la proporción de células T Foxp3+ CD4+ (Treg) conduciendo a un aumento de 4 veces en la razón CD8/Treg (figura 2A). Además, el análisis de la proliferación (que se evalúa monitorizando la expresión de Ki67) y la activación (que se evalúa mediante la expresión de PD-1 y CTLA-4) de los TIL mostró que la atenuación génica de SKI aumentó significativamente la proliferación y activación de células T CD8+ (figura 2B) y, a la inversa, disminuyó la proliferación de Treg así como la expresión de CTLA-4 (figura 2C).

La regulación por disminución de SK1 mejora la respuesta a la inmunoterapia

Dado que la regulación por disminución de SKI estaba asociada con un aumento de las células T CD8+ activadas por tumores, se planteó la hipótesis de que la inhibición de SKI puede mejorar la eficacia de los inhibidores del punto de control inmunitario (ICI, por ejemplo, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-PD-1). Tal como se muestra en la figura 3, mientras que el tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 o/y anticuerpo anti-PD-1 solo tuvo efectos limitados sobre los tumores Yumm establecidos (figura 3A), el silenciamiento de SKI incrementó drásticamente la respuesta al tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 o anticuerpo anti-PD-1, conduciendo a un rechazo tumoral en el 100% y el 67% de los animales, respectivamente (figura 3B). Además, la regulación por disminución de SKI mejoró significativamente la supervivencia global (figura 3C). De hecho, esta combinación (ICI + silenciamiento de SKI) indujo curas duraderas en el 100% y el 42% de los ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-PD-1, respectivamente, 2 meses después del cese de la terapia, lo que sugiere el establecimiento de una memoria inmunológica eficaz. Curiosamente, entre los supervivientes a largo plazo, ninguno de ellos desarrolló un tumor tras una segunda inyección de células de melanoma, indicando que estaban completamente vacunados contra esta línea de células de melanoma (datos no mostrados). Esta respuesta incrementada al ICI estaba asociada con una razón CD8/Treg aumentada en tumores (figura 3D). Cabe destacar que la razón CD8/Treg aumentó de manera impresionante en los tumores del grupo Yumm ShSK1 + anticuerpo anti-CTLA-4 (cambio en veces = 16), lo que pudo explicar la regresión tumoral total observada cuando se usa esta combinación.

Respuesta inmunitaria antineoplásica sinérgica del bloqueo del punto de control inmunitario y la inhibición farmacológica de SK1.

Para confirmar adicionalmente la potencia de la terapia combinada basada en la regulación por disminución de SKI y el ICI, se usó SKI-I, un inhibidor farmacológico de SKI (French, Schrecengost *et al.* 2003). Los presentes datos muestran que, mientras que el bloqueo de CTLA-4 solo no condujo a ningún rechazo tumoral en absoluto, la combinación de SKI-I + anticuerpo anti-CTLA-4 generó una gran sinergia, dando como resultado el rechazo total en el 67% de los ratones (figura 4A) y mejoró la supervivencia global (figura 4B). Para confirmar esta observación con el anticuerpo anti-PD-1, se trataron los ratones que albergaban tumores Yumm con SKI-I combinado o no con anticuerpo anti-PD-1. Tal como se muestra en la figura 5A, SKI-I incrementó la eficacia del anticuerpo anti-PD-1. De manera importante, este efecto también se observó en ratones inoculados con carcinoma de colon MC38 (figura 5B).

En conjuntos, los presentes datos indican que se logrará un mayor éxito terapéutico combinando el bloqueo del punto de control inmunitario con agentes que modulan la ruta de SKI/SIP oncogénica. La interferencia con el metabolismo de esfingolípidos puede facilitar el desarrollo de novedosas vías para la intervención terapéutica en melanoma así como en otros tipos de cánceres.

Bibliografía

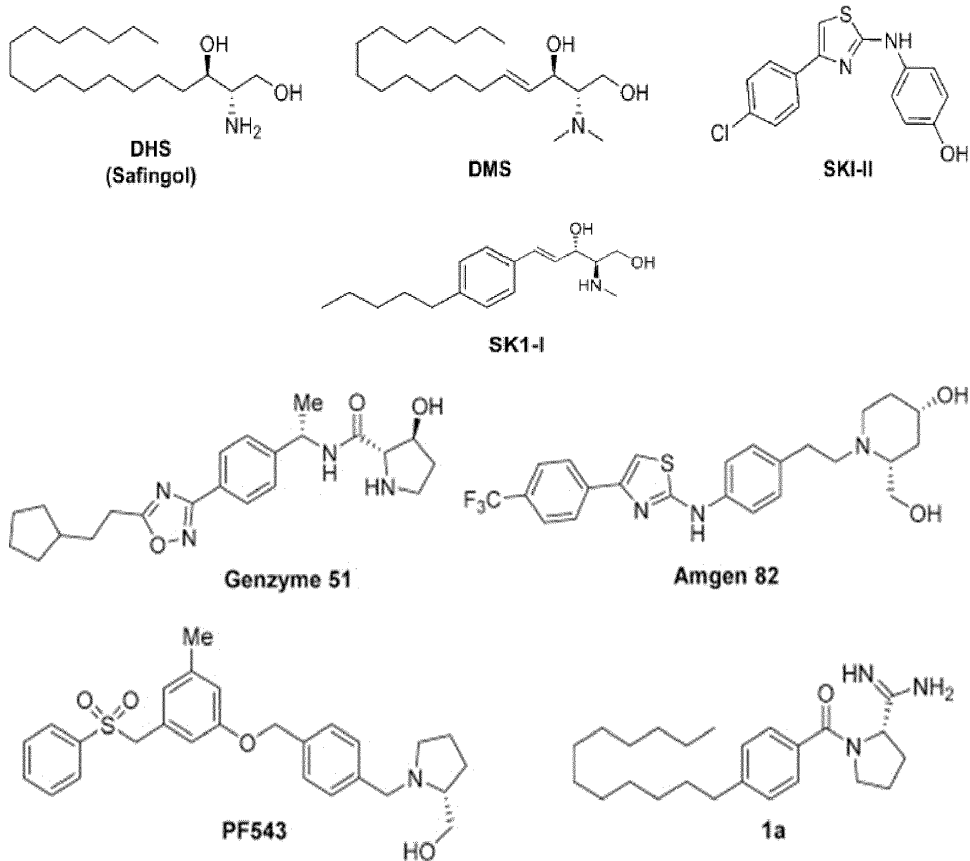
A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece la presente

divulgación.

- Albinet, V., M. L. Bats, A. Huwiler, P. Rochaix, C. Chevreau, B. Segui, T. Levade y N. Andrieu-Abadie (2014).
5 "Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells". *Oncogene* 33(26): 3364-3373.
- French, K. J., R. S. Schrecengost, B. D. Lee, Y. Zhuang, S. N. Smith, J. L. Eberly, J. K. Yun y C. D. Smith (2003).
"Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase". *Cancer Res* 63(18): 5962-5969.
- 10 Lavieu, G., F. Scarlatti, G. Sala, S. Carpentier, T. Levade, R. Ghidoni, J. Botti y P. Codogno (2008).
"Sphingolipids in macroautophagy". *Methods Mol Biol* 445: 159-173.
- Pencheva, N., C. G. Buss, J. Posada, T. Merghoub y S. F. Tavazoie (2014). "Broad-spectrum therapeutic
15 suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation". *Cell* 156(5): 986-1001.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, en el que el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-CTLA4 y anticuerpos anti-PD-1.
2. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma gigantomucinoso y fusocelular; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma epidermoide; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma pilomatrixial; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenoide; adenocarcinoma en pólipos adenomatosos; adenocarcinoma, poliposis colónica familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; adenocarcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma corticosuprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; ceruminoso; adenocarcinoma; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor estromal de ovario, maligno; tecoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma embrionario; rhabdomyosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto de Müller; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; bocio del ovario, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendoteloma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor gigantomucinoso de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, gigantomucinoso, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; mastocitoma; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia plasmocítica; eritroleucemia; leucemia de células de linfoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia mastocítica; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y tricoleucemia.
3. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto padece un melanoma.
4. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto padece un melanoma resistente a los inhibidores de BRAF.
5. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el sujeto padece un melanoma con deshidrogenasa (LDH) en plasma elevada.
6. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el cáncer se caracteriza por una baja infiltración tumoral de células T CD8+.
7. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el inhibidor de SKI se selecciona del grupo que consiste en:



5

8. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el inhibidor de SKI es N'-[(2-hidroxinaftalen-1-il)metiliden]-3-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-5-carbohidrazida.

10

9. Inhibidor de SKI en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el inhibidor de SKI es un inhibidor de la expresión de SKI.

15

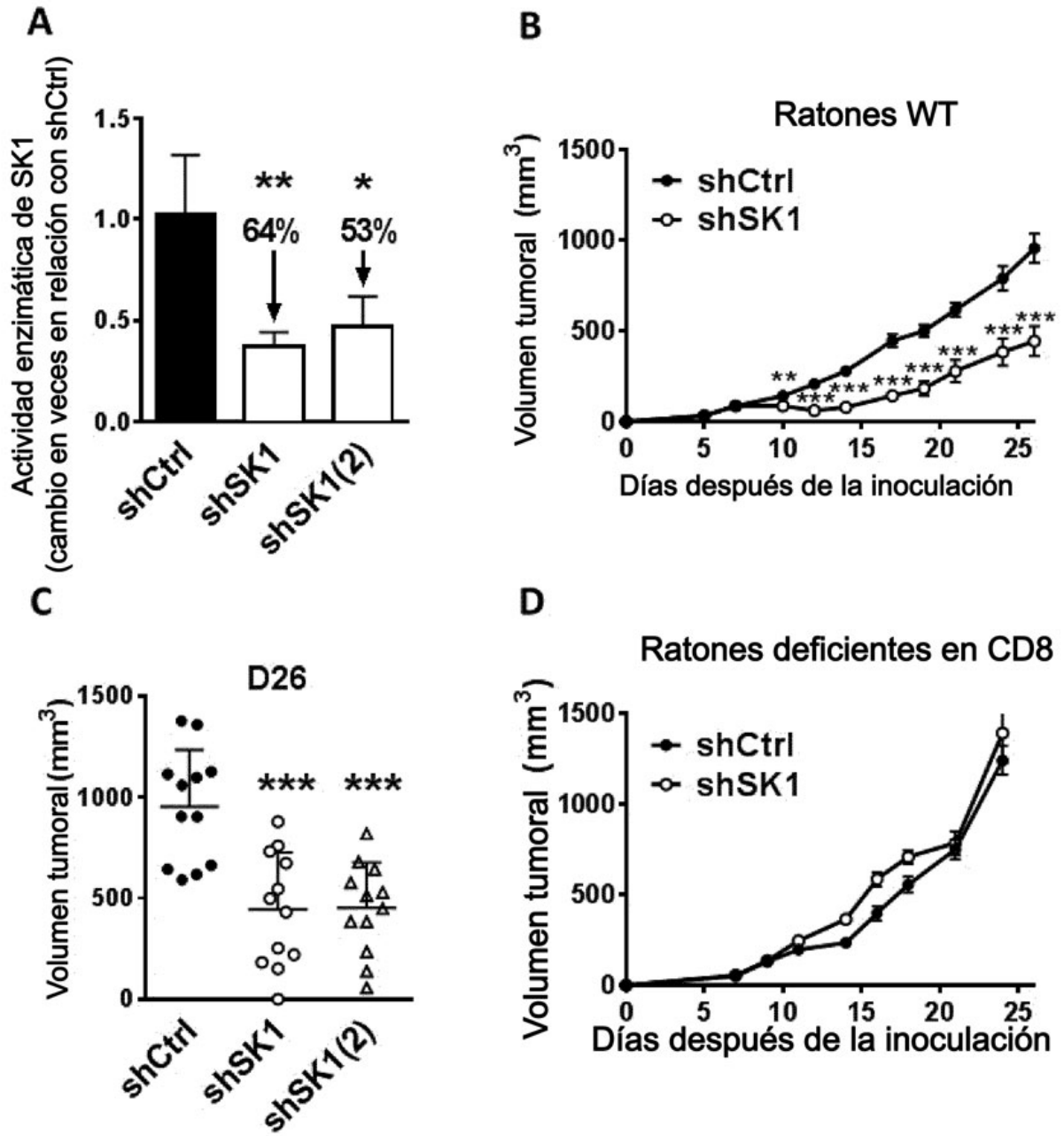


Figura 1

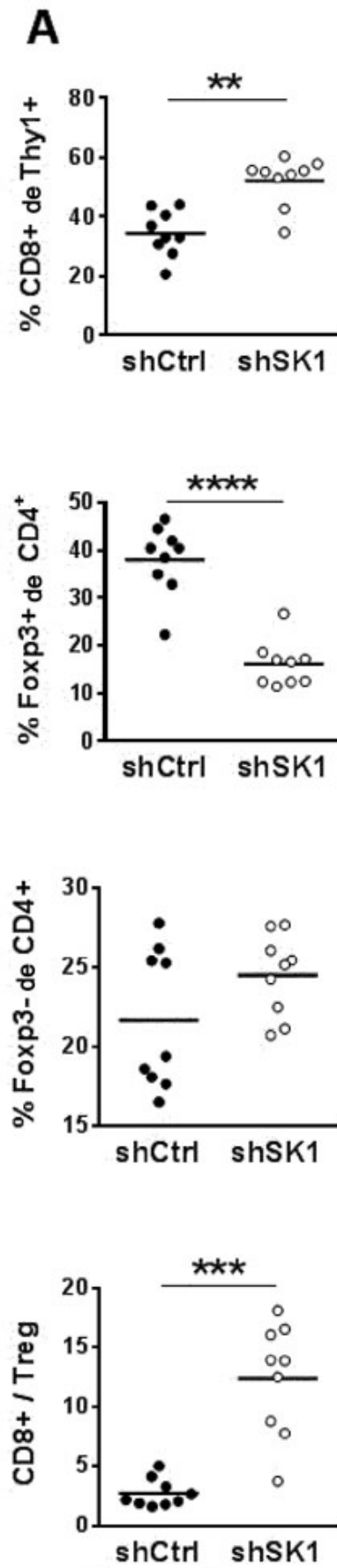


Figura 2A

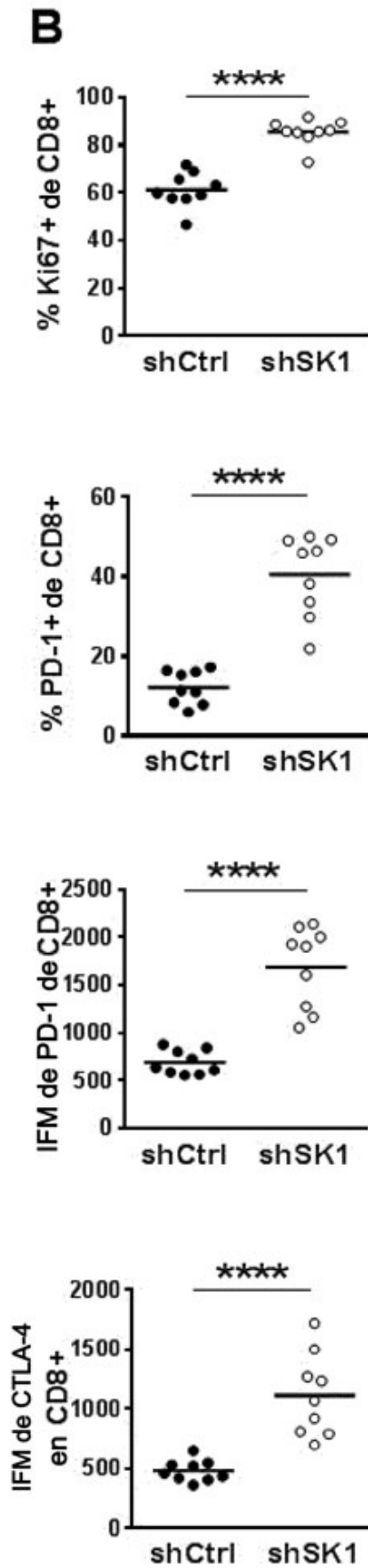


Figura 2B

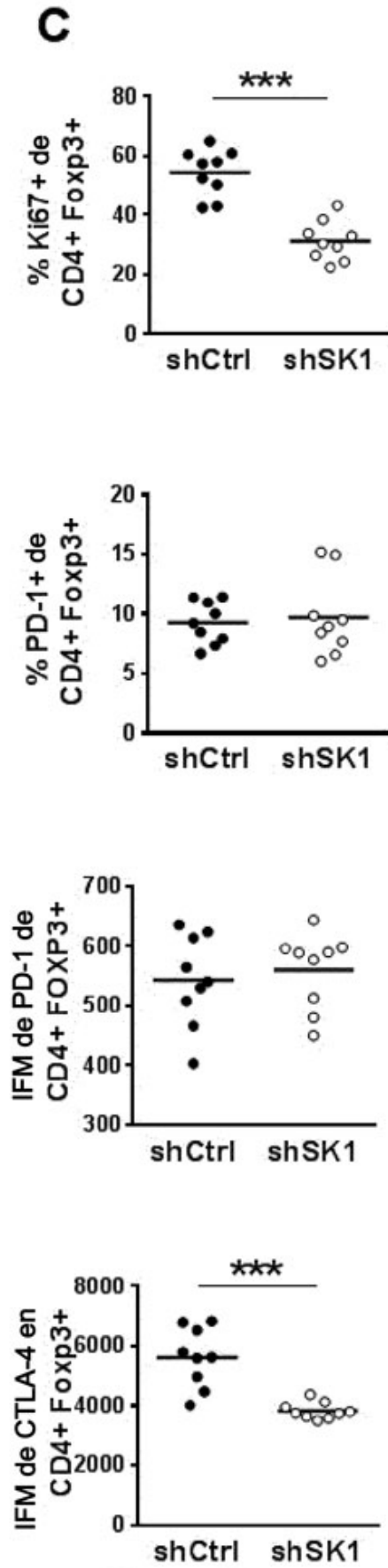


Figura 2C

A

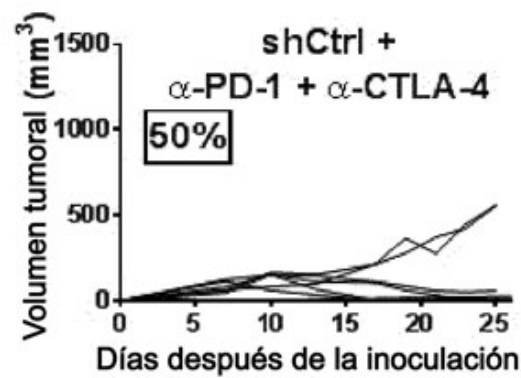
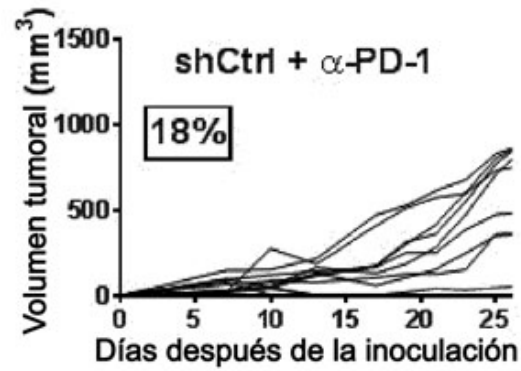
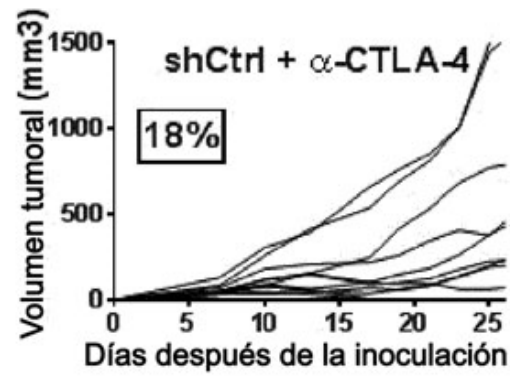
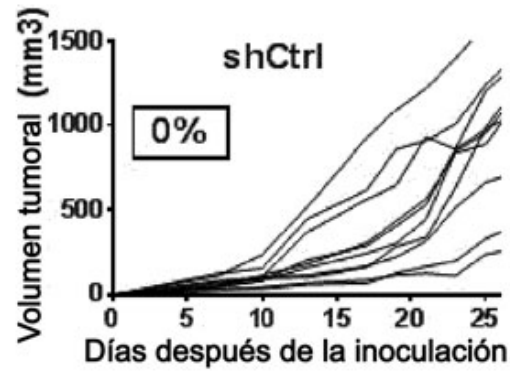


Figura 3A

B

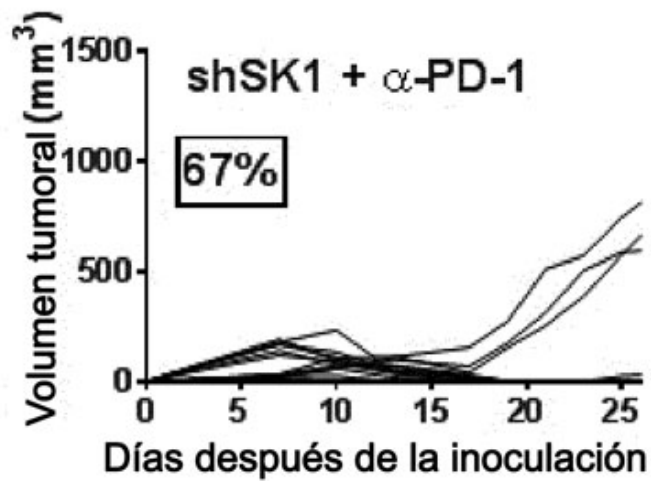
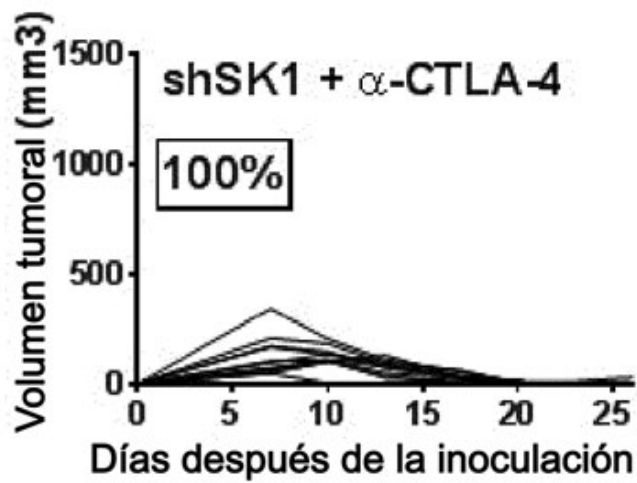
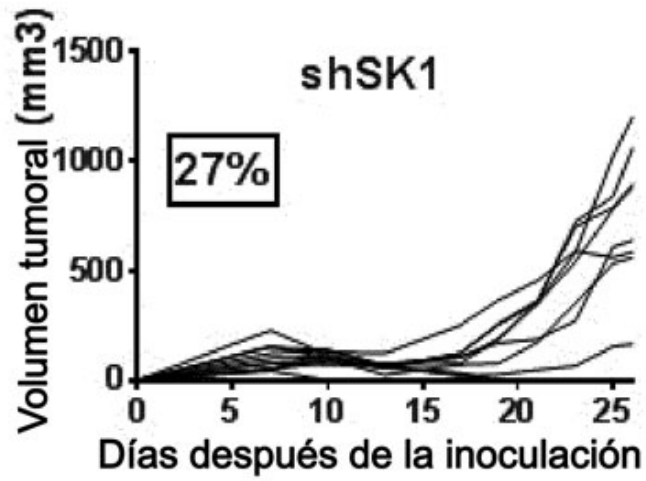


Figura 3B

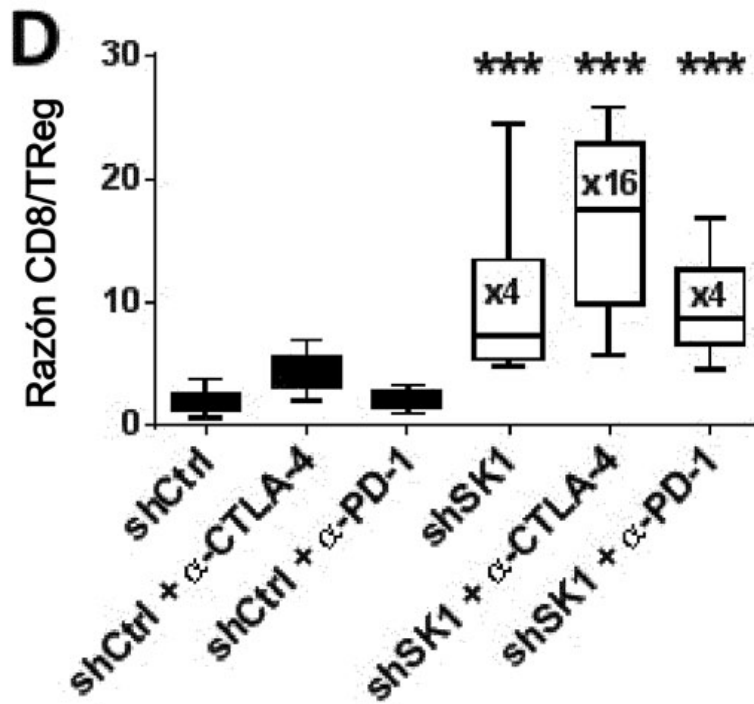
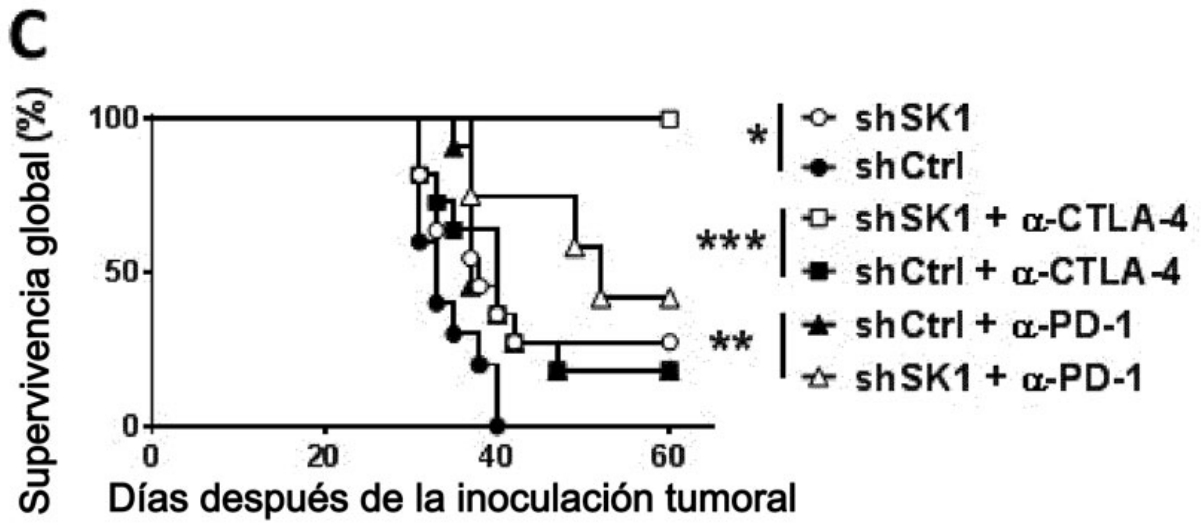
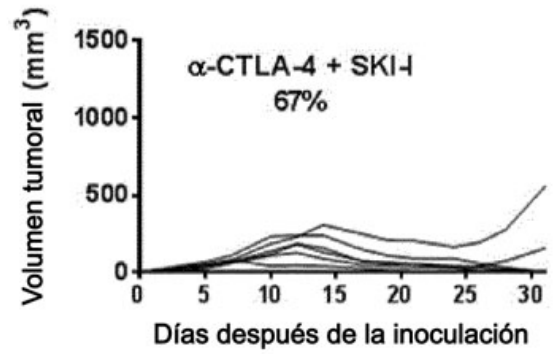
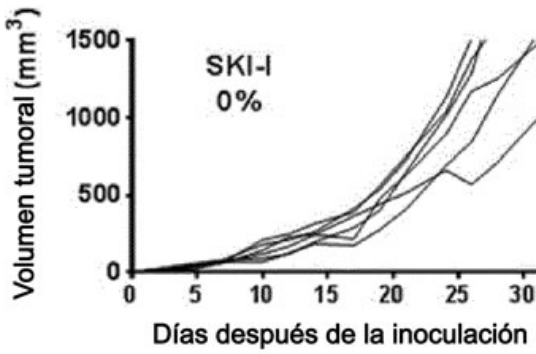
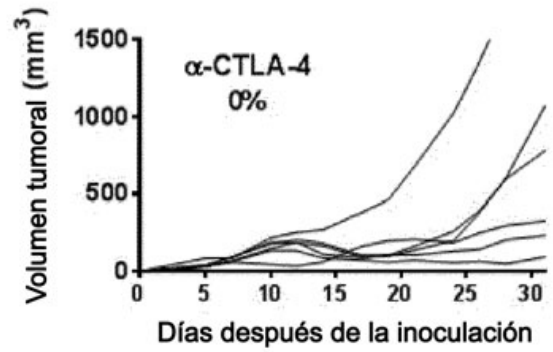
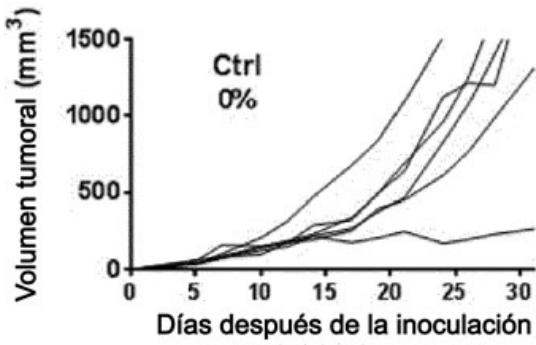


Figura 3 C y D

A



B

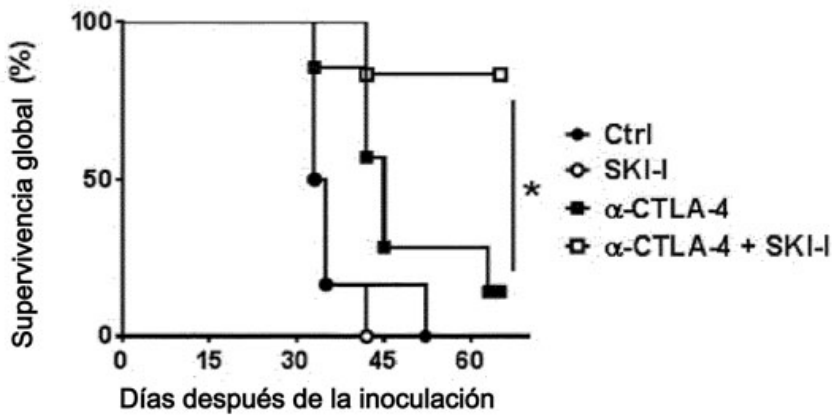
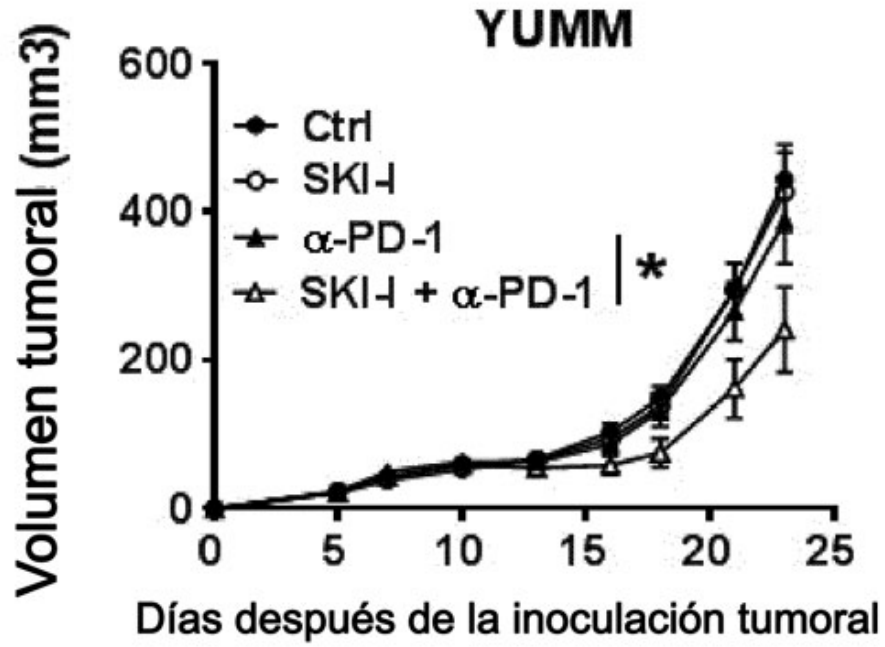


Figura 4

A



B

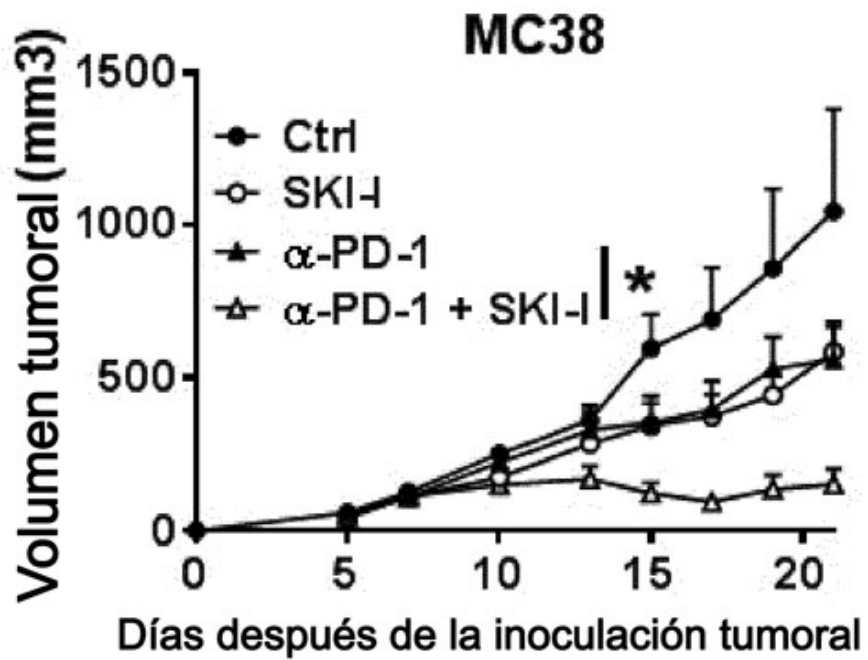


Figura 5