

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 065**

51 Int. Cl.:

A61K 35/768 (2015.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2018** **PCT/US2018/028952**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018** **WO18195552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2018** **E 18723290 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023** **EP 3612201**

54 Título: **Terapia de combinación de virus vaccinia oncolítica y un inhibidor de punto de control**

30 Prioridad:

21.04.2017 US 201762488623 P

25.08.2017 US 201762550486 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2024

73 Titular/es:

SILLAJEN, INC. (100.0%)
607-ho 6F 111 Hyoyeol-ro, Buk-gu
Busan 46508, KR

72 Inventor/es:

KIM, CHAN;
JEON, HONGJAE;
MOON, EUN, SANG;
CHI, SUNGKUON;
CHOI, JIWON, SARAH;
JUNG, JOON-GOO y
BAE, JUNGU

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 971 065 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

Terapia de combinación de virus vaccinia oncolítica y un inhibidor de punto de control

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se define en las reivindicaciones.

10 [0002] La presente invención se refiere de manera general a virología y medicina. En determinados aspectos, la invención se refiere a una combinación terapéutica que comprende un virus vaccinia oncolítico replicativo y un inmunomodulador para el uso de acuerdo con la reivindicación 1.

ANTECEDENTES

15 [0003] La homeostasis de tejido normal es un proceso altamente regulado de proliferación celular y muerte celular. Un desequilibrio de cualquiera de las dos de proliferación celular o muerte celular se puede desarrollar en un estado cancerígeno. Por ejemplo, cáncer cervical, renal, de pulmón, pancreático, colorrectal y cerebral solamente son unos pocos ejemplos de muchos cánceres que pueden producirse. De hecho, la incidencia de cáncer es tan alta que se atribuyen más de 500.000 muertes al año a cáncer en Estados Unidos solamente.

20 [0004] Los virus oncolíticos de replicación selectiva son prometedores para el tratamiento de cáncer. Estos virus pueden causar muerte de células tumorales a través de efectos oncolíticos dependientes de replicación directa y/o dependientes de expresión de gen viral. Sin embargo, la supresión inmune mediante tumores y la eliminación prematura del virus a menudo genera respuestas inmunes específicas de tumor débiles, limitando el potencial de estos virus como un terapéutico de cáncer.

[0005] De manera similar, los inhibidores de punto de control inmunitario han demostrado ser prometedores en el tratamiento de determinados cánceres, sin embargo, solamente un porcentaje limitado de pacientes alcanzan respuesta clínica objetiva. Liu et al. (Nat Commun 8, 14754, 2017) describe que la combinación racional de virus vaccinia oncolítico y bloqueo de PD-L1 funciona de manera sinérgica para potenciar la eficacia terapéutica. WO2016/009017 A1 describe una combinación de virus oncolítico y moduladores de punto de control inmunitario. WO2016/144564 A2 describe el uso de virus vaccinia ankara (MVA) modificado no replicante desactivado como monoinmunoterapia o en combinación con agentes de bloqueo de puntos de control inmunitarios para tumores sólidos. Boutros et al. (Nat Rev Clin Oncol. agosto de 2016;13(8):473-86) describe perfiles de seguridad de anticuerpos anti-CT- LA-4 y anti-PD-1 por separado y en combinación. Callahan et al. (Immunity. 17 de mayo de 2016; 44(5):1069-78) describe los co-receptores de células T de direccionamiento para terapia de cáncer. Liu et al. (Mol Ther. septiembre de 2008; 16(9):1637-42) describe que el virus de viruela JX-594 oncolítico dirigido manifiesta actividades antitumorales, antivascuales y anti-VHB en pacientes con carcinoma hepatocelular. Breitbach et al. (Oncolytic Virother. 28 de enero de 2015; 4:25-31) describe Pexa-Vec inmunoterapéutico oncolítico (JX-594). NCT03071094 (un identificador de ClinicalTrials.gov) describe un ensayo de evaluación de seguridad y eficacia de la combinación de la terapia oncolítica de Pexa-Vec con el anticuerpo nivolumab que bloquea el receptor PD-1 en el tratamiento de primer nivel de carcinoma hepatocelular avanzado (HCC). NCT02977156 (un identificador de ClinicalTrials.gov) describe una estrategia de inmunización con inyecciones intratumorales de Pexa-Vec con ipilimumab en tumores sólidos avanzados metastásicos. Sigue siendo necesario mejorar terapias cancerígenas.

45 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se define en las reivindicaciones.

50 [0007] Los inventores actuales han descubiertos que la administración simultánea de un inhibidor de punto de control inmunitario y un virus vaccinia oncolítico replicativo administrado por la vía intratumoral tal como se define en las reivindicaciones a un modelo de cáncer clínicamente relevante, en el que los agentes se administran de manera simultánea durante la primera y preferiblemente durante múltiples administraciones consecutivas, genera efectos antitumorales sinérgicos. Por consiguiente, se da a conocer una terapia de combinación para ser utilizada de acuerdo con la reivindicación 1.

[0008] El virus vaccinia oncolítico se puede administrar por la vía intratumoral. En determinados aspectos, la administración simultánea de los miembros de la combinación farmacéutica proporciona una inmunidad antitumoral potenciado e incluso sinérgica en comparación con cualquier tratamiento por separado.

60 [0009] En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra en una cantidad eficaz para inducir la expresión de una proteína de punto de control inmunitario en el tumor. En algunas realizaciones, el tumor no expresa la proteína de punto de control inmunitario o expresa la proteína de punto de control inmunitario a un nivel relativamente bajo antes de la administración del virus vaccinia oncolítico replicativo. En

algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a la proteína de puesto de control inmunitario, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, anticuerpo completamente humano, proteína de fusión o combinación de los mismos.

[0010] En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario de la combinación inhibe una proteína de puesto de control inmunitario seleccionada entre el grupo que consiste en antígeno-4 de linfocito T citotóxico (CTLA4 o CTLA-4), proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), B7-H3, B7-H4, proteína 3 de membrana de células T (TIM3), galectina 9 (GAL9), gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), supresor de la activación de las células T que contiene el dominio V de la inmunoglobulina (Ig) (VISTA), receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas (KIR), atenuador de linfocitos B y T (BTLA), inmunoreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (TIGIT), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o una combinación de los mismos. En un aspecto adicional, el inhibidor de puesto de control interactúa con un ligando de una proteína de puesto de control que incluye sin limitación, CTLA-4, PD-1, B7-H3, B7-H4, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, BTLA, TIGIT o una combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario es un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo humano o anticuerpo humanizado), un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión que se une de manera específica a una proteína de puesto de control inmunitario o un ligando de la misma.

[0011] En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de puesto de control inmunitario de la combinación es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de manera específica a (e inhibe) PD-1, PD-L1, PD-L2, TIGIT, TIM3, LAG3 o CTLA4. Como un ejemplo no limitativo, se da a conocer un método de tratamiento y/o prevención de cáncer en un mamífero que comprende la administración simultánea al sujeto de cantidades eficaces de (i) un virus vaccinia oncolítico replicativo mediante inyección intratumoral y (ii) un inhibidor de CTLA4 y/o PD-1.

[0012] En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a PD-1 o PD-L1, preferiblemente seleccionado entre el grupo que consiste en: BMS-936559, atezolizumab, durvalumab, avelumab, nivolumab, pembrolizumab y lambrolizumab. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a CTLA4, preferiblemente seleccionado entre el grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab. En algunas realizaciones, los inhibidores de puesto de control inmunitario se administran de manera simultánea al sujeto con el virus vaccinia oncolítico. En algunas realizaciones, se le administra al sujeto de manera simultánea: (a) un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de PD-1 y un virus vaccinia oncolítico replicativo; (b) un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de IDO y un virus vaccinia oncolítico replicativo; (c) un inhibidor de PD-1, un inhibidor de IDO y un virus vaccinia oncolítico replicativo; o (d) un inhibidor de PD-1, un inhibidor de CTLA4, un inhibidor de IDO y un virus vaccinia oncolítico replicativo; (e) un inhibidor de LAG3, un inhibidor de PD-1 y un virus vaccinia oncolítico replicativo; o (f) un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de PD-1 y un virus vaccinia oncolítico replicativo. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Wyeth, una cepa Western Reserve, una cepa Lister o una cepa Copenhagen. En algunas realizaciones, el virus vaccinia comprende una o más modificaciones genéticas para aumentar la selectividad del virus para células cancerígenas, preferiblemente el virus se modifica para que carezca de timidina cinasa funcional y/o para que carezca del factor de crecimiento de vacuna funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia comprende un gen 14L y/o F4L funcional.

[0013] En algunas realizaciones, el virus vaccinia es una cepa Wyeth, una cepa Western Reserve, una cepa Lister o una cepa Copenhagen con una o más modificaciones genéticas para aumentar la selectividad del virus vaccinia para células cancerígenas tal como desactivación del gen de timidina cinasa (TK) y/o el gen de factor de crecimiento de virus vaccinia (VGF). El virus vaccinia se modifica para expresar una citocina GM-CSF. Las citocinas adicionales incluyen IL-2, IL-4, IL-5 IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-24, IFN- γ , y/o TNF- α .

[0014] En otras realizaciones relacionadas, el virus vaccinia oncolítico replicativo se modifica para expresar un antígeno tumoral tal como, sin limitación, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, CEA, AIM2, CDK4, BMI1, COX-2, MUM-1, MUC-1, TRP-1 TRP-2, GP100, EGFRvIII, EZH2, LICAM, Livin, Livin β , MRP-3, Nestin, OLIG2, SOX2, virus de papiloma humano de oncogén E6, virus de papiloma humano de oncogén E7, ART1, ART4, SART1, SART2, SART3, B-ciclina, β -catenina, Gli1, Cav-1, cathepsina B, CD74, E-cadherina, EphA2/Eck, Fra- 1/Fosl 1, Gangliósido/GD2, GnT-V, β 1,6-N, Her2/neu, Ki67, Ku70/80, IL-13Ra2, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, MART-1, PROX1, PSCA, SOX10, SOX11, Survivin, caspasa-8, UPAR, CA-125, PSA, p185HER2, CD5, IL-2R, Fap- α , tenascina, antígeno p97 asociado a melanoma, WT-1, regulador de señalización de G-proteína 5 (RGS5), Survivin (BIRC5= inhibidor de baculovirus de la apoptosis que contiene un dominio de repetición 5), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGF-BP3), timidilato sintetasa (TYMS), proteína 2 inducible por hipoxia, gotas lipídicas asociadas inducibles por hipoxia (HIG2), metalopeptidasa 7 de la matriz (MMP7), homólogo 2 de purina (PRUNE2), similar a proteína RecQ (similar a helicasa Q1 de ADN) (RECQL), receptor de leptina (LEPR), inhibidor 1 de la respuesta del receptor ERBB (ERRFI1), proteína transmembrana 4 alfa lisosomal (LAPTM4A); RAB1B, familia del oncogén RAS (RAB1B), CD24, timosina beta 4 humana, ligado al cromosoma X (TMSB4X), proteína A6 de unión a calcio S100 humana (S100A6), receptor de adenosina A2 humano (ADORA2B), marco de lectura abierto 61 del cromosoma 16 (C16orf61), regulador ROD1 de la diferenciación 1 (ROD1), sirtuina-2 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT2), tubulina alfa 1c (TUBA1C), factor inhibidor de la ATPasa 1 (ATPIF1), antígeno 2 del estroma (STAG2), caseína cinasa y sustrato dependiente de ciclina 1 (NUCKS1). En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral de carcinoma de células renales.

En algunas realizaciones, el antígeno tumoral de carcinoma de células renales se selecciona entre el grupo que consiste en regulador de señalización de G-proteína 5 (RGS5), Survivin (BIRC5= inhibidor de baculovirus de la apoptosis que contiene un dominio de repetición 5), proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a insulina (GF-BP3), timidilato sintetasa (TYMS), proteína 2 inducible por hipoxia, gotas lipídicas asociadas inducibles por hipoxia (HIG2), metalopeptidasa 7 de la matriz (MMP7), homólogo 2 de purina (PRUNE2), similar a proteína RecQ (similar a helicasa Q1 de ADN) (RECQL), receptor de leptina (LEPR), inhibidor 1 de la respuesta del receptor ERBB (ERRFI1), proteína transmembrana 4 alfa lisosomal (LAPTM4A); RAB1B, familia del oncogén RAS (RAB1B), CD24, timosina beta 4 humana, ligado al cromosoma X (TMSB4X), proteína A6 de unión a calcio S100 humana (S100A6), receptor de adenosina A2 humano (ADORA2B), marco de lectura abierto 61 del cromosoma 16 (C16orf61), regulador ROD1 de la diferenciación 1 (ROD1), sirtuina-2 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT2), tubulina alfa 1c (TUBA1C), factor inhibidor de la ATPasa 1 (ATPIF1), antígeno 2 del estroma (STAG2), caseína cinasa y sustrato dependiente de ciclina 1 (NUCKS1).

[0015] En algunas realizaciones, el virus vaccinia se administra en una cantidad desde aproximadamente 10^7 hasta aproximadamente 10^{11} ufp, preferiblemente aproximadamente 10^8 - 10^{10} ufp, más preferiblemente aproximadamente 10^9 - 10^{10} ufp. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inhibitorio se administra en una cantidad desde aproximadamente 2 mg/kg hasta 15 mg/kg.

[0016] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica se administra a un mamífero para tratar y/o prevenir cáncer en un mamífero. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer del tipo de tumor sólido. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consisten en el grupo seleccionado entre melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de pecho, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, mesotelioma, cáncer gastrointestinal, leucemia, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de estómago, cáncer esofágico, sarcoma o cáncer de tiroides. En otras realizaciones preferidas, la combinación farmacéutica se administra a un mamífero para tratar una metástasis. En algunas realizaciones, el sujeto padece carcinoma de células renales.

[0017] El sujeto al que se trata con la combinación farmacéutica es un sujeto humano. En un aspecto relacionado, el sujeto que necesita tratamiento es un humano con un cáncer que es refractario (o resistente) al tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos y/o refractario al tratamiento con uno o más anticuerpos. En realizaciones específicas, el humano padece un cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal) que es refractario (o resistente) a un tratamiento que comprende un inhibidor de puesto de control inmunitario y, opcionalmente, también es refractario al tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos. En otras realizaciones, el humano que necesita el tratamiento es un humano identificado como un candidato para la terapia con uno o más inhibidores de puesto de control inmunitario.

[0018] En algunas realizaciones, el sujeto ha fracasado durante como mínimo un tratamiento con quimioterapia o inmunoterapia anterior. En algunas realizaciones, el sujeto padece un cáncer que es refractario para una terapia con inhibidor de puesto de control inmunitario, preferiblemente el cáncer es resistente al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-CTLA-4. En algunas realizaciones, el sujeto se identifica como un candidato para una terapia con inhibidor de puesto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una terapia adicional seleccionada entre quimioterapia (agentes alquilantes, análogos de nucleósidos, modificadores de citoesqueletos, agentes citostáticos) y radioterapia. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una terapia con virus oncolítico adicional (por ejemplo, rhabdovirus, virus del bosque Semliki). En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, una primera dosis del virus vaccinia oncolítico replicativo y una primera dosis del inhibidor de puesto de control inmunitario se administran de manera simultánea al sujeto seguido de como mínimo una administración simultánea consecutiva posterior del virus y el inhibidor de puesto de control al sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende como mínimo una primera, segunda y tercera administración simultánea consecutiva del virus vaccinia oncolítico replicativo y el inhibidor de puesto de control al sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende como mínimo una primera, segunda, tercera y cuarta administración simultánea consecutiva del virus vaccinia oncolítico replicativo y el inhibidor de puesto de control al sujeto. En algunas realizaciones, la administración simultánea de la primera dosis del virus vaccinia oncolítico replicativo y la primera dosis del inhibidor de puesto de control inmunitario y como mínimo una administración simultánea consecutiva posterior del virus y el inhibidor de puesto de control al sujeto se sigue por la administración de como mínimo una dosis del inhibidor de puesto de control por separado al paciente. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende un intervalo de 1-3 semanas entre la administración simultánea consecutiva de los agentes, preferiblemente comprende un intervalo de aproximadamente una semana, aproximadamente dos semanas o aproximadamente 3 semanas.

[0019] La presente solicitud demuestra que la administración intratumoral del virus vaccinia oncolítico replicativo (i) atrae células inmunes huéspedes (por ejemplo, células T que se infiltran en tumores) al tumor e (ii) induce la expresión de varias proteínas de puesto de control, que incluyen PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT, en células tumorales, sensibilizando de ese modo las células tumorales para el tratamiento concurrente con inhibidores de la(s) proteína(s) de puesto de control.

[0020] Por consiguiente, en algunos aspectos, el nivel de expresión de una o más de estas proteínas de puesto de control se utiliza como un biomarcador en la selección de pacientes humanos con cáncer para el tratamiento con la

terapia de combinación descrita en el presente documento basada en su(s) nivel(es) de expresión. En algunas realizaciones, se puede medir la expresión utilizando cualquier ensayo de medición de niveles de proteínas. En algunas realizaciones, se puede medir la expresión de proteínas utilizando un ensayo tal como un ensayo FACS o Nanostring.

[0021] En realizaciones relacionadas, el humano que necesita el tratamiento es un humano con un tumor que no expresa una proteína de puesto de control (por ejemplo, un sujeto resistente al inhibidor de puesto de control) o expresa una proteína de puesto de control a un nivel relativamente bajo en cuyo caso el componente del virus vaccinia oncolítico de la terapia de combinación se administra en una cantidad eficaz para sensibilizar el tumor al inhibidor de puesto de control inmunitario de la combinación induciendo la expresión de la proteína de puesto de control (por ejemplo, PD-L1). En algunas realizaciones, el humano puede tener un tumor que no expresa PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y/o TIGIT o expresa una o más de estas proteínas de puesto de control a un nivel relativamente bajo y el virus vaccinia oncolítico se administra en una cantidad eficaz para sensibilizar el tumor para un inhibidor de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y/o TIGIT. En otras realizaciones relacionadas, el nivel de una proteína de puesto de control se mide en un tumor antes de la administración de la terapia de combinación de virus vaccinia oncolítico e inhibidor de puesto de control y la terapia de combinación se administra a un sujeto, si se determina que la proteína de puesto de control no se expresa o se expresa a un nivel relativamente bajo en el tumor.

[0022] En algunos aspectos, un tumor no expresa una proteína de puesto de control o expresa una proteína de puesto de control a un nivel relativamente bajo que es inferior al 50%, inferior al 25%, inferior al 15%, inferior al 10%, inferior al 5%, inferior al 1% o inferior al 0,5% de cepas de células tumorales positivas para la proteína de puesto de control tal como se evalúa mediante inmunohistoquímica (IHC) de una muestra de tumor. Véase, por ejemplo, Ilie et al., *Virchows Arch*, 468(5):511-525 (2016). En algunos aspectos, el humano padece cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, cáncer pancreático o cáncer colorrectal.

[0023] En otras realizaciones relacionadas adicionales, el humano que necesita el tratamiento es un humano con un tumor que está «frío» inmunológicamente, por lo que se entiende que el tumor está esencialmente o relativamente libre de células inmunes en el microambiente tumoral. El tratamiento con un virus vaccinia oncolítico atrae las células inmunes (por ejemplo, células T) al tumor y crea sinergia con inhibidores de puesto de control administrados de manera simultánea para tratar el tumor. Se puede identificar un tumor «frío» mediante los procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica (IHC) de cepa única o múltiple para marcadores inmunes tales como CD3 y CD8 en el centro del tumor y el margen invasivo, citometría de flujo para el análisis de fenotipo, genómico del tejido tumoral, determinación del perfil de ARN de tejido tumoral y/o determinación del perfil de citocina en suero.

[0024] El virus vaccinia oncolítico y el inhibidor de puesto de control inmunitario de la combinación se administran de manera concurrente (por ejemplo, simultáneamente) y se pueden administrar como parte de la misma formulación o en formulaciones diferentes. Por administración simultánea (o concurrente) se entiende que una primera dosis de cada uno de los miembros de combinación se administra durante o aproximadamente el mismo tiempo (dentro de un periodo de 24 horas entre cada uno, preferiblemente en un periodo de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 horas o en un periodo de 1 hora entre sí) y preferiblemente como mínimo una dosis posterior de cada uno de miembros de combinación se administra a o aproximadamente el mismo tiempo. Por consiguiente, en un aspecto, la terapia de combinación tal como se describe en el presente documento comprende una primera dosis del virus vaccinia oncolítico replicativo administrado de manera simultánea con una primera dosis del inhibidor de puesto de control (por ejemplo, tratamiento de un sujeto con la terapia de combinación implica como mínimo una primera administración en donde el virus vaccinia oncolítico y el inhibidor de puesto de control se administran de manera simultánea al sujeto) y preferiblemente comprende adicionalmente como mínimo una, dos, tres, cuatro o más administraciones simultáneas consecutivas adicionales del virus vaccinia oncolítico y el inhibidor de puesto de control. Por consiguiente, un régimen de tratamiento concurrente con la combinación farmacéutica puede comprender como mínimo dos, como mínimo tres, como mínimo cuatro, como mínimo cinco, como mínimo seis, como mínimo siete o más dosis consecutivas de los agentes administradas simultáneamente. En realizaciones preferidas, el intervalo entre las dosis consecutivas administradas simultáneamente del virus vaccinia oncolítico y el inhibidor de puesto de control oscila entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 3 semanas o cualquier intervalo entre medio tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días o 21 días. En algunas realizaciones preferidas, el intervalo entre las dosis consecutivas administradas simultáneamente del virus vaccinia oncolítico y el inhibidor de puesto de control es aproximadamente 1 semana o aproximadamente 2 semanas. Después del como mínimo una dosis inicial administrada simultáneamente del virus oncolítico y el inhibidor de puesto de control inmunitario, se pueden administrar una o más dosis del inhibidor de puesto de control por separado al sujeto.

[0025] Tal como se indica anteriormente, se da a conocer una terapia de combinación para el uso de acuerdo con la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra mediante la administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra mediante la administración intraarterial. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra mediante la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra solamente mediante la administración intratumoral. En

algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intravenosa y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraperitoneal y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraarterial y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra en una cantidad eficaz para inducir la expresión de una proteína de puesto de control inmunitario en el tumor. En algunas realizaciones del método de tratamiento, la proteína de puesto de control inmunitario se selecciona entre PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT.

[0026] En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intravenosa. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control inmunitario se selecciona entre PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es CTLA-4. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es LAG3. En algunas realizaciones la proteína de puesto de control es TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es PD-1. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es TIM3. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el tumor es un carcinoma de células renales.

[0027] En algunas realizaciones, el inhibidor de la proteína de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a PD-1 o PD-L1. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a PD-1 o PD-L1 se selecciona entre el grupo que consiste en BMS-936559, atezolizumab, durvalumab, avelumab, nivolumab, pembrolizumab y lambrolizumab.

[0028] En algunas realizaciones, el inhibidor de la proteína de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a CTLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a CTLA-4 se selecciona entre el grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab.

[0029] En algunas realizaciones, el tumor no expresa la proteína de puesto de control inmunitario o expresa la proteína de puesto de control inmunitario a un nivel relativamente bajo antes de la administración del virus vaccinia oncolítico replicativo.

[0030] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende una etapa de medición del nivel de expresión de la proteína de puesto de control inmunitario en el tumor antes de la administración de la combinación.

[0031] En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende un virus vaccinia oncolítico replicativo tal como se reivindica, (b) un inhibidor de PD-1 y/o PD-L1 y (c) un inhibidor de la proteína de puesto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra en una cantidad eficaz para inducir la expresión de una proteína de puesto de control inmunitario. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra mediante la administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra mediante la administración intraarterial. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra mediante la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra solamente mediante la administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intravenosa y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraperitoneal y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraarterial y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende

(a) un virus vaccinia oncolítico replicativo tal como se reivindica en una cantidad eficaz para inducir la expresión de una proteína de puesto de control inmunitario en el tumor, (b) un inhibidor de PD-1 y/o PD-L1 y (c) un inhibidor de la proteína de puesto de control inmunitario, en donde el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control inmunitario se selecciona entre CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT.

En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es CTLA-4. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es LAG3. En algunas realizaciones la proteína de puesto de control es TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína de puesto de control es TIM3. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el tumor es un carcinoma de células renales.

[0032] En algunas realizaciones que comprenden dicho tratamiento de combinación triple, el inhibidor de la proteína de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a PD-1 o PD-L1. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a PD-1 o PD-L1 se selecciona entre el grupo que consiste en BMS-936559, atezolizumab, durvalumab, avelumab, nivolumab, pembrolizumab y

lambrolizumab.

[0033] En algunas realizaciones que comprenden el tratamiento de combinación triple, el inhibidor de la proteína de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a CTLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal que se une de manera selectiva a CTLA-4 se selecciona entre el grupo que consiste en ipilimumab y tremelimumab.

[0034] En algunas realizaciones que comprenden dicho tratamiento de combinación triple, el tumor no expresa la proteína de puesto de control inmunitario o expresa la proteína de puesto de control inmunitario a un nivel relativamente bajo antes de la administración del virus vaccinia oncolítico replicativo.

[0035] En algunas realizaciones que comprenden dicho tratamiento de combinación triple, el procedimiento comprende una etapa de medición del nivel de expresión de la proteína de puesto de control en el tumor antes de la administración de la combinación.

[0036] Otras realizaciones de la invención se tratan a lo largo de esta solicitud. Cualquier realización tratada en lo que respecta a un aspecto de la invención se aplica a otros aspectos de la invención también y viceversa. Las realizaciones en el apartado de los Ejemplos se entienden como realizaciones de la invención que se aplican a todos los aspectos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0037] Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para probar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. Se puede entender mejor la invención mediante referencia una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Figura 1A-1C Figura 1A: Gráfico representa un régimen de tratamiento de combinación concurrente con inyección intratumoral (IT) de mJX-594 y anticuerpo inhibidor de puesto de control de anti-PD-1 administrado por la vía intraperitoneal. Los ratones BALB/c competentes inmunológicamente de 8 semanas de edad fueron inyectados con 5×10^5 de células Renca (cáncer de riñón). Cuando el tamaño del tumor alcanza $\geq 50 \text{ mm}^3$, los ratones se trataron (Día 0) con PBS (control, días 0, 3, 6 y 9), solamente anticuerpo anti-PD-1 (Días 0, 3, 6 y 9), solamente mJX-594 (Días 0, 2 y 4) o anti-PD-1 y mJX-594 administrados simultáneamente (administración simultánea de los agentes en los días 0, 2 y 4 seguido de la administración de solamente anti-PD-1 el día 6 y mJX-594 se administró por la vía intratumoral (IT) a una concentración de 1×10^7 ufp y anti-PD-1 a una concentración de 10 mg/kg por la vía intraperitoneal (IP). Figura 1B: Los ratones BALB/c hembras de ocho semanas de edad fueron inyectados con células RENCA (2×10^6 de células) en 100 μl de PBS en la subcápsula del riñón izquierdo. El día 10 después de la implantación los ratones que albergaban tumores Renca (50 mm^3 - 100 mm^3 tal como se observa con el sistema de imágenes in vivo IVIS® Spectrum) se trataron por la vía intraperitoneal (i.p) con (i) PBS (control) (ii) monoterapia de virus vaccinia (JX-929) (6×10^7 UFP durante los días 10, 11 y 12 después de la implantación para un total de 3 dosis) (iii) monoterapia de anti-PD1 (BioXcell, Libano Occidental, NH, 100 μl) (días 10, 11 y 12 después de la implantación para un total de 3 dosis) o (iv) tratamiento simultáneo con JX929 + anti-PD1 (cada uno se administró los días 10, 11 y 12 después de la implantación, con JX-929 administrado por la mañana e ICI por la tarde del mismo día con un intervalo de 9 horas) de acuerdo con el régimen indicado. Figura 1C: A los ratones Balb/c que tenían tumores Renca que superaban 50 mm^3 se les administraron cuatro dosis intratumorales de mJX594 (1×10^7 durante cada uno de los días 0, 3, 6 y 9) o control de PBS de acuerdo con el régimen de tratamiento indicado.

Figuras 2A-2B Figura 2A: El gráfico representa los efectos de los regímenes de tratamiento descritos en la Figura 1A sobre volumen de tumor. El tratamiento de combinación concurrente (PD1+mJX594) suprimió de manera importante el crecimiento tumoral (después de 18 días después de la implantación) en comparación con otros grupos de tratamiento. Figura 2B: la foto y el gráfico representan el peso del tumor en cada grupo de tratamiento descrito en la Figura 1A. El tratamiento de combinación concurrente (PD1+mJX594) creo sinergias para reducir considerablemente el volumen de tumor en relación con cualquier monoterapia.

Figuras 3A-3B. El tratamiento de combinación concurrente con mJX-594 y anti-PD-1 administrados por la vía IT aumentó considerablemente la infiltración de células T intratumoral en comparación con el tratamiento de control y único con cualquier agente. Los ratones se trataron de acuerdo con los regímenes de administración descritos en la Figura 1. Figura 3A: Las imágenes que muestran aumento marcado en infiltración de células T CD8 en las dos regiones peritumoral e intratumoral en el grupo de tratamiento de combinación concurrente en comparación con los grupos de control y de monoterapia. Figura 3B: Gráficos que muestran aumento marcado en infiltración de células T CD8 peritumoral e intratumoral en el grupo de combinación concurrente en comparación con el control y cualquier monoterapia.

Figuras 4A-4B. Tratamiento de combinación concurrente con mJX-594 y anti-PD-1 por la vía IT aumenta la expresión de PD-L1 intratumoral. Los ratones se trataron de acuerdo con los regímenes de administración descritos en la Figura 1. Figura 4A: Imágenes que muestran un aumento marcado en el nivel de expresión de PD-L1 en ambas regiones

tumorales periférica y central en el grupo de tratamiento de combinación concurrente en comparación con el control y cualquier monoterapia (tinción de PD-L1). Figura 4B: Imágenes que muestran un aumento marcado en la apoptosis intratumoral en el grupo de tratamiento de combinación concurrente en comparación con el control y cualquier grupo de monoterapia.

Figuras 5A-5B. Células T CD8 y células supresoras derivadas de mieloides CD11b+Gr1+ (MDSCs) aumentan en el grupo de terapia de combinación concurrente en comparación con el control. Figura 5A: gráficos de citometría de flujo que muestran positividad para CD8 y Gr-1 en tumores para cada grupo de tratamiento, con un aumento importante de células T CD8+ demostrado en tumores del grupo de combinación concurrente en comparación con cualquier monoterapia. Un aumento en MDSCs también demuestra tener relación con cualquier monoterapia. Figura 5B: Gráficos de barras que muestran los resultados de citometría de flujo.

Figura 6. Gráfico que representa el régimen de tratamiento de combinación con inyección IT de anticuerpo inhibidor de puesto de control de mJX-594 y anti-PD1 (+/- anti-CTLA4) administrado por la vía intraperitoneal. Se inyectaron 5×10^5 de células Renca por la vía subcutánea en el lomo derecho de ratones BALB/c de 8 semanas de edad. El tratamiento se inició (Día 0) cuando el tamaño del tumor alcanzó 50-100 mm³. El día 0, los ratones (que tenían tumores Renca) se trataron con PBS (control), combinación de mJX-594+anti-PD1 administrada de manera secuencial, combinación de mJX-594+anti-PD-1 administrada simultáneamente y la triple combinación de mJX-594+anti-PD-1+anti-CTLA4 administrada simultáneamente. mJX-594 se administró a una concentración de 1×10^7 ufp por la vía IT, anti-PD1 a una concentración de 10 mg/kg por la vía IP y anti-CTLA4 a una concentración de 4 mg/kg por la vía IP.

Figura 7. El gráfico representa los efectos de los regímenes de tratamiento descritos en la Figura 6 sobre volumen de tumor. El tratamiento de combinación concurrente con α PD1+mJX594 y α PD1+mJX594+ α CTLA4 suprimió de manera importante el crecimiento tumoral desde el día 6 (después del tratamiento) en comparación con otros grupos de tratamiento y ambos grupos de tratamiento de combinación concurrente retrasaron de manera significativa el crecimiento tumoral en comparación con control y el grupo de tratamiento de combinación secuencial (mJX594→ α PD1), en el que la regresión del tumor se observó desde el día 12.

Figura 8. Gráfico que representa el régimen de tratamiento de combinación con inyección IT de anticuerpo inhibidor de puesto de control de mJX-594 y anti-PD1 administrado por la vía intraperitoneal. Se inyectaron 5×10^5 de células Renca por la vía subcutánea en el lomo derecho de ratones BALB/c de 8 semanas de edad. El tratamiento se inició (Día 0) cuando el tamaño del tumor alcanzó 50-100 mm³. El día 0, los ratones (que tenían tumores de Renca) se trataron con PBS (control), solamente anti-CTLA4, solamente mJX-594, combinación de mJX-594+CTLA4 administrada de manera secuencial y combinación de mJX-594+CTLA4 administrada simultáneamente. mJX-594 se administró a una concentración de 1×10^7 ufp por la vía IT y anti-CTLA4 a una concentración de 4 mg/kg.

Figura 9. El gráfico representa los efectos de los regímenes de tratamiento descritos en la Figura 8 sobre volumen de tumor. El tratamiento de combinación concurrente con mJX594+ α CTLA4 retrasó considerablemente el crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento de combinación secuencial con mJX594+ α CTLA4 y cualquier monoterapia.

Figuras 10A-10B. Combinación concurrente de mJX594 y anti-CTLA4 administrados por la vía IT aumenta notablemente la infiltración tumoral de células T CD8+ y reduce el nivel de MDSC en comparación con la combinación secuencial y cualquier monoterapia. Figura 10A: gráficos de citometría de flujo que muestran positividad para CD8 y Gr-1 en tumores para cada grupo de tratamiento, con un aumento importante de células T CD8+ y una disminución en MDSCs demostrados en tumores del grupo de combinación concurrente en comparación con el grupo de tratamiento secuencial y cualquier monoterapia. Figura 10B: Gráficos de barras que muestran los resultados de citometría de flujo.

Figura 11. Gráfico que representa el régimen de tratamiento de combinación con inyección intravenosa (IV) de anticuerpo inhibidor de puesto de control de mJX-594 y anti-PD1 administrado por la vía intraperitoneal. Se inyectaron 5×10^5 de células Renca por la vía subcutánea en el lomo derecho de ratones BALB/c de 8 semanas de edad. El tratamiento se inició (Día 0) cuando el tamaño del tumor alcanzó 50-100 mm³. El día 0, los ratones (que tienen tumores de Renca) se trataron con PBS (control), solamente anti-PD1, solamente mJX-594 o mJX-594+anti-PD1 administrados simultáneamente. mJX-594 se administró a una concentración de 2×10^7 ufp por la vía IV, anti-PD1 a una concentración de 10 mg/kg por la vía IP.

Figura 12. El gráfico que representa los efectos de los regímenes de tratamiento descritos en la Figura 11 sobre volumen de tumor. El tratamiento de combinación concurrente con mJX594 IV+ α PD1 fue deficiente en comparación con el tratamiento con solamente mJX594 y no mejor que el tratamiento con solamente α PD1.

Figura 13. Un gráfico que muestra los cambios de pliegues (que tienen relación con niveles de pretratamiento) de proteínas de puesto de control inmunitario en ratones que tienen tumores de Renca tratados por la vía intratumoral con cuatro dosis de 1×10^7 ufp de mJX594mJX594 (virus vaccinia de Wyeth modificado para contener una alteración del gen timidina cinasa viral y la inserción de GM-CSF murino) administradas cada tres días.

Figura 14. Da a conocer los datos acerca del número de inyecciones de mJX594 y la inhibición de crecimiento tumoral. Para encontrar la inmunoterapia óptima con mJX594, se sometieron a prueba diferentes números de dosis en cáncer

de riñón de Renca. El crecimiento tumoral se disminuyó dependiendo del número de dosis de mJX594.

50

Figura 15. Imágenes que muestran la concentración intratumoral de células T CD8+ después del tratamiento con mJX594.

Figura 16. Imágenes que muestran la concentración intratumoral de células T CD8+ después del tratamiento con mJX594. En tumores tratados con mJX594, se observaron los agregados de células linfáticas CD8+, que son similares a folículos linfáticos.

Figura 17. Datos que muestran que mJX594 aumenta el número y la función efectora de células T CD8+ intratumorales. La proporción de células T CD8+ con las células T reguladoras aumentó después del tratamiento con mJX594. La expresión de ICOS y granzima B en células T CD8+ aumentó después del tratamiento con mJX594. Aunque el número de células T reguladoras CD4+Foxp3+CD25+ así como células T CD8+ y CD4+ T aumentó simultáneamente en el compartimento de célula linfática, la proporción de células T efectoras CD8+ y células T reguladoras aumentó más en comparación con el control. Por otra parte, la expresión de ICOS y granzima B (GzB), que son marcadores coestimuladores y de activación para las células T, aumentó en células T CD8+.

Figura 18. Datos que muestran que el tratamiento con mJX594 generó repolarización de células mieloides (Ly6G-Ly6C+ $\uparrow$, Ly6G+Ly6Cint $\downarrow$). mJX594 aumenta células monocíticas CD11b+Ly6G-Ly6C+ y reduce células mieloides de granulocitos CD11b+Ly6G+Ly6Cint. En el análisis de subconjunto del compartimento de células mieloides, se descubrieron los aumentos de células mieloides monocíticas CD11b+Ly6G-Ly6C+ y la reducción de células mieloides de granulocitos con CD11b+Ly6G+Ly6Cint, indicando el aumento importante de la proporción de monocitos en relación con granulocitos mediante la administración de mJX594.

Figura 19. Datos que muestran un esquema para el tratamiento con experimento de reducción de anticuerpos. Para determinar qué componentes del sistema inmune eran responsables de la eficacia terapéutica después del tratamiento con mJX594, se analizó el efecto de reducción para células T CD8+, células T CD4+ y GM-CSF en crecimiento tumoral e inmunidad anticáncer.

Figura 20. Datos que muestran que la reducción de células T o GM-CSF anula de manera importante el efecto anticáncer de mJX594. Los dos tipos de células T CD8+ y CD4+ son mediadores imprescindibles para el efecto anticáncer del tratamiento con mJX594 y GM-CSF podría generar también beneficio inmunoterapéutico. Aunque se detectó la inhibición tumoral eficiente con monoterapia con mJX594, la reducción de cualquiera de los dos tipos de células T CD8+ o CD4+ generó supresión del efecto terapéutico.

Figura 21. Datos que muestran que la reducción de células T CD4+ o GM-CSF disminuyó la infiltración de células T CD8+ intratumorales después de mJX594. La reducción de células T CD4+ T aumentó las células T CD8+ intratumorales, sugiriendo que las células T CD4+ estaban implicadas en la activación de las células T CD8+. La reducción de GM-CSF redujo ambas células T CD8+ y CD4+. La reducción de células T CD4+ T con la inyección de mJX594 disminuyó las células T CD8+ intratumorales, sugiriendo que las células T CD4+ estaban implicadas en la activación de las células T CD8+. En cambio, la reducción de las células T CD8+ no indujo cambios significativos en las células T CD4+ indicando que las células T CD8+ no afectaban a las células T CD4+. Estos datos mostraron que el tratamiento con mJX594 indujo la imprimación de células T CD8+ y CD4+ que son indicadores de inmunidad anticáncer. La infiltración de las células T CD8+ y CD4+ es un indicador de un efecto anticáncer.

Figura 22. Un esquema del experimento de terapia de triple combinación de mJX594, α PD-1 y α CTLA-4. mJX594.

Figura 23. Datos muestran que la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α CTLA-4 retrasó de manera significativa el crecimiento del tumor. En particular, la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α CTLA-4, provoca la regresión completa de tumor de Renca en algunos ratones (37,5%). Mientras que la combinación dual de α PD-1 y α CTLA-4 retrasa el crecimiento tumoral en 14,5% y la monoterapia con mJX594 inhibió el crecimiento tumoral en 36,9% en comparación con el control, la triple combinación mostró una inhibición del crecimiento tumoral del 76,5%. En particular, la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α CTLA-4, causó regresión tumoral completa (tasa de respuesta completa: 37,5%), lo cual no se observó en tumores tratados con ninguno de la combinación dual o monoterapia con mJX594.

Figura 24. Datos muestran que la inmunoterapia con triple combinación de mJX594, PD-1 y CTLA-4 prolonga la supervivencia general. Los ratones tratados con la terapia de triple combinación mostraron efectos del tratamiento anticáncer extraordinarios. Es más, para confirmar si estos efectos anticáncer potentes inducidos por la terapia de triple combinación podrían traducirse en beneficio de supervivencia a largo plazo, se llevó a cabo un análisis de supervivencia en ratones que albergaban el tumor. Los ratones tratados con la terapia de triple combinación mostraron beneficio de supervivencia en comparación con la monoterapia o la inmunoterapia de doble combinación.

Figura 25. Un esquema del experimento de terapia de triple combinación de mJX594, α PD-1 y α LAG3.

Figura 26. Datos muestran que la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α LAG3 retrasó relativamente el crecimiento del tumor. En este experimento, la triple combinación no mostró una diferencia importante estadísticamente en comparación con la combinación dual de mJX594 y α PD-1. Mientras que la combinación dual de mJX594 y α PD-1 retrasó el crecimiento tumoral en 41,9% y la monoterapia con α LAG3 inhibió el crecimiento tumoral en 5,7% en comparación con el control. La triple combinación mostró una inhibición del crecimiento tumoral del 30,1%.

Figura 27. Datos muestran que la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α LAG3 aumentó las células T CD8+ y CD4+. El análisis de subconjunto del compartimento de células linfáticas reveló un aumento en el número absoluto de células T CD8+ y CD4+ intratumorales con tratamientos de combinaciones dual y triple.

Figura 28. Un esquema del experimento de la terapia de triple combinación de mJX594, α PD-1 y α TIGIT.

Figura 29. Datos muestran que la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α TIGIT retrasó relativamente el crecimiento del tumor. La triple combinación no mostró diferencia importante en comparación con la combinación dual de mJX594 y α PD-1 en tumor de Renca.

Figura 30. Datos muestran que la triple combinación de mJX594, α PD-1 y α TIGIT aumentó las células T CD8+ y CD4+. El análisis de subconjunto del compartimento de células linfáticas reveló un aumento en el número absoluto de células T CD8+ y CD4+ intratumorales con tratamientos de combinaciones dual y triple.

Figura 31. Datos que muestran que mJX594 crea sinergias con el tratamiento con anti-PD1 para retrasar el crecimiento tumoral. Para superar la resistencia a la monoterapia con ICI se evaluó la combinación de mJX594 y el bloqueo de puesto de control inmunitario en el modelo de cáncer de colon CT26. En este modelo, la monoterapia con α PD-1 mostró poco efecto sobre el crecimiento tumoral con monoterapia de mJX594 inhibiendo de manera moderada el crecimiento tumoral. Sin embargo, la combinación de terapia dual de anticuerpos mJX594 y α PD-1 dificultó considerablemente el crecimiento tumoral.

Figura 32. Datos que muestran que la combinación de mJX594 con el tratamiento con anti-PD1 aumentó las células T CD8+ intratumorales. Junto con la inhibición de crecimiento tumoral, el análisis microscópico mostró concentración considerable de células T CD8+ en ambas regiones periférica y central de tumores tratados con terapia de combinación.

Figura 33A-33G. mJX594 (JX) provoca cambios dinámicos de genes relacionados el sistema inmunitario en TME inmunosupresor. Se implantaron los tumores de Renca por la vía s.c. a ratones BALB/c y se trataron con una única inyección por la vía i.t. de 1×10^7 upf de mJX-594 cuando los tumores alcanzaron $> 50 \text{ mm}^3$. (A) Imágenes representativas de tumores de Renca tratados con JX. Tumores marcados con virus vaccinia (VV), CD31, CD8, CD11c y PD-L1. (B) Cuantificaciones de expresiones de virus vaccinia⁺, vasos sanguíneos CD31⁺, células T citotóxicas CD8⁺, células dendríticas CD11c⁺ y células PD-L1⁺. (C) Cambios temporales de VV, CD8 y PD-L1 en el microambiente tumoral después del tratamiento con JX. (D) Imágenes que muestran la expresión PD-L1 aumenta (rojo) en diferentes tipos de células (verde) en el TME después del tratamiento con JX. Cabe señalar que la expresión de PD-L1 se observó principalmente en células tumorales Pan-CK⁺ (puntas de flechas), pero algunas células mieloides CD11b⁺ (puntas de flechas) también expresaron ocasionalmente PD-L1, mientras que las células T CD3⁺ no lo hicieron. (E) Mapa de calor de expresión genética relacionada con el sistema inmunitario NanoString. Los colores rojo y verde representan los aumentos y disminuciones, respectivamente. (F) Diagrama de volcán que muestra las expresiones genéticas en tumores tratados con JX. Se indican los genes que tienen relación con la estimulación inmunitaria. Línea roja indica $p < 0,05$. (G) Comparación de expresión genética que tiene relación con los puestos de control inmunitarios inhibidores (ICs), ICs agonísticos, respuesta de Th1, respuesta de Th2, TME y célula mieloides. A menos que se indique lo contrario, $n = 5$ para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus control. Barras de escala, 50 μm . Algunos datos también se muestran en la Figura 13.

Figura 34A-34M JX suprime el crecimiento tumoral mediante la aumentada infiltración de células T y la modulación de células mieloides. Los ratones que tenía tumor de Renca se trataron por la vía i.t. con PBS o 1×10^7 upf de JX desde 1 hasta 3 veces. (A-B) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX. La media (A) y la curva del crecimiento tumoral individual (B) a lo largo del tiempo. (C-D) Imágenes representativas (C) y comparaciones (D) de célula T CD8⁺ en regiones peritumoral o intratumoral de tumores tratados con desde 1 hasta 3 veces de JX. (E) Diagrama citometría de flujo representativo que muestra las fracciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ T en tumores. (F) Números absolutos de células T CD8⁺ y CD4⁺ por gramo de tumor calculados a partir de la citometría de flujo. (G) Comparación de fracciones de CD45⁺, CD8⁺ y CD4⁺ en tumores tratados con la triple administración de JX. (H-J) Comparaciones de fracciones de CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ (Treg), proporción de CD8/Treg, CD8⁺ICOS⁺ y CD8⁺GzB⁺ en el tumor. (K) Comparación de fracciones de células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en el tumor. (L) Diagrama de citometría de flujo que muestra las fracciones de células mieloides CD11b⁺ en el tumor. (M) Comparación de fracciones de células mieloides monocíticas Ly6G-Ly6C⁺, células mieloides de granulocitos Ly6G⁺Ly6C^{int} y proporción de monocitos/granulocitos en CD11b⁺ en el tumor. A menos que se indique lo contrario, $n = 5\sim 6$ para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ versus control; # $p < 0,05$ versus JX x1; \$ $p < 0,05$ versus JX x2. ns, no significativo. Barras de escala, 100 μm . Algunos datos también se muestran en las Figuras 19-21.

Figura 35A-35E Inyecciones intratumorales de JX inducen infiltración de linfocitos CD8⁺ en ambos tumores local y alejado. Los ratones se inyectaron por la vía s.c. con Renca en el lomo derecho y con tumor de Renca o CT26 en el lomo izquierdo. Las flechas indicaron el tratamiento con JX por la vía i.t. (A) Diagrama esquemático de implantación tumoral y tratamiento y curvas de crecimiento de tumor Renca inyectado con JX y tumor de Renca no inyectado. (B-C) Imágenes representativas (B) y de comparaciones (C) de células T CD8⁺ (verde) en los tumores inyectados con JX y no inyectados. (D) Diagrama esquemático de implantación y tratamiento y curva de crecimiento de tumor de Renca inyectado con JX y tumor CT26 no inyectado. (E-F) Imágenes representativas (E) y de comparaciones (F) de células T CD8⁺ (verde) en los tumores inyectados con JX y alejados. A menos que se indique lo contrario, n = 5 para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control. ns, no significativo. Barras de escala, 50 μ m.

Figura 36A-36D La inmunidad antitumoral juega un papel importante en la eficacia terapéutica general de JX. Los ratones se implantaron con Renca por la vía s.c. y se trataron con JX por la vía i.t. o con anticuerpos reductores por la vía i.p. para las células T CD8⁺, CD4⁺ o GM-CSF de ratón. (A) Esquema del tratamiento. (B-C) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX o anticuerpos reductores. La media (B) y la curva del crecimiento tumoral individual (C) a lo largo del tiempo. *p < 0,05 versus control; $\S$ p < 0,05 versus α GM-CSF. (D-E) Números absolutos de células T CD8⁺ (D) y CD4⁺ (E) por gramo de tumores tratados con JX y anticuerpos reductores de células inmunitarias. A menos que se indique lo contrario, n = 7-8 para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control; $\#$ p < 0,05 versus VX; $\S$ p < 0,05 versus α GM-CSF. ns, no significativo.

Figura 37A-37E Terapia de combinación de JX y α PD-1 que suscita de manera sinérgica la inmunidad tumoral mediada por las células T CD8⁺. Los ratones que albergaban los tumores de Renca se trataron con cualquiera de PBS, JX, anticuerpo α PD-1 o JX plus anticuerpo α PD-1. (A-B) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX y/o anticuerpo α PD-1. La media (A) y la curva del crecimiento tumoral individual (B) a lo largo del tiempo. (C-D) Imágenes representativas (C) y comparaciones (D) de células T CD8⁺, vasos sanguíneos CD31⁺, células apoptóticas de caspasa3 activadas (Casp3)⁺ y células PD-L1⁺ en tumor tratado con JX y/o anticuerpo α PD-1. (E) Diagrama que representa la superación de TME inmunocompresivo mediante terapia de combinación de JX y bloqueo de α PD-1. A menos que se indique lo contrario, n = 7 para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control; $\#$ p < 0,05 versus JX; $\S$ p < 0,05 versus α PD-1. ns, no significativo. Barras de escala, 100 μ m. Algunos datos también se muestran en las Figuras 19-21.

Figura 38A-38F La eficacia de inmunoterapia de combinación con JX y ICIs sistémicos en gran parte no está afectada por el plan de tratamiento. Los ratones se implantaron por la vía s.c. con tumor de Renca y se trataron con JX plus ICIs según diferentes planes. (A) Diagrama que representa varios planes de tratamiento. Las flechas indican el tratamiento con cualquiera de los dos JX administrado por la vía i.t. (flechas rojas) o administración sistémica del bloque de puesto de control inmunitario (flechas azules). (B-C) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX y anticuerpo α PD-1 utilizando planes temporales diferentes. La media (B) y la curva del crecimiento tumoral individual (C) a lo largo del tiempo. (D) Diagrama de citometría de flujo representativo que muestra las fracciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ infiltradas en tumores. (E-F) Comparaciones de números absolutos de células CD8⁺, CD4⁺, CD8⁺ICOS⁺ y CD8⁺GzB⁺ por gramo de tumores. A menos que se indique lo contrario, n = 7 para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control. ns, no significativo.

Figura 39A-39E La triple combinación de anticuerpos JX, α PD-1 y α CTLA-4 lleva a regresión completa y supervivencia general mejorada. Los ratones se implantaron con tumores de Renca por la vía s.c. y se trataron con JX en presencia o ausencia del bloqueo de puesto de control inmunitario para PD-1 y CTLA-4. (A-B) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX y/o bloqueos de puestos de control inmunes. La media (A) y la curva del crecimiento tumoral individual (B) a lo largo del tiempo. (C) Diagrama en cascada que muestra los cambios de porcentajes máximos desde la base de referencia en tamaño de tumor. (D) Diagrama de Kaplan-Meier de supervivencia general. (E) Comparación de tamaño de tumor después de un nuevo desafío de células tumorales Renca en ratones con regresión tumoral completa. A menos que se indique lo contrario, n = 8 para cada grupo. *p < 0,05 versus control; $\#$ p < 0,05 versus JX; $\S$ p < 0,05 versus α PD-1+ α CTLA-4. ns, no significativo. Algunos datos se muestran en las Figuras 23 y 24.

Figura 40A-40L. La terapia de combinación triple retrasa el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo de cáncer de pecho espontáneo. El crecimiento tumoral se analizó cada semana en tumores mamarios espontáneos de ratones *MMTV-PyMT* empezando desde las 9 semanas después de nacimiento. Las muestras se recogieron a las 13 semanas después del nacimiento. (A) Diagrama que representa plan de tratamiento. Las flechas indican el tratamiento mediante cualquiera de las dos administración i.t. de JX o administración sistémica de anticuerpos α PD-1 y α CTLA-4. (B) Imagen representativa que muestra aparición total de tumores. Los círculos con líneas de puntos delimitan nódulos tumorales mamarios palpables. (C) Comparación de la carga tumoral total. La carga tumoral se calculó mediante la suma del volumen de cada nódulo tumoral por ratón. (D) Comparación del número de nódulos tumorales palpables. (E) Comparación del volumen de cada nódulo tumoral. Cada nódulo tumoral en ratones *MMTV-PyMT* se marcó como un punto individual. (F) Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia general. (G) Secciones tumorales con H&E que muestran regiones intratumorales. Las estructuras acinares de grupos JX y JX+P+C son lesiones tempranas, menos invasivas (Ea) que muestran el límite marcado con el tejido adiposo mamario adyacente (Adi). Mientras que las regiones de carcinoma ductal invasivo (Ca) de Cont y P+C han invadido masivamente el tejido adyacente y han formado hojas sólidas de células tumorales sin estructura acinar residual. Barras de escala, 200 μ m. (H-J) Imágenes representativas y comparaciones de células T CD8⁺ (H e I) y vasos sanguíneos tumorales CD31⁺ (H y J) en tumor. (K)

Secciones pulmonares de representación marcadas con H&E. Las flechas indican focos metastásicos. Barras de escala, 200 μ m. (L) Comparación del número de colonias metastásicas por sección pulmonar. A menos que se indique lo contrario, n = 6~7 para cada grupo. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control; #p < 0,05 versus JX; §p < 0,05 versus α PD-1+ α CTLA-4. ns, no significativo. Barras de escala, 100 μ m.

Figura 41. El virus vaccinia no se detecta en tumores alejados. Aunque la replicación de virus vaccinia sólido (VV) (verde) se observa en la parte derecha, tumores inyectados, el virus vaccinia no se detecta en la parte izquierda, tumores no inyectados. Barras de escala, 100 μ m.

Figura 42A-42H. Terapia de combinación de JX y α CTLA-4 suscita de manera sinérgica la inmunidad tumoral mediada por las células T CD8⁺. Los ratones que albergaban los tumores de Renca se trataron con cualquiera de PBS, JX, anticuerpo α CTLA-4 o JX plus anticuerpo α CTLA-4. (A-B) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX y/o anticuerpo α CTLA-4. La media (A) y la curva del crecimiento tumoral individual (B) a lo largo del tiempo. (C-E) Imágenes y comparaciones de células T CD8⁺ (C y D) y vasos sanguíneos CD31⁺ (C y E) en tumor. (F-H) Números absolutos de células inmunitarias CD45⁺ (F), células T CD8⁺ (G) y células CD4⁺ (H) por gramo de tumores tratados con JX y/o anticuerpo α CTLA-4. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control; #p < 0,05 versus JX; §p < 0,05 versus α CTLA-4. ns, no significativo. Barras de escala, 100 μ m.

Figura 43A-43E. JX potencia la eficacia anticáncer con respuesta inmune de α CTLA-4 independientemente de los planes de tratamiento. (A-B) Comparación del crecimiento tumoral en ratones tratados con JX y anticuerpo α CTLA-4 utilizando esquemas temporales diferentes. La media (A) y la curva del crecimiento tumoral individual (B) a lo largo del tiempo. (C) Diagrama de citometría de flujo representativo que muestra las fracciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ infiltradas en tumores en el tumor. (D- E) Números absolutos de células CD8⁺, CD4⁺, CD8⁺ICOS⁺ y CD8⁺GzB⁺ por gramo de tumores tratados con JX y anticuerpo α CTLA-4. Los valores son la media de $\pm$ SEM. *p < 0,05 versus control. ns, no significativo. Algunos datos también se muestran en la Figura 38.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES SELECCIONADAS

[0038] Los términos «que inhibe», «que reduce» o «prevención» o cualquier variación de estos términos, cuando se utilizan en las reivindicaciones y/o la especificación incluyen cualquier disminución medible o inhibición completa para alcanzar un resultado deseado.

[0039] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «combinación» significa la administración combinada de agentes anticáncer, más específicamente, el virus vaccinia oncolítico tal como se define en las reivindicaciones y el inhibidor de puesto de control, que se puede administrar en una dosis independiente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades diferenciadas de materiales de combinación. El término «combinación» también define un «kit» que comprende los materiales de combinación que se deben administrar de manera simultánea. Preferiblemente, los intervalos de tiempo entre las administraciones simultáneas consecutivas de los materiales de combinación se eligen de tal modo que la combinación de agentes muestra un efecto sinérgico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término «sinérgico» o «sinergia» significa que el efecto se lora con las combinaciones de agentes anticáncer incluidas en esta invención es superior a la suma de los efectos que son el resultado del uso de agentes anticáncer, es decir, el virus vaccinia oncolítico y el inhibidor de puesto de control inmunitario como una monoterapia. De manera ventajosa, tal sinergia proporciona mayor eficacia en algunas dosis y/o previene el desarrollo de resistencia a multifármacos.

[0040] El término «cáncer refractario», tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a cáncer que o falla en responder de manera favorable a un tratamiento antineoplásico o de manera alternativa se repite o recae después de responder favorablemente a un tratamiento antineoplásico. Por consiguiente, «un cáncer refractario para un tratamiento» tal como se utiliza en el presente documento significa un cáncer que falla en responder de manera favorable a, o es resistente al tratamiento o de manera alternativa se repite o recae después de responder favorablemente al tratamiento. Por ejemplo, dicho tratamiento anterior puede ser un régimen de quimioterapia o puede ser un régimen de inmunoterapia que comprende la administración de un anticuerpo monoclonal que se une de manera específica a PD-1, PD-L1 o CTLA4.

[0041] El uso de la palabra «un» o «una» cuando se utiliza junto con el término «que comprende» en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar «uno», pero también es consistente con el significado de «uno o más», «como mínimo uno» y «uno o más de uno».

[0042] Se contempla que cualquier reivindicación tratada en el presente documento se puede implementar en lo que se refiere a cualquier procedimiento o composición de la invención y viceversa.

[0043] A lo largo de esta solicitud, el término «aproximadamente» se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o el procedimiento que se utiliza para determinar el valor.

[0044] El uso del término «o» en las reivindicaciones se utiliza para significar «y/o» a menos que se indique explícitamente lo contrario para hacer referencia a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación apoya a una definición que se refiere a alternativas solamente e «y/o».

[0045] Tal como se utiliza en esta especificación y reivindicación(es), las palabras «que comprende» (y cualquier forma de que comprende, tal como «comprender» y «comprende»), «que tiene» (y cualquier forma de que tiene tal como «tener» y «tiene»), «que incluye» (y cualquier forma de que incluye tal como «incluye» e «incluir») o «que contiene» (y cualquier forma de que contiene tal como «contiene» y «contener») son inclusivas e indefinidas y no excluyen elementos o etapas de procedimientos adicionales, no enumerados.

[0046] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

[0047] La presente invención se define en las reivindicaciones. Se ha descubierto que la terapia de combinación con un virus vaccinia oncolítico tal como se define en las reivindicaciones y un inhibidor de puesto de control da como resultado una mejoría no esperada en el tratamiento de cáncer. Cuando los agentes se administran simultáneamente y se administra el virus vaccinia oncolítico, los agentes interactúan en conjunto e incluso de manera sinérgica para generar efectos antitumorales mejorados significativamente en lo que se refiere a la administración única de cualquier agente. De manera sorprendente, estos efectos no se observan de manera destacada, si los agentes se administran consecutivamente. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra solamente mediante la administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra solamente mediante la administración intraarterial. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos cuando el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraperitoneal y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraarterial y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica.

[0048] Adicionalmente se ha descubierto que el virus vaccinia oncolítico aumenta la expresión de proteínas de puesto de control tales como PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM3, LAG3 y TIGIT en tumores humanos sensibilizando de este modo los tumores al tratamiento con inhibidores de puesto de control y estimulando la terapia de combinación presente no solamente en pacientes que padecen tumores que expresan un inhibidor de puesto de control de la combinación, pero también en pacientes con tumores que no expresan un inhibidor de puesto de control de la combinación o expresan niveles relativamente bajos de inhibidor de puesto de control.

[0049] Se da a conocer una terapia de combinación para el uso de acuerdo con la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico capaz de replicarse se administra por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico capaz de replicarse se administra por la vía intravenosa. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico capaz de replicarse se administra solamente por la vía intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico capaz de replicarse se administra solamente por la vía intraarterial. En algunas realizaciones, la terapia de combinación genera efectos sinérgicos, cuando el virus oncolítico replicativo se administra mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraperitoneal y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraarterial y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica.

II. VIRUS VACCINIA ONCOLÍTICO

[0050] Virus vaccinia es un virus largo, complejo envuelto que tiene un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 190K bp y que codifica aproximadamente 250 genes. Vacuna (vaccinia) se conoce bien por su papel como una vacuna que eliminó la viruela. Después de la eliminación de la viruela, los científicos han ido explorando el uso de la vacuna como una herramienta de administración de genes a tejidos biológicos (terapia genética y modificación genética). El virus vaccinia es único entre los virus de ADN debido a que se replica solamente en el citoplasma de la célula huésped. Por consiguiente, se necesita un genoma largo para codificar diferentes enzimas y proteínas necesarias para la replicación de ADN viral. Durante la replicación, la vacuna produce diferentes formas de

infección que se diferencian por sus membranas exteriores: el virión maduro intracelular (IMV), el virión intracelular con envoltura (IEV), el virión con envoltura asociada a célula (CEV) y el virión extracelular con envoltura (EEV). IMV es la forma infecciosa más abundante y se cree que es la responsable de la propagación entre huéspedes. Por otra parte, se cree que el CEV juega un papel en la propagación de célula a célula y se cree que el EEV es importante para la diseminación en el organismo huésped.

[0051] Una cepa oncolítica de virus vaccinia tal como se reivindica se administra al mismo tiempo con un inhibidor de puesto de control de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. En realizaciones preferidas, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Copenhagen, Western Reserve, Lister o Wyeth, más preferiblemente una cepa Western Reserve o Wyeth. El genoma de la cepa de vacuna Western Reserve ha sido secuenciada (número de adhesión AY243312). En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Copenhagen. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Western Reserve. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Lister. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Wyeth.

[0052] El virus vaccinia oncolítico replicativo se puede modificar para que carezca de uno o más genes funcionales para aumentar la selectividad del cáncer del virus. En algunas realizaciones preferidas, el virus vaccinia oncolítico se modifica para que carezca de la actividad de timidina cinasa (TK). Un virus vaccinia deficiente de TK necesita trifosfato de timidina para la síntesis de ADN, lo que lleva a la replicación preferencial en la división de células (particularmente células cancerígenas). En otro aspecto, el virus vaccinia oncolítico se puede modificar para que carezca del factor de crecimiento de virus vaccinia (VGF). Esta proteína secretada se produce durante etapas tempranas del proceso de infección, actuando como un mitógeno para las células adyacentes principales durante la infección. En otro aspecto, el virus vaccinia oncolítico se puede modificar para que carezca de las dos actividades VFG y TK. En otros aspectos, el virus vaccinia oncolítico se puede modificar para que carezca de uno o más genes implicados en la evasión de la respuesta al interferón huésped (IFN), tales como E3L, K3L, B18R o B8R. En algunas realizaciones preferidas, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Western Reserve, Copenhagen, Lister o Wyeth y carece de un gen de TK funcional. En otras realizaciones, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Western Reserve, Copenhagen, Lister o Wyeth que carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Western Reserve, Copenhagen, Lister o Wyeth y carece de un gen de TK funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Copenhagen y carece de un gen de TK funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Lister y carece de un gen de TK funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Wyeth y carece de un gen de TK funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Western Reserve, Copenhagen, Lister o Wyeth y carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Western Reserve que carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Copenhagen que carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Lister que carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Wyeth que carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Western Reserve, Copenhagen, Lister o Wyeth y carece de un gen de TK funcional, así como carece de un gen B18R y/o B8R funcional. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo comprende genes 14L y/o F4L funcionales. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo no expresa una quimiocina (por ejemplo, el virus vaccinia no expresa CXCL-11).

[0053] En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación comprende genes 14L y/o F4L funcionales.

[0054] En otras realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación no expresa una quimiocina (por ejemplo, el virus vaccinia no expresa CX-CL-11).

[0055] Se puede colocar la secuencia heteróloga (por ejemplo, una citocina y/o un antígeno tumoral) bajo el control de un promotor de virus vaccinia e integrarla en el genoma del virus vaccinia. Alternativamente, la expresión de la secuencia heteróloga se puede conseguir mediante la transfección de un vector o plásmido portador tal como aquellos enumerados en la Tabla 1 de Técnicas actuales en biología molecular, (Ed. Ausubel, et al.) La unidad 16.17.4 (1998) contiene la secuencia controlada por el promotor de vacuna en una célula que ha sido infectada con el virus vaccinia e introduce la secuencia heteróloga mediante recombinación homóloga. Se da preferencia a los promotores del virus vaccinia tardíos fuertes, cuando se necesitan niveles altos de expresión. También se pueden utilizar promotores de etapa temprana e intermedia. En algunas realizaciones, la secuencia heteróloga se encuentra bajo el control de un promotor de virus vaccinia que contiene elementos de promotor temprano y tardío. Los promotores tempranos adecuados incluyen sin limitación un promotor del gen de virus vaccinia que codifica el polipéptido 42K, 19K o 25K. Los promotores tempranos tardíos adecuados incluyen, sin limitación, un promotor del gen de virus vaccinia que codifica el polipéptido 7,5 K. Los promotores tardíos adecuados incluyen, sin limitación, un promotor del gen de virus vaccinia que codifica el polipéptido 11K o 28K. En realizaciones relacionadas, la secuencia heteróloga se inserta en una secuencia de TK y/o VGF para desactivar la secuencia de TK y/o VGF.

[0056] En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos descritos en el presente documento se

administran por la vía intratumoral en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control. En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos descritos en el presente documento se administran por la vía intravenosa (IV; o por la vía intravascular) en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control. En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos se administran por la vía intraperitoneal (IP) en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control. En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos se administran por la vía intraarterial en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra solamente mediante la administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intravenosa y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraperitoneal y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por la vía intraarterial y el inhibidor de puesto de control se administra por la vía sistémica. La administración intratumoral implica generalmente una inyección en una masa tumoral o una vasculatura asociada a tumor. En determinados aspectos, el tumor se escanea antes de o durante una administración del virus. La administración intravascular implica generalmente una inyección en el sistema vascular y es una forma de administración sistémica. La administración intraperitoneal implica generalmente una inyección en el peritoneo (por ejemplo, cavidad corporal). En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos se administran en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control y ambos se administran de manera sistémica, por ejemplo, mediante administración IV. En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos se administran en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control, en donde el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intratumoral y uno o más inhibidores de puesto de control se administran por la vía sistémica, por ejemplo, mediante administración IV. En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos se administran en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control, en donde el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intraperitoneal y uno o más inhibidores de puesto de control se administran por la vía sistémica, por ejemplo, mediante administración IV. En algunas realizaciones, los virus vaccinia oncolíticos replicativos se administran en combinación con uno o más inhibidores de puesto de control, en donde el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por la vía intraarterial y uno o más inhibidores de puesto de control se administran por la vía sistémica, por ejemplo, mediante administración IV.

[0057] Los virus vaccinia oncolíticos tal como se reivindican se pueden administrar en una administración única o administraciones múltiples (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces). El virus se puede administrar a una dosis de 1×10^5 de unidades formadoras de placas (UFP), 5×10^5 UFP, 1×10^6 UFP, como mínimo 1×10^6 UFP, 5×10^6 o aproximadamente 5×10^6 UFP, 1×10^7 , como mínimo 1×10^7 UFP, 1×10^8 o aproximadamente 1×10^8 UFP, como mínimo 1×10^8 UFP, aproximadamente o como mínimo 5×10^8 UFP, 1×10^9 o como mínimo 1×10^9 UFP, 5×10^9 o como mínimo 5×10^9 UFP, 1×10^{10} UFP o como mínimo 1×10^{10} UFP, 5×10^{10} o como mínimo 5×10^{10} UFP, 1×10^{11} o como mínimo 1×10^{11} , 1×10^{12} o como mínimo 1×10^{12} , 1×10^{13} o como mínimo 1×10^{13} . Por ejemplo, el virus se puede administrar a una dosis de entre aproximadamente 10^6 - 10^{13} ufp, entre aproximadamente 10^7 - 10^{13} ufp, entre aproximadamente 10^8 - 10^{13} ufp, entre aproximadamente 10^9 - 10^{12} ufp, entre aproximadamente 10^8 - 10^{12} ufp, entre aproximadamente 10^7 - 10^{12} ufp, entre aproximadamente 10^6 - 10^{12} ufp, entre aproximadamente 10^6 - 10^9 ufp, entre aproximadamente 10^8 - 10^8 ufp, entre aproximadamente 10^7 - 10^{10} ufp, entre aproximadamente 10^7 - 10^9 ufp, entre aproximadamente 10^8 - 10^{10} ufp o entre aproximadamente 10^8 - 10^9 ufp. Preferiblemente, el virus se administra a una dosis de como mínimo 10^7 ufp, entre 10^7 y 10^{10} ufp, entre 10^7 - 10^9 ufp, entre 10^7 - 10^8 ufp, entre 10^8 - 10^{10} ufp, entre 10^8 - 10^9 ufp o entre 10^9 y 10^{10} ufp.

[0058] Se contempla que una dosis única del virus se refiera a la cantidad administrada a un sujeto o un tumor durante un periodo de tiempo de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 24 horas incluyendo todos los valores entre medio. La dosis se puede repartir a lo largo de un periodo de tiempo o mediante una inyección separada. Típicamente las dosis múltiples se administran a la misma región diana, tal como en las proximidades de un tumor. En determinados aspectos, la dosis viral se administra mediante un dispositivo de inyección que comprende una jeringuilla o una aguja con orificio único o múltiples orificios en una única aguja o múltiples puntas acopladas a una jeringuilla o una combinación de los mismos. Se puede administrar una única dosis del virus vaccinia o se pueden administrar los múltiples dosis a lo largo de un periodo de tratamiento que puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más semanas. Por ejemplo, el virus vaccinia se puede administrar cada dos días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas durante un periodo de tiempo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más meses.

[0059] Se puede difundir el virus vaccinia utilizando los procedimientos descritos en Earl y Moss en Ausubel et al., 1994 o los procedimientos descritos en la Publicación de la OMPI número WO2013/022764.

III. INHIBIDORES DE PUESTO DE CONTROL (ICIs)

[0060] Las proteínas de puesto de control inmunitario interactúan con ligandos específicos que envían una señal a células T que inhiben la función de células T. Las células cancerígenas lo aprovechan impulsando algo nivel de expresión de proteínas de puesto de control en sus superficies suprimiendo de este modo la respuesta inmune anticáncer.

[0061] Un inhibidor de puesto de control inmunitario (también denominado un ICI) para ser utilizado en la combinación

farmacéutica tal como se reivindica es cualquier compuesto capaz de inhibir la función de una proteína de puesto de control inmunitario. La inhibición incluye la reducción de función, así como el bloque completo.

[0062] El inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de un puesto de control inmunitario humano.

[0063] Las proteínas de puesto de control incluyen, sin limitación, CTLA-4, PD-1 (y sus ligandos PD-L1 y PD-L2), B7-H3, B7-H4, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, BT- LA, TIGIT y/o IDO. Las vías que implican LAG3, BTLA, B7-H3, B7-H4, TIM3 y KIR están reconocidas en la técnica para constituir vías de puesto de control inmunitario similares a las vías 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). En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control es un inhibidor de CTLA-4, PD-1 (y sus ligandos PD-L1 y PD-L2), B7-H3, B7-H4, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, BTLA, TIGIT y/o IDO. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT y/o TIM3. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de TIGIT. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de LAG3. En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un inhibidor de TIM3.

[0064] En algunas realizaciones, el inhibidor de puesto de control inmunitario de la combinación es un anticuerpo. El término «anticuerpo» tal como se utiliza en el presente documento abarca los anticuerpos de origen natural y modificados, así como los anticuerpos de longitud completa o fragmentos funcionales o análogos de los mismos que son capaces de unirse, por ejemplo, al puesto de control o epítipo diana (por ejemplo, conservando la parte de unión a antígeno). El anticuerpo para ser utilizado de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento puede ser de cualquier origen que incluye, sin limitación, origen humano, humanizado, animal o quimérico y puede ser de cualquier isotipo con una preferencia para un isotipo IgG1 o IgG4 y adicionalmente puede ser glicosilado o no glicosilado. El término anticuerpo incluye también anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos siempre y cuando el(los) anticuerpo(s) muestran la especificidad de unión descrita en el presente documento.

[0065] Los anticuerpos humanizados hacen referencia a anticuerpos no humano (por ejemplo, murino, de rata, etc.) cuya secuencia de proteínas ha sido modificada para aumentar la similitud con un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos hacen referencia a anticuerpos que comprenden uno o más elemento(s) de una especie y uno o más elemento(s) de otra especie, por ejemplo, un anticuerpo no humano que comprende como mínimo una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina humana.

[0066] Se puede modificar muchas formas de anticuerpo para ser utilizadas en la combinación de la invención, los ejemplos representativos de las cuales incluyen un fragmento Fab (fragmento monovalente que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1), un fragmento F(ab')₂ (fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por como mínimo un puente de disulfuro en la región bisagra), un fragmento Fd (que consiste en los dominios VH y CH1), un fragmento Fv (que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo), un fragmento dAb (que consiste en un fragmento de dominio variable único (dominio VH o VL), un Fv de cadena única (scFv) que comprende dos dominios de un fragmento Fv, VL y VH, que se fusionan juntos, posiblemente con un enlazador para crear una cadena de proteínas única.

[0067] En algunas realizaciones, los inhibidores de puesto de control inmunitario (también denominados ICIs) de la terapia de combinación son anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen de manera específica a una proteína de puesto de control inmunitario seleccionada entre el grupo que consiste en: CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, BTLA y TIGIT. En realizaciones particularmente preferidas, el inhibidor de puesto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano completo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que es capaz de como mínimo en parte oponerse a CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, LAG3 o TIGIT. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a CTLA4. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a B7-H3. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a B7-H4. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a TIM3. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a GAL9. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a LAG3. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo

o un fragmento del mismo que se une de manera específica a VISTA. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a KIR. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a BTLA. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína de puesto de control inmunitario de la terapia de combinación es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de manera específica a TIGIT.

[0068] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de CTLA-4, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une de manera específica a (e inhibe) CTLA-4. La secuencia de ácido nucleico de CTLA-4 humana completa se puede encontrar bajo el número de adhesión de GenBank LI 5006. Los anticuerpos monoclonales que se unen de manera específica a CTLA4 incluyen, sin limitación, Ipilimumab (Yervoy®; BMS) y Tremelimumab (Astra-Zeneca/MedImmune), así como los anticuerpos divulgados en las solicitudes de publicación patente de EE. UU. números 2005/0201994, 2002/0039581 y 2002/086014, y los anticuerpos divulgados en las patentes de EE. UU. números 5.811.097, 5.855.887, 6.051.227, 6.984.720, 6.682.736, 6.207.156, 5.977.318, 6.682.736, 7.109.003, 7.132.281 y 8.491.895 o un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos.

[0069] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de PD-1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une de manera específica a (e inhibe) PD-1. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos completas de PD-1 humana se pueden encontrar bajo el número de adhesión de GenBank U64863 y NP_005009.2. Los anticuerpos monoclonales contra PD-1 incluyen, sin limitación, lambrolizumab (por ejemplo, divulgado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en la patente de EE. UU. número 8.354.509),

[0070] Nivolumab (Opdivo®; Bristol-Myers Squibb; nombre del código BMS-936558) divulgado en la patente de EE. UU. número 8.008.449, Pembrolizumab (Keytruda®) y Pidilizumab (CT-011; divulgado en Rosenblatt et al., Immunother. 34:409-418 (2011)) o un anticuerpo que comprende las regiones de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos. Otros anticuerpos de PD-1 se describen en, por ejemplo, WO2004/004771, WO2004/056875, WO2006/121168, WO2008/156712, WO2009/014708, WO2009/114335, WO2013/043569 y WO2014/047350. En una realización relacionada, el inhibidor de puesto de control de la combinación farmacéutica es una proteína de fusión de anti-PD-1 tal como AMP-224 (compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 y la región Fc de IgG1 humana).

[0071] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de PD-L1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une de manera específica a (e inhibe) PD-L1. Los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 incluyen, sin limitación, pembrolizumab (MK-3475, divulgados en WO2009/114335), BMS- 936559 (MDX-1105), Atezolizumab (Genentech/Roche; MPDL33280A) divulgados en la patente de EE. UU. número 8.217.149,

[0072] Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune; MEDI4736) divulgado en la patente de EE. UU. número 8.779.108, MIH1 (Affymetrix que se obtiene a través de eBioscience (16.5983.82)) y Avelumab (MSB0010718C; Merck KGaA) o un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos. En una realización relacionada, el inhibidor de puesto de control inmunitario es una proteína de fusión anti-PD-L1 tal como la proteína de fusión PD-L2-Fc conocida como AMP-224 (divulgada en Mkritchyan M., et al., J. Immunol., 189:2338-47 (2010)).

[0073] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de PD-L2 tal como MIH18 (descrito en Pfistershammer et al., Eur J Immunol. 36:1104-1113 (2006)).

[0074] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de LAG3 tal como LAG3 soluble (IMP321 o LAG3-Ig divulgadas en la solicitud de patente de EE. UU. número 2011-0008331 y en Brignon et al., Clin. Cancer Res. 15:6225-6231 (2009)), IMP701 u otro anticuerpo humanizado que bloquea LAG3 humana descrito en la solicitud de la patente de EE. UU. número 2010-0233183,

[0075] La patente de EE. UU. número 5.773.578 o BMS-986016 u otros anticuerpos completamente humanos que bloquean LAG3 descritos en la publicación de solicitud de la patente de EE. UU. número 2011-0150892.

[0076] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de BTLA tal como el anticuerpo 4C7 divulgado en la patente de EE. UU. número 8.563.694.

[0077] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de puesto de control B7H4 tal como un anticuerpo, tal como se divulga en la solicitud de la patente de EE. UU. 2014/0294861 o una forma recombinante de B7H4, por ejemplo, tal como se divulga en la publicación de solicitud de la patente de EE. UU. 20120177645.

[0078] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor del punto de control B7-H3 tal como el anticuerpo MGA271 descrito como BRCA84D o un derivado como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20120294796,

[0079] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor del punto de control de TIM3 tal como un anticuerpo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 8.841.418 o el anticuerpo bloqueador de TIM3 antihumano F38- 2E2 divulgado por Jones et al., J. Exp. Med., 205(12):2763-79 (2008).

[0080] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor del punto de control KIR tal como el anticuerpo lirilumab (descrito en Romagne et al., Blood, 114(13):2667- 2677 (2009)).

[0081] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa de virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de TIGIT. Los inhibidores del punto de control de TIGIT inhiben preferiblemente la interacción de TIGIT con el receptor de poliovirus (CD155) e incluyen, sin limitación, anticuerpos dirigidos a TIGIT humano, como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 9.499.596 y las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU.s n.º 20160355589, 20160176963 y variantes del receptor de poliovirus, tales como como los descritos en la patente de EE.UU. número 9.327.014.

[0082] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa de virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de IDO. IDO se reconoce como una proteína de punto de control inmunitario; su expresión en células tumorales contribuye a la tolerancia inmunológica al desactivar las células T efectoras. Se cree que IDO contribuye a la resistencia de las terapias anti-CLTA-4. Los inhibidores de IDO para su uso según los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, miméticos de triptófano tales como D-1MT (isoforma D de 1-metil-DL-triptófano (MT)), L-1MT (isoforma L de MT), MTH -Trp (metiltiohidantoína-dl-triptófano; supresor transcripcional de IDO) y β -carbolinas, miméticos de indol como agentes a base de naftoquinona, S-alil-brassinina, S-bencil-brassinina, 5-Bromo-brassinina, así como agentes a base de fenilimidazol, 4-fenilimidazol, exiguamina A, epacadostat, ácido rosmarínico, norharmane y NSC401366. Los inhibidores de IDO preferidos incluyen INCB 024360 (epacadostat; 1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamida, 4-((2-((aminosulfonyl)amino)etil)amino)-N-(3-bromo-4-fluorofenil)- N'-hidroxi-, (C(Z))- ; Incyte), indoximod (NLG2101; D-1MT; NewLink Genetics), vacuna peptídica IDO (Universidad de Copenhagen) y NLG919 (NewLink Genetics).

[0083] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen, un inhibidor de PD-1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) PD-1, y un CTLA- 4 inhibidor, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) CTLA-4. Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos de PD-1 humano se pueden encontrar con el número de acceso de GenBank U64863 y NP_005009.2. Los anticuerpos monoclonales contra PD-1 incluyen, sin limitación, lambrolizumab (por ejemplo, descrito como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en la patente de EE.UU. n.º 8.354.509),

[0084] Nivolumab (Opdivo® : Bristol-Myers Squibb; nombre clave BMS-936558) divulgado en la patente de EE.UU. n.º 8.008.449, pembrolizumab (Keytruda®) y Pidilizumab (CT-011; divulgado en Rosenblatt et al., Immunother. 34 : 409-418 (2011)) o un anticuerpo que comprende las regiones de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos. Otros anticuerpos anti-PD-1 se describen, por ejemplo, en los documentos WO2004/004771, WO2004/056875, WO2006/121168, WO2008/156712, WO2009/014708, WO2009/114335, WO2013/043569 y WO2014/047350. En una realización relacionada, el inhibidor del punto de control de la combinación farmacéutica es una proteína de fusión anti-PD-1 tal como AMP-224 (compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 y la región Fc de IgG1 humana). La secuencia completa de ácido nucleico de CTLA-4 humano se puede encontrar con el número de acceso de GenBank LI 5006. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CTLA4 incluyen, entre otros, ipilimumab (Yervoy® : BMS) y tremelimumab (AstraZeneca/MedImmune), así como anticuerpos descritos en las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. Nos. 2005/0201994, 2002/0039581 y 2002/086014, y anticuerpos descritos en las patentes de EE. UU. Nos. 5.811.097, 5.855.887, 6.051.227, 6.984.720, 6.682.736, 6.207.156, 5.977.318, 6.682.736, 7.109.003, 7.132.281, y 8.491.895 o un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos.

[0085] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen, un inhibidor de PD-L1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) PD-L1, y un CTLA- 4 inhibidor, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) CTLA-4. Los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 incluyen, sin limitación, pembrolizumab (MK-3475, divulgado en el documento WO2009/114335), BMS-936559 (MDX-1105), Atezolizumab (Genentech/Roche; MPDL33280A) divulgado en la patente de EE.UU. NO. 8.217.149,

[0086] Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune; MEDI4736) divulgado en la patente de EE.UU. n.º 8.779.108, MIH1 (Affymetrix que se puede obtener a través de eBioscience (16.5983.82)) y Avelumab (MSB0010718C; Merck KGaA) o un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos. En una realización relacionada, el inhibidor del punto de control inmunitario es una proteína de fusión anti-PD-L1 tal como la proteína de fusión PD-L2-Fc conocida como AMP-224 (desvelada en Mkritchyan M., et al., J. Immunol., 189 :2338-47 (2010)). La secuencia completa de ácido nucleico humano de CTLA-4 se puede encontrar con el número de acceso de GenBank LI 5006. Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CTLA4 incluyen, entre otros, ipilimumab (Yervoy®; BMS) y tremelimumab (AstraZeneca/MedImmune), así como anticuerpos divulgados en las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. Nos. 2005/0201994, 2002/0039581 y 2002/086014, y anticuerpos divulgados en las patentes de EE. UU. Nos. 5.811.097, 5.855.887, 6.051.227, 6.984.720, 6.682.736, 6.207.156, 5.977.318, 6.682.736, 7.109.003, 7.132.281 y 8.491.895 o un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos.

[0087] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen, un inhibidor de PD-1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) PD-1, y un inhibidor de LAG3 tales como LAG3 soluble (IMP321 o LAG3-Ig divulgada en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2011-0008331, y en Brignon et al., Clin. Cancer Res. 15:6225-6231 (2009)), IMP701 u otros anticuerpos humanizados. bloquear LAG3 humano descrito en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2010-0233183,

[0088] La Patente de EE.UU. n.º 5.773.578, o BMS-986016 u otros anticuerpos completamente humanos que bloquean LAG3 descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2011-0150892. Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos de PD-1 humano se pueden encontrar con el número de acceso de GenBank U64863 y NP_005009.2. Los anticuerpos monoclonales contra PD-1 incluyen, sin limitación, lambrolizumab (por ejemplo, divulgado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en la patente de EE.UU. n.º 8.354.509), Nivolumab (Opdivo®; Bristol-Myers Squibb; nombre clave BMS-936558) divulgado en la Patente de EE.UU. N.º 8.008.449, Pembrolizumab (Keytruda®) y Pidilizumab (CT-011; divulgado en Rosenblatt et al., Immunother. 34:409-418 (2011)) o un anticuerpo que comprende las regiones de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos. Otros anticuerpos anti-PD-1 se describen, por ejemplo, en los documentos WO2004/004771, WO2004/056875, WO2006/121168, WO2008/156712, WO2009/014708, WO2009/114335, WO2013/043569 y WO2014/047350. En una realización relacionada, el inhibidor del punto de control de la combinación farmacéutica es una proteína de fusión anti-PD-1 tal como AMP-224 (compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 y la región Fc de IgG1 humana).

[0089] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen, un inhibidor de PD-L1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) PD-L1, y un inhibidor de LAG3 tales como LAG3 soluble (IMP321 o LAG3-Ig divulgada en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2011-0008331, y en Brignon et al., Clin. Cancer Res. 15:6225-6231 (2009)), IMP701 u otros anticuerpos humanizados. bloquear LAG3 humano descrito en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2010-0233183,

[0090] La patente de EE.UU. n.º 5.773.578, o BMS-986016 u otros anticuerpos completamente humanos que bloquean LAG3 descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2011-0150892. Los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 incluyen, sin limitación, pembrolizumab (MK-3475, descrito en WO2009/114335), BMS-936559 (MDX-1105), Atezolizumab (Genentech/Roche; MPDL33280A) divulgados en la patente de EE.UU. NO. 8.217.149,

[0091] Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune; MEDI4736) divulgado en la patente de EE.UU. n.º 8.779.108, MIH1 (Affymetrix que se puede obtener a través de eBioscience (16.5983.82)) y Avelumab (MSB0010718C; Merck KGaA) o un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos. En una realización relacionada, el inhibidor del punto de control inmunitario es una proteína de fusión anti-PD-L1 tal como la proteína de fusión PD-L2-Fc conocida como AMP-224 (desvelada en Mkritchyan M., et al., J. Immunol., 189 :2338-47 (2010)).

[0092] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen, un inhibidor de PD-1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) PD-1, y un punto de control TIM3. inhibidor tal como un anticuerpo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 8.841.418, o el anticuerpo bloqueador de TIM3 antihumano F38-2E2 descrito por Jones et al., J. Exp. Med., 205(12):2763-79 (2008). Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos de PD-1 humano se pueden encontrar con el número de acceso de GenBank U64863 y NP_005009.2. Los anticuerpos monoclonales contra PD-1 incluyen, sin limitación, lambrolizumab (por ejemplo, divulgado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en la patente de EE.UU. n.º 8.354.509), Nivolumab (Opdivo®; Bristol-Myers Squibb; nombre clave BMS-936558) divulgada en la patente de EE.UU. número 8.008.449,

[0093] Pembrolizumab (Keytruda®) y Pidilizumab (CT-011; divulgado en Rosenblatt et al., Immunother. 34:409-418 (2011)) o un anticuerpo que comprende las regiones de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos. Otros anticuerpos anti-PD-1 se describen, por ejemplo, en los documentos WO2004/004771, WO2004/056875,

WO2006/121168, WO2008/156712, WO2009/014708, WO2009/114335, WO2013/043569 y WO2014/047350. En una realización relacionada, el inhibidor del punto de control de la combinación farmacéutica es una proteína de fusión anti-PD-1 tal como AMP-224 (compuesta por el dominio extracelular de PD-L2 y la región Fc de IgG1 humana).

[0094] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa del virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen, un inhibidor de PD-L1, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a (e inhibe) PD-L1, y un punto de control TIM3. inhibidor tal como un anticuerpo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 8.841.418, o el anticuerpo bloqueador de TIM3 antihumano F38-2E2 descrito por Jones et al., J. Exp. Med., 205(12):2763-79 (2008). Los anticuerpos monoclonales contra PD-L1 incluyen, sin limitación, pembrolizumab (MK-3475, divulgado en el documento WO2009/114335), BMS-936559 (MDX-1105), Atezolizumab (Genentech/Roche; MPDL33280A) divulgado en la patente de EE.UU. NO. 8.217.149, Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune; MEDI4736) descrito en la patente de EE.UU. n.º 8.779.108,

[0095] MIH1 (Affymetrix que se puede obtener a través de eBioscience (16.5983.82)) y Avelumab (MSB0010718C; Merck KGaA) o un anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de cualquiera de estos anticuerpos. En una realización relacionada, el inhibidor del punto de control inmunitario es una proteína de fusión anti-PD-L1 tal como la proteína de fusión PD-L2-Fc conocida como AMP-224 (desvelada en Mkritchyan M., et al., J. Immunol., 189 :2338-47 (2010).

[0096] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa de virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de TIGIT. Los inhibidores del punto de control de TIGIT inhiben preferiblemente la interacción de TIGIT con el receptor de poliovirus (CD155) e incluyen, sin limitación, anticuerpos dirigidos a TIGIT humano, como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 9.499.596 y las publicaciones de solicitudes de patente de EE.UU.s n.º 20160355589, 20160176963 y variantes del receptor de poliovirus, tales como como los descritos en la patente de EE.UU. número 9.327.014.

[0097] En algunas realizaciones, la combinación farmacéutica comprende una cepa de virus vaccinia Western Reserve, Wyeth, Lister o Copenhagen y un inhibidor de IDO (indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa. Los inhibidores de IDO incluyen metabólicos, los inhibidores preferiblemente inhiben vías metabólicas e incluyen, sin limitación, Norharmane, (ver, Chiarugi A, et al., "La inhibición combinada de la indoleamina 2,3-dioxigenasa y el óxido nítrico sintasa modula la liberación de neurotoxinas por macrófagos activados por interferón gamma", Journal of Leukito Biology. 68 (2) : 260-6. (2000)), ácido rosmarínico (ver, Lee HJ, et al., "Rosmarinic acid inhibites indoleamine 2,3-dioxygenase expresión en murine dendrítico células", Biochemical Pharmacology. 73 (9): 1412-21 (2007)), inhibidores de la COX-2 (ver, Cesario A, et al., "The interplay Between indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and cyclooxygenase (COX)-2 in cronic inflamación y cáncer", Current Medicinal Chemistry". Investigación sobre el cáncer. 67 (2): 792-801 (2007) y Chauhan N, et al., (abril de 2009). "Reevaluación del mecanismo de reacción de las hemo dioxigenasas". Revista de la Sociedad Química De EE.UU.. 131 (12): 4186-7 (2009)), incluyendo por ejemplo, el racemero específico 1-metil-D-triptófano (conocido como indoximod) (un candidato a ensayo clínico), Epacadostat (INCB24360), navoximod (GDC-0919) (ver, Jochems C, et al., "El inhibidor selectivo de IDO1 epacadostat mejora la inmunogenicidad de las células dendríticas y la capacidad lítica de las células T específicas del antígeno tumoral", Oncotarget. 7 (25): 37762-37772. (2016)), y/o BMS-986205. En algunas realizaciones, el inhibidor de IDO se selecciona del grupo que consiste en norharmane, ácido rosmarínico, inhibidores de COX-2, 1-metiltriptófano, Indoximod, Epacadostat (INCB24360), navoximod (GDC-0919) y/o BMS-986205.

[0098] Como sabrá el experto, pueden estar en uso nombres alternativos y/o equivalentes para ciertos anticuerpos mencionados anteriormente. Dichos nombres alternativos y/o equivalentes son intercambiables en el contexto de la presente invención.

[0099] En algunos aspectos, la combinación farmacéutica descrita en el presente documento incluye (i) más de un inhibidor de punto de control inmunitario y (ii) un virus vaccinia oncolítico replicativo como se reivindica. En una realización preferida, se administran simultáneamente un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de CTLA-4 con el virus vaccinia. Otros ejemplos incluyen, sin limitación, la administración simultánea de un inhibidor de LAG3 y un inhibidor de PD-1 con el virus vaccinia, o la administración simultánea de un inhibidor de LAG3 y un inhibidor de PD-L1. Otros ejemplos incluyen la administración simultánea de un inhibidor de IDO y un inhibidor de CTLA-4 y/o inhibidor de PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de IDO se selecciona del grupo que consiste en norharmane, ácido rosmarínico, inhibidores de COX-2, 1-metiltriptófano, Indoximod, Epacadostat (INCB24360), navoximod (GDC-0919) y/o BMS-986205.

IV. CITOINAS

[0100] El virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica comprende una secuencia heteróloga que codifica una citocina, en la que la citocina es expresada por el virus. El virus vaccinia oncolítico replicativo está diseñado para expresar GM-CSF.

[0101] Otras citocinas incluyen interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-7 (IL-7), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), interleucina-18 (IL-18), interleucina-21 (IL-21), interleucina-24 (IL-24),

interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral - α (TNF- α).

V. ANTÍGENOS TUMORALES

- 5 [0102] En varias realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un antígeno tumoral y una citoquina como se reivindica, en donde el antígeno tumoral y la citoquina se expresan en una célula infectada con el virus, preferiblemente una célula tumoral. Los antígenos tumorales abarcan antígenos específicos de tumores y antígenos asociados a tumores. El virus vaccinia oncolítico con capacidad de replicación puede expresar el antígeno tumoral de longitud completa o un péptido inmunogénico del mismo.
- 10 En algunas realizaciones, la citoquina se expresa en una célula infectada con el virus vaccinia oncolítico replicativo. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un antígeno tumoral y una citoquina, en donde el antígeno tumoral y la citoquina se expresan en una célula infectada con el virus vaccinia oncolítico replicativo. En algunas realizaciones, la célula es una célula tumoral.
- 15 [0103] En algunas realizaciones, los antígenos tumorales pueden incluir, sin limitación, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p-15, gp100, MART-1/MelanA, TRP- 1 (gp75), TRP-2, tirosinasa, quinasa 4 dependiente de ciclina, β -catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, virus del papiloma humano-E6, virus del papiloma humano E7, CD20, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor del factor de crecimiento epidérmico, MUC-1, caspasa-8, CD5, mucina-1, Lewisx, CA-125, p185HER2, IL-2R, Fap- α , tenascina, antígenos asociados con una metaloproteínasa, CAMPATH-1, RCC: Regulador de señalización de proteína G 5 (RGS5), Survivin (BIRC5 = inhibidor baculoviral de la apoptosis que contiene repetición 5), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3 (IGF-BP3), timidilato sintetasa (TYMS), proteína 2 inducible por hipoxia = gota de lípidos inducible hipoxial asociada (HIG2), metalopeptidasa de matriz 7 (MMP7), homólogo de ciruela pasa 2 (PRUNE2), similar a proteína RecQ (similar a ADN helicasa Q1) (RECQL); receptor de leptina (LEPR); inhibidor de retroalimentación del receptor ERBB 1 (ERRFI1); proteína lisosomal transmembrana 4 alfa (LAPTM4A); RAB1B, familia de oncogén RAS (RAB1B); CD24; homo sapiens timosina beta 4, ligada al cromosoma X (TMSB4X); proteína A6 de unión a calcio de homo sapiens S100 (S100A6); receptor de adenosina A2 del homo sapiens (ADORA2B); marco de lectura abierto 61 del cromosoma 16 (C16orf61); ROD1 regulador de diferenciación 1 (ROD1); desacetilasa sirtuina-2 dependiente de NAD (SIR2L); tubulina alfa 1c (TUBA1C); factor inhibidor de la ATPasa 1 (ATPIF1); antígeno estromal 2 (STAG2); y caseína quinasa nuclear y sustrato 1 dependiente de ciclina (NUCKS1). En algunas realizaciones, el antígeno es uno incluido en la patente de EE.UU. nº 9.919.047). En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral de carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral del carcinoma de células renales se selecciona del grupo que consiste en el regulador de la señalización de la proteína G 5 (RGS5), Survivin (BIRC5 = inhibidor baculoviral de la repetición de la apoptosis que contiene 5), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3 (IGF-BP3), timidilato sintetasa (TYMS), proteína 2 inducible por hipoxia, gotita de lípidos inducible hipoxial asociada (HIG2), metalopeptidasa de matriz 7 (MMP7), homólogo de ciruela pasa 2 (PRUNE2), similar a proteína RecQ (tipo ADN helicasa Q1) (RECQL), receptor de leptina (LEPR), inhibidor de retroalimentación del receptor ERBB 1 (ERRFI1), proteína lisosomal transmembrana 4 alfa (LAPTM4A); RAB1B, familia de oncogén RAS (RAB1B), CD24, timosina beta 4 de homo sapiens, ligada al cromosoma X (TMSB4X), proteína de unión a calcio A6 de homo sapiens S100 (S100A6), receptor de adenosina A2 de homo sapiens (ADORA2B), cromosoma 16, marco de lectura abierto 61 (C16orf61), regulador de diferenciación 1 ROD1 (ROD1), desacetilasa sirtuina-2 dependiente de NAD (SIR2L), tubulina alfa 1c (TUBA1C), factor inhibidor de la ATPasa 1 (ATPIF1), antígeno estromal 2 (STAG2) y caseína quinasa nuclear y sustrato 1 dependiente de ciclina (NUCKS1). En algunas realizaciones, los antígenos tumorales incluyen, sin limitación, antígeno de pancarcinoma KS 1/4, antígeno de carcinoma de ovario (CA125), fosfato ácido prostático, antígeno prostático específico,^{HER2}) y epítipo neu de HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM), antígeno de linfocitos humanos malignos-APO-1, antígeno de diferenciación (como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos fetales, endodermo primario, antígeno I que se encuentra en los eritrocitos adultos, embriones preimplantacionales, I (Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrado en el epitelio mamario, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D₁₅₆-22 encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (sangre grupo H), C14 encontrado en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en el cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 encontrado en el receptor de EGF de las células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en el adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en el cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en las células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en 4 a embriones en estadio de 8 células), péptido derivado del receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T, proteína C reactiva (PCR), antígeno canceroso 50 (CA-50), antígeno canceroso 15-3 (CA15-3) asociado con cáncer de mama, antígeno de cáncer 19 (CA-19) y antígeno de cáncer 242 asociado con cánceres gastrointestinales, antígeno asociado a carcinoma (CAA), cromogranina A, antígeno de mucina epitelial (MC5), antígeno específico del epitelio humano (E1A), Lewis (a) antígeno, antígeno de melanoma, antígenos asociados a melanoma 100, 25 y 150, antígeno asociado a carcinoma similar a mucina, proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos (MRPm6), proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos (MRP41), proteína del oncogén Neu (C-erbB-2), enolasa neuronal específica (NSE), glicoproteína P (producto del gen mdr1), antígeno relacionado con la resistencia a múltiples

fármacos, p170, antígeno relacionado con la resistencia a múltiples fármacos, antígeno prostático específico (PSA), CD56 y NCAM.

[0104] En algunas realizaciones, otros antígenos tumorales incluyen, sin limitación, AIM2 (ausente en melanoma 2), BMI1 (oncogén del dedo anular BMI1 polycomb), COX-2 (ciclooxigenasa-2), EGFRvIII (variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico), EZH2 (potenciador del homólogo 2 de zeste), LICAM (molécula de adhesión de células L1 humana), Livin, Livin β , MRP-3 (proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos), Nestin, OLIG2 (factor de transcripción de oligodendrocitos), SOX2 (caja HMG relacionada con SRY 2), ART1 (antígeno reconocido por las células T 1), ART4 (antígeno reconocido por las células T 4), SART1 (antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por las células T 1), SART2, SART3, ciclina B, Gli1 (glioma -oncogén asociado homólogo 1), Cav-1 (caveolina-1), cathepsina B, CD74 (grupo de diferenciación 74), E-cadherina (adhesión epitelial dependiente de calcio), EphA2/Eck (receptor EPH A2/quinasa epitelial), Fra-1/Fos1 (antígeno 1 relacionado con fos), Ki67 (antígeno asociado a la proliferación nuclear del anticuerpo Ki67), Ku70/80 (subunidades de proteínas del heterodímero Ku humano), IL-13Ra2 (subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13), NY-ESO-1 (carcinoma de células escamosas de esófago de Nueva York 1), PROX1 (proteína homeobox 1 de próspero), PSCA (antígeno de células madre de próstata), SOX10 (HMG-box 10 relacionado con SRY), SOX11, Survivin, UPAR (uroquinasa -receptor activador del plasminógeno de tipo y WT-1 (proteína 1 del tumor de Wilms).

VI. REGÍMENES DE TRATAMIENTO Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

[0105] El virus vaccinia oncolítico replicativo y el inhibidor del punto de control inmunitario de la combinación farmacéutica se administran simultáneamente, en donde el virus vaccinia oncolítico se administra mediante administración intratumoral. La administración simultánea puede tener lugar, por ejemplo, en forma de una combinación fija que comprende estos agentes, o administrando simultáneamente cada agente en formulaciones independientes. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo y el inhibidor del punto de control inmunitario PD-1 o PD-L1 de la combinación farmacéutica se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo y el inhibidor del punto de control inmunitario CTLA-4 de la combinación farmacéutica se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo y el inhibidor del punto de control inmunitario TIGIT de la combinación farmacéutica se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo, el inhibidor del punto de control inmunitario PD-1 o PD-L1 y el inhibidor del punto de control inmunitario CTLA-4 de la combinación farmacéutica se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo, el inhibidor del punto de control inmunitario PD-1 o PD-L1 y el inhibidor del punto de control inmunitario TIGIT de la combinación farmacéutica se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral, intravenosa, intraarterial y/o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraarterial. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra únicamente mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario se administra sistémicamente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intratumoral y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intravenosa y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraperitoneal y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraarterial y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un antígeno tumoral y una citoquina como se reivindica, en donde el antígeno tumoral y las citoquinas se expresan en una célula infectada con el virus, preferiblemente una célula tumoral.

[0106] En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario se selecciona de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es CTLA-4. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es LAG3. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es PD-1. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es TIM3. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el tumor es un carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral, IV y/o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraarterial. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra únicamente mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario se administra sistémicamente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intratumoral y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se

administra por vía intravenosa y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraperitoneal y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraarterial y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un antígeno tumoral y una citoquina como se reivindica, en donde el antígeno tumoral y la citocina se expresan en una célula infectada con el virus, preferiblemente una célula tumoral.

[0107] En algunas realizaciones, la combinación comprende (a) un virus vaccinia oncolítico replicativo como se reivindica, (b) un inhibidor de PD-1 y/o PD-L1, y (c) un inhibidor de la proteína del punto de control inmunitario. En algunas realizaciones del procedimiento de tratamiento, la proteína del punto de control inmunitario se selecciona de CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es CTLA-4. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es LAG3. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es TIGIT. En algunas realizaciones, la proteína del punto de control inmunitario es TIM3. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el tumor es un carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral, IV y/o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra únicamente mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario se administra sistémicamente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intratumoral y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intravenosa y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraperitoneal y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraarterial y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica.

[0108] En algunas realizaciones, el tumor no expresa la proteína del punto de control inmunitario o expresa la proteína del punto de control inmunitario a un nivel relativamente bajo antes de administrar el virus vaccinia oncolítico replicativo. En algunas realizaciones, un nivel alto se indica mediante una puntuación proporcional del tumor igual o superior al 50 %. En algunas realizaciones, un nivel alto se indica mediante una puntuación proporcional del tumor superior al 60 %, superior al 70 %, superior al 80 %, superior al 90 %, superior al 95 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %. En algunas realizaciones, un nivel alto para un tumor previamente tratado se indica mediante una puntuación proporcional del tumor superior al 1 %. En algunas realizaciones, un nivel alto está indicado por PD-L1 que expresa células tumorales igual o superior al 50 % (por ejemplo, más del 50 % de las células tumorales expresan PD-L1). En algunas realizaciones, un nivel alto está indicado por PD-L1 que expresa células tumorales en más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %. En algunas realizaciones, un nivel alto para un tumor previamente tratado está indicado por un PD-L1 que expresa células tumorales en más del 1 % (por ejemplo, más del 1 % de las células tumorales expresan PD-L1). En algunas realizaciones, se puede emplear cualquier prueba de diagnóstico de PD-L1 para medir la expresión de PD-L1. En algunas realizaciones, cuando se mide el punto de control de PD-L1, se emplea la prueba de diagnóstico complementaria DaKo de PD-L1 para medir el nivel de PD-L1.

[0109] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende una etapa de medir el nivel de expresión de la proteína del punto de control en el tumor antes de administrar la combinación.

[0110] La administración del virus vaccinia oncolítico y el inhibidor del punto de control inmunitario seguirá protocolos generales para la administración de cada terapia particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del tratamiento. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que se puedan aplicar diversas terapias estándar, así como intervención quirúrgica, además de la terapia combinada de la invención.

[0111] Los regímenes de tratamiento pueden variar y a menudo dependen del tipo de tumor, la ubicación del tumor, la progresión de la enfermedad y la salud y edad del paciente. Ciertos tipos de tumores requerirán un tratamiento más agresivo, mientras que, al mismo tiempo, ciertos pacientes no pueden tolerar protocolos más exigentes.

[0112] En determinadas realizaciones, el tumor que se está tratando puede no ser resecable, al menos inicialmente. El tratamiento con una terapia combinada de la invención puede aumentar la resecabilidad del tumor debido a la contracción de los márgenes o mediante la eliminación de ciertas porciones particularmente invasivas. Después del tratamiento, puede ser posible la resección. Los tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán para eliminar la enfermedad residual microscópica en el sitio del tumor.

[0113] Al determinar una interacción sinérgica entre uno o más componentes, el rango óptimo para el efecto y los rangos de dosis absolutas de cada componente para el efecto se pueden medir definitivamente mediante la

administración de los componentes en diferentes rangos de relación p/p y dosis a pacientes en necesidad de tratamiento. Para los seres humanos, la complejidad y el costo de realizar estudios clínicos en pacientes hacen poco práctico el uso de esta forma de prueba como modelo principal de sinergia. Sin embargo, la observación de la sinergia en una especie puede predecir el efecto en otras especies y existen modelos animales, como se describe en este documento, para medir un efecto sinérgico y los resultados de dichos estudios también se pueden usar para predecir la dosis efectiva y la relación de concentración plasmática. rangos y las dosis absolutas y concentraciones plasmáticas requeridas en otras especies mediante la aplicación de procedimientos farmacocinéticos/farmacodinámicos. Las correlaciones establecidas entre los modelos tumorales y los efectos observados en el hombre sugieren que la sinergia en animales puede demostrarse, por ejemplo, en un modelo tumoral de xenoinjerto humano.

[0114] En algunas realizaciones, la combinación se usa para tratar y/o prevenir el cáncer en un mamífero como se reivindica. En algunas realizaciones, el cáncer incluye, entre otros, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de tímico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, , cáncer renal, cáncer testicular, cáncer rectal, cáncer de mama y cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, el cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de tímico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer testicular, cáncer rectal, cáncer de mama y cáncer de páncreas. En una realización preferida, la combinación se usa para tratar y/o prevenir una metástasis. En otras realizaciones preferidas, la combinación se usa para tratar un cáncer que incluye, entre otros, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluido cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de estómago, cáncer de esófago, sarcoma, , mesotelioma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y de hígado. En algunas realizaciones, la combinación se usa para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluido cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de estómago, cáncer de esófago, sarcoma, , mesotelioma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y de hígado. En algunas realizaciones, la combinación se usa para tratar el cáncer colorrectal, particularmente el cáncer colorrectal metastásico. En algunas realizaciones, el mamífero a tratar es un ser humano. En otro aspecto preferido, la combinación se usa para tratar un cáncer que es resistente a uno o más inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, el cáncer es resistente a la inmunoterapia con inhibidores de PD-1, CTLA-4, LAG3 y/o TIGIT). En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer sólido o un tumor sólido.

[0115] Los procedimientos incluyen la administración simultánea de cantidades terapéuticamente eficaces de un virus vaccinia oncolítico replicativo como se reivindica y un inhibidor del punto de control inmunitario. Una cantidad terapéuticamente eficaz de virus oncolítico se define como aquella cantidad suficiente para inducir la oncólisis (la alteración o lisis de una célula cancerosa). Preferiblemente, el virus vaccinia oncolítico y el inhibidor del punto de control inmunitario se administran en cantidades sinérgicamente eficaces. El término incluye la desaceleración, inhibición o reducción del crecimiento o tamaño de un tumor e incluye la erradicación del tumor en ciertos casos. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de virus vaccinia oncolítico da como resultado la diseminación sistémica del virus terapéutico a tumores, por ejemplo, infección de tumores no inyectados. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz del virus vaccinia oncolítico es una cantidad suficiente para inducir la oncólisis: la alteración o lisis de una célula cancerosa.

[0116] En algunas realizaciones, el tratamiento y/o la prevención del cáncer indica al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o aproximadamente un 100 % de reducción y/o disminución del tamaño y/o presencia del tumor después del tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento y/o la prevención del cáncer indican una regresión completa del tumor después del tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento y/o la prevención del cáncer indican la remisión completa del tumor después del tratamiento. En algunas realizaciones, el cáncer es refractario o resistente a una terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios. En algunas realizaciones, el cáncer es refractario o resistente al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-CTLA-4. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente al tratamiento con anticuerpos anti-CTLA-4. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo y un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo y un inhibidor del punto de control inmunitario, en el que el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT y/o TIM3. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-1 o PD-L1 y un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-1 o PD-L1, y un inhibidor del punto de control inmunitario, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de LAG3, un inhibidor de TIGIT, o un inhibidor de TIM3. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende

administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-1 y un inhibidor del punto de control inmunitario, en el que el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de TIGIT. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de TIGIT. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de TIM3. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar un virus vaccinia oncolítico replicativo, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios, en donde el inhibidor de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de TIM3.

[0117] En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral, IV y/o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra mediante administración intraarterial. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra únicamente mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra únicamente mediante administración intratumoral.

[0118] El inhibidor de puntos de control como se describe en el presente documento se puede administrar por diversas vías que incluyen, por ejemplo, oral o parenteral, tal como por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbitaria, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracisternal, intratumoral, intravasal, intradérmica o por vía pasiva, o absorción facilitada a través de la piel usando, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control se administra sistémicamente. El inhibidor del punto de control también se puede administrar en el sitio de una condición patológica, por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial en un vaso sanguíneo que irriga un tumor. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control es un inhibidor de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT y/o TIM3.

[0119] En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intratumoral y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intravenosa y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraperitoneal y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica. En algunas realizaciones, el virus oncolítico replicativo se administra por vía intraarterial y el inhibidor del punto de control se administra por vía sistémica.

[0120] La cantidad total de un agente a administrar al practicar un procedimiento de la invención se puede administrar a un sujeto como una dosis única, ya sea como un bolo o por infusión durante un período de tiempo relativamente corto, o se puede administrar usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un período de tiempo prolongado. Un experto en la técnica sabría que la cantidad de composición para tratar una afección patológica en un sujeto depende de muchos factores que incluyen la edad y la salud general del sujeto así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. En vista de estos factores, el experto ajustará la dosis particular según sea necesario. En general, la formulación de la composición y las vías y frecuencia de administración se determinan, inicialmente, mediante ensayos clínicos de Fase I y Fase II.

[0121] En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control se administra en 0,01-0,05 mg/kg, 0,05-0,1 mg/kg, 0,1-0,2 mg/kg, 0,2-0,3 mg/kg, 0,3-0,5 mg/kg, 0,5- 0,7 mg/kg, 0,7-1 mg/kg, 1-2 mg/kg, 2-3 mg/kg, 3-4 mg/kg, 4-5 mg/kg, 5-6 mg/kg, 6-7 mg/kg, 7-8 mg/kg, 8-9 mg/kg, 9-10 mg/kg, al menos 10 mg/kg, o cualquier combinación de las mismas dosis. Las dosis adecuadas del inhibidor del punto de control varían de aproximadamente 0,5 mg/kg a 25 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control se administra al menos una vez a la semana, al menos dos veces a la semana, al menos tres veces a la semana, al menos una vez cada dos semanas o al menos una vez al mes o varios meses. En determinadas realizaciones, el inhibidor del punto de control se administra como una dosis única, en dos dosis, en tres dosis, en cuatro dosis, en cinco dosis o en 6 o más dosis. Preferiblemente, el inhibidor del punto de control se administra por vía intravenosa (por ejemplo, mediante infusión o inyección intravenosa) o por vía intratumoral. A modo de ejemplo no limitativo, ipilimumab se administra preferentemente mediante infusión intravenosa a una dosis de 3 mg/kg cada tres semanas para un total de cuatro dosis. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control es un inhibidor de PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIGIT y/o TIM3.

A. Agentes Terapéuticos anticancerígenos adicionales

[0122] Se pueden administrar uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales con la combinación de la invención, incluyendo, sin limitación, 5-fluorouracilo (FU), ácido folínico (FA) (o leucovorina), metotrexato, capecitabina (Xeloda; un profármaco oral de 5-FU), oxaliplatino (Eloxatin), bevacizumab (Avastin), cetuximab (Erbix) y panitumumab (Vectibix), en cualquier combinación. Estos agentes pueden administrarse según protocolos de tratamiento conocidos. Generalmente, el agente quimioterapéutico adicional se administra por vía intravenosa, con excepción de capecitabina que es una formulación oral.

[0123] En otros aspectos, los procedimientos de la invención comprenden además administrar una terapia contra el cáncer adicional tal como radioterapia, terapia hormonal, cirugía y combinaciones de las mismas.

[0124] La radioterapia incluye, sin limitación, rayos γ , rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, como las microondas y la irradiación UV. Lo más probable es que todos estos factores produzcan una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los rangos de dosificación de los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados (3 a 4 semanas) hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los rangos de dosificación de los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la intensidad y el tipo de radiación emitida y la absorción por las células neoplásicas.

[0125] Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que puede usarse junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica y/o terapias alternativas.

[0126] La cirugía curativa incluye resección en la que todo o parte del tejido canceroso se elimina, extirpa y/o destruye físicamente. La resección tumoral se refiere a la extirpación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención pueda usarse junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o cantidades incidentales de tejido normal.

[0127] Tras la escisión de parte o de la totalidad de las células, tejidos o tumores cancerosos, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede lograr mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anticancerígena adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos también pueden tener diferentes dosis.

[0128] Otra forma de terapia para uso junto con los procedimientos actuales incluye hipertermia, que es un procedimiento en el que el tejido de un paciente se expone a altas temperaturas (hasta 106°F). Los dispositivos de calentamiento externos o internos pueden participar en la aplicación de hipertermia local, regional o de todo el cuerpo. La hipertermia local implica la aplicación de calor en un área pequeña, como un tumor. El calor se puede generar externamente con ondas de alta frecuencia dirigidas a un tumor desde un dispositivo fuera del cuerpo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, que incluye alambres delgados calentados o tubos huecos llenos de agua tibia, antenas de microondas implantadas o electrodos de radiofrecuencia.

[0129] El órgano o una extremidad de un paciente se calienta para una terapia regional, lo que se logra utilizando dispositivos que producen alta energía, tales como imanes. Alternativamente, parte de la sangre del paciente puede extraerse y calentarse antes de perfundirse en un área que se calentará internamente. El calentamiento de todo el cuerpo también se puede implementar en los casos en que el cáncer se haya extendido por todo el cuerpo. Para este fin se pueden utilizar mantas de agua tibia, cera caliente, bobinas inductivas y cámaras térmicas.

[0130] La terapia hormonal también se puede usar junto con la presente invención o en combinación con cualquier otra terapia contra el cáncer descrita previamente. El uso de hormonas puede emplearse en el tratamiento de ciertos cánceres, como el de mama, próstata, ovario o cuello uterino, para reducir el nivel o bloquear los efectos de ciertas hormonas como la testosterona o el estrógeno.

B. Composiciones y formulaciones

[0131] El virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se administra para tratar el cáncer y/o directamente a las células tumorales y, en consecuencia, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se formulan para la ruta de administración deseada (por ejemplo, mediante inyección intratumoral, por vía intravenosa, intraarterial, y/o administración intraperitoneal). En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se formula para administración por vía de administración intratumoral, intravenosa, intraarterial y/o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se formula para administración mediante administración intratumoral. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se formula para administración

mediante administración intravenosa. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se formula para administración intraarterial. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se formula para administración mediante administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, el virus vaccinia oncolítico replicativo de la combinación farmacéutica se formula para administración únicamente mediante administración intratumoral.

[0132] La inyección intratumoral del virus vaccinia oncolítico puede realizarse mediante jeringa o cualquier otro procedimiento utilizado para la inyección de una solución, siempre que la construcción de expresión pueda pasar a través del calibre particular de aguja requerido para la inyección. Recientemente se ha descrito un nuevo sistema de inyección sin aguja (Patente de EE.UU. 5.846.233) que tiene una boquilla que define una cámara de ampolla para contener la solución y un dispositivo de energía para empujar la solución fuera de la boquilla hasta el lugar de administración. También se ha descrito un sistema de jeringa para uso en terapia génica que permite múltiples inyecciones de cantidades predeterminadas de una solución precisamente a cualquier profundidad (Patente de EE.UU. 5.846.225).

[0133] Se pueden preparar soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de EE.UU. 5.466.468).

[0134] En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los 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 se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0135] Para la inyección intratumoral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se puede tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se puede volver isotónico con suficiente solución salina o glucosa. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarse a 1000 ml de líquido de hipodermoclinis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1035-1038). y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosis dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para cada sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo exigen los estándares de la Oficina de Biología de la FDA.

[1036] Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.

[0137] Las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en forma neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (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 derivar 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. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación posológica y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

[0138] Como se usa en el presente documento, "portador" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de

dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios a las composiciones.

[0139] La frase "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se comprende bien en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

[0140] Se evaluó la capacidad del tratamiento combinado con virus vaccinia oncolítico e inhibidor(es) de punto de control para hacer retroceder tumores en el modelo de ratón singénico de carcinoma de células renales metastásico (Renca). El patrón de crecimiento de este tumor imita con precisión el del carcinoma de células renales en adultos humanos, particularmente en lo que respecta a las metástasis espontáneas en el pulmón y el hígado. Este modelo de Renca es hipervascular, resistente a la inmunoterapia anti-PD-1 y responde al sistema inmunológico. Dado que la infección es independiente del tejido de origen, este modelo de Renca es relevante para todos los cánceres.

Materiales y procedimientos

[0141] Ratones y líneas celulares: Se alojaron ratones macho BALB/c libres de patógenos específicos bajo jaulas con tapa de filtro a las que se les suministró agua y alimento con un ciclo inverso de 12 horas de día y de noche. Todos los ratones fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de una combinación de anestésicos (80 mg/kg de ketamina y 12 mg/kg de xilazina) antes de ser sacrificados. La línea celular de carcinoma renal Renca y la línea celular de cáncer de colon CT26 se obtuvieron de ATCC y se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10 % de FBS y 1 % de antibióticos penicilina-estreptomina a 37°C con 5 % de CO₂.

Amplificación de virus –

[0142] mJX594 es un virus vaccinia de reserva occidental diseñado para contener una alteración del gen viral de la timidina quinasa y la inserción de GMCSF-GFP murino (mGMSCF-GFP) bajo el control del promotor tardío temprano sintético. Se infectó un nivel de confluencia del 100 % de células HeLaS3 con mJX594 con una multiplicidad de infección (moi) = 1-3 y se colocaron en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 1,5 horas, seguido de la aplicación de DMEM que contenía FBS al 2,5 % y se incubó durante 48 a 72 minutos. horas. Las células se recogieron por centrifugación y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en Tris-Cl 10 mM, pH 9,0, se homogeneizaron en un homogeneizador Dounce y se centrifugaron. El sedimento celular se resuspendió en Tris-Cl 10 mM, pH 9,0, se centrifugó y el sobrenadante se combinó con el primer sobrenadante. El lisado sonificado se colocó encima de sacarosa al 36 % y se centrifugó a 32.900 xg durante 80 minutos a 4°C. A continuación, el sedimento se resuspendió en Tris-Cl 10 mM, pH 9,0, y se almacenó por debajo de -60°C.

Inhibidores de ICI (también denominados en este documento inhibidores de puntos de control inmunitario) -

[0143] Los anticuerpos contra CTLA-4 y PD-1 se adquirieron de BioXcell. El anticuerpo monoclonal 9D9 reacciona con CTLA-4 de ratón. Isotipo: IgG2b de ratón. El anticuerpo monoclonal J43 reacciona con PD-1 de ratón. Isotipo: IgG de hámster armenio.

Modelo tumoral y programa de tratamiento -

[0144] Para generar un modelo de tumor renal clínicamente relevante, se inyectaron por vía subcutánea suspensiones de células tumorales de Renca (cáncer de riñón, singénicas) (5 x 10⁵ células en 100 µl) en el flanco dorsal derecho de animales inmunes de 8 a 10 semanas de edad. ratones macho Balb/c competentes. Cuando el volumen promedio del tumor superó los 50 mm³, los ratones se aleatorizaron y recibieron los regímenes de tratamiento que se describen a continuación.

[0145] El tamaño del tumor se midió cada 3 días en todos los grupos con un calibrador digital. El volumen del tumor se calculó según la fórmula $0,5 \times A \times B^2$, donde A es el diámetro más grande de un tumor y B es su diámetro perpendicular. Días después, los ratones fueron sacrificados mediante CO₂ y los tejidos se recogieron para su posterior análisis.

Análisis Histológicos -

[0146] Para los estudios de inmunofluorescencia, las muestras se fijaron en PFA al 1 %, se deshidrataron en solución de sacarosa al 20 % durante la noche y se incluyeron en medio de congelación de tejidos (Leica). Los bloques congelados se cortaron en secciones de 50 µm. Las muestras se bloquearon con suero de cabra (o burro) al 5 % en PBST (Triton X-100 al 0,03 % en PBS) y a continuación se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente (RT) con los siguientes anticuerpos primarios: anti-GFP (conejo, Millipore), anti-CD31 (hámster, clon 2H8, Millipore), anti-VEGFR2 (conejo, señalización celular), anti-CD8a (rata, BD pharmingen), anti-CD11b (rata, BD pharmingen), anti-FoxP3 (rata, eBioscience), anti-caspasa3 (conejo, sistemas de I+D), anti-Vaccinia (conejo, Abcam) y anti-PD-L1 (rata, eBioscience). Después de varios lavados, las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios: IgG anti-hámster conjugada con FITC, Cy3 o Cy5 (Jackson ImmunoResearch), IgG anti-conejo conjugada con FITC o Cy3 (Jackson ImmunoResearch), IgG anti-rata conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch) o IgG anti-ratón conjugada con Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen). A continuación, las muestras se montaron con medio de montaje fluorescente (DAKO) y se adquirieron imágenes inmunofluorescentes utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM880 (Carl Zeiss).

Análisis Morfométricos -

[0147] La medición de la densidad de los vasos sanguíneos, las células T CD8 o el área apoptótica se realizó con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se midió el área de CD31, CD8 o caspasa3+ por áreas aleatorias de 0,42 mm² en las regiones peritumorales e intratumorales. Todas las mediciones se realizaron en al menos cinco campos diferentes por ratón.

Citometría de flujo -

[0148] Los tejidos tumorales recogidos se trituraron y se incubaron en tampón FACS (FBS al 1 % en PBS) que contenía collagenasa D (Roche) y ADNasa I (Roche) a 37 °C durante 1-2 horas en un baño de agua con agitación. Las células digeridas se filtraron con una malla de nailon de 40 µm para eliminar los grupos de células. Los glóbulos rojos se eliminaron incubando la suspensión celular en tampón de lisis ACK durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células individuales resultantes se incubaron durante 30 minutos con los siguientes anticuerpos en tampón FACS: CD45 anti-ratón conjugado con PerCP-cy5.5 (rata, eBioscience), CD3e anti-ratón conjugado con APC (hámster, eBioscience), conjugado con FITC. CD4 anti-ratón (rata, eBioscience), anti-CD8a conjugado con PE (rata, eBioscience), CD11b anti-ratón conjugado con FITC (rata, eBioscience), Gr1 anti-ratón conjugado con APC (rata, eBioscience) y APC -CD11c anti-ratón conjugado (hámster, eBioscience).

Análisis estadístico -

[0149] Los valores se presentan como media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas entre medias se determinaron mediante la prueba t de Student no apareada o el análisis de varianza unidireccional seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls. La significancia estadística se estableció en p<0,05.

Resultados**Efectos antitumorales de terapia combinada del virus vaccinia + anti-PD-1**

[0150] Para la terapia combinada con anti-PD-1 y mJX-594, se inyectaron 5 x 10⁵ células tumorales de Renca en el flanco dorsal derecho de ratones BALB/c y se inició el tratamiento (Día 0) cuando el tamaño del tumor alcanzó 50 - 100 mm³. Los ratones se asignaron al azar a cuatro grupos de tratamiento: (i) Grupo de control: se inyectó PBS por vía intratumoral cada tres días; (ii) grupo de monoterapia con mJX-594: se inyectaron 1 x 10⁷ ufp de mJX-594 por vía intratumoral cada 2 días y 3 veces en total los días 0, 2 y 4; (iii) grupo de monoterapia anti-PD-1: se inyectaron 10 mg/kg de anticuerpo por vía intraperitoneal cada 3 días y 4 veces en total los días 0, 3, 6 y 9; (iv) grupo de combinación mJX-594 + anti-PD-1: mJX-594 y anti-PD-1 se administraron simultáneamente, con mJX-594 inyectado intratumoralmente cada dos días los días 0, 2 y 4 para un total de tres inyecciones y anti-PD-1 administrado por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 y 9 para un total de cinco inyecciones (**ver Figura 1A**).

[0151] Se observó supresión del crecimiento tumoral en el grupo de monoterapia con mJX-594 y en el grupo de combinación mJX-594/anti-PD-1 ("grupo de combinación") en comparación con el control (**ver Figura 2A**). La supresión del crecimiento tumoral fue más significativa en el grupo de combinación (consulte la **Figura 2A**, compare "PD1+mJX594" con "mJX594" y "PD1"). No se observó supresión del crecimiento tumoral en el grupo de monoterapia anti-PD-1 (**Figura 2A**, compare "PD1" con "Control"). Se demostró que el peso del tumor disminuyó en el grupo de monoterapia con mJX-594 (consulte la **Figura 2B**). Se observó una disminución significativa en el peso del tumor en el grupo de combinación, que fue sustancialmente mayor que la reducción observada en el grupo de monoterapia con mJX-594 (**ver Figura 2B**). Por tanto, la administración simultánea de mJX-594 y anti-PD-1 dio lugar a una marcada disminución del peso y volumen del tumor en comparación con cualquiera de las monoterapias.

[0152] La infiltración de células T CD8 tanto en regiones peritumorales como intratumorales aumentó en los grupos de monoterapia con PD-1, monoterapia con mJX-594 y combinación simultánea. (Ver Figura 3A). Mientras que la infiltración de células T CD8 aumentó en la región periférica en lugar de en la región central en el grupo de monoterapia anti-PD-1, el grupo mJX-594 mostró un mayor número de infiltración de células T CD8 tanto en la región central como en la periférica. (Ver Figura 3B). La administración simultánea de mJX-594 y anticuerpo anti-PD-1 aumentó notablemente la infiltración intratumoral de células T en comparación con el control y con la monoterapia con cualquiera de los agentes solos, según lo medido mediante tinción CD8+ peritumoral e intratumoral. (Ver Figura 3B). También se observó una disminución de la densidad vascular en los grupos de tratamiento en comparación con el control (Ver Figura 3B).

[0153] El nivel de expresión de PD-L1 en la región tumoral periférica y central aumentó en los grupos de monoterapia anti-PD-1, monoterapia con mJX-594 y combinación simultánea en comparación con el control. (Ver Figura 4A). Mientras que el grupo de monoterapia anti-PD-1 mostró un aumento en el nivel de expresión de PD-L1 en la región periférica en lugar de en la región central, el grupo de monoterapia con mJX-594 mostró un aumento similar en el nivel de expresión de PD-L1 tanto en las regiones periféricas como en las centrales (consulte la Figura 4A). La administración simultánea de JX-595 y anticuerpo anti-PD-1 dio como resultado un aumento en la expresión intratumoral de PD-L1 en comparación con la monoterapia con cualquiera de los agentes solos (consulte la Figura 4A). Los tumores de Renca son resistentes a la inmunoterapia anti-PD1. Un aumento en la expresión de PD-L1 en el tumor en el grupo de tratamiento combinado simultánea refleja la sensibilización de estos tumores a la terapia anti-PD-1 concomitante con la infiltración de células T CD8+ en el tumor y es un indicador de la eficacia del tratamiento. Estos patrones sugieren que, al inicio, las células T están inmunosuprimidas y no pueden infiltrarse en el microentorno del tumor. mJX-594 provoca inflamación y vasodilatación, lo que permite a las células T ejercer efectos antitumorales. La administración simultánea de mJX-594 y anticuerpo anti-PD-1 conduce a la activación e infiltración de células T en regiones tumorales centrales.

[0154] Se observó que la apoptosis intratumoral aumentaba en los grupos de monoterapia con PD-1, monoterapia con mJX-594 y combinación simultánea en comparación con el control, medido mediante tinción con caspasa3 (Ver Figura 4B). Se confirmó un marcado aumento en la apoptosis intratumoral en el grupo de combinación simultánea en comparación con cualquiera de los grupos de monoterapia (consulte la Figura 4B). Los efectos antivascuales (que se muestran en la Figura 3B) combinados con la apoptosis en el grupo de combinación simultánea sugieren una necrosis tumoral significativa en el grupo de combinación simultánea.

[0155] Se observó un cambio en el microentorno inmunológico después de mJX-594 y anticuerpo anti-PD-1 simultáneas en comparación con el control y con la monoterapia con cualquiera de los agentes, medido por CD4 y CD 11b. (Ver Figura 5A). Es importante destacar que la infiltración tumoral de células T CD8 fue mayor en el grupo de combinación simultánea. El agotamiento de las células CD8+ utilizando el anticuerpo anti-CD8 dio como resultado una disminución de la inhibición del crecimiento tumoral, lo que confirma el papel de estas células en el efecto antitumoral (datos no mostrados). Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) aumentaron en mJX-594 y en los grupos de combinación simultáneas en comparación con el control. Tradicionalmente, las células CD1 1b+Gr1+ se han considerado simplemente células inmunosupresoras; sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que estas células no pueden definirse de manera tan simple (compare el aumento relativo de MDSC observado en el grupo de combinación simultánea con α PD1 con la disminución de MDSC observada en el grupo de combinación simultánea con α CTLA4 (Figs. 10A-10B)).

[0156] Se evaluó el efecto de la coadministración de mJX-594 y PD-1 $\pm$ CTLA4 de forma secuencial versus simultánea sobre el crecimiento tumoral. Se inyectaron por vía subcutánea 5×10^5 células Renca (cáncer de riñón, singénicas) en el flanco derecho de ratones inmunocompetentes BALB/c de 8 semanas de edad. El tratamiento se inició (Día 0) cuando el tamaño del tumor alcanzó 50 mm³.

[0157] Los ratones se separaron en cuatro grupos de tratamiento: (i) Grupo de control: se inyectó PBS los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15; (ii) grupo de combinación secuencial mJX-594 + anti-PD-1: se inyectó mJX-594 por vía intratumoral los días 0, 3, 6 y 9 y anti-PD-1 se inyectó por vía intraperitoneal los días 6, 9, 12 y 15 (iii) grupo de combinación simultánea de mJX-594 y anti-PD-1: se administraron mJX-594 y anti-PD-1 simultáneamente, con mJX-594 inyectado por vía intratumoral los días 0, 3, 6 y 9 y anti-PD-1 por vía intraperitoneal administrado los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15; (iv) grupo de combinación triple simultánea mJX-594 + anti-PD-1 + anti-CTLA4: se inyectó mJX-594 por vía intratumoral los días 0, 3, 6 y 9; Se inyectaron intraperitonealmente anti-PD-1 y CTLA4 los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 (consulte la Figura 6).

[0158] El crecimiento tumoral se suprimió en los grupos de administración secuencial y simultánea de mJX-594 + anti-PD-1 así como en el grupo de administración simultánea triple de mJX-594 + anti-PD-1 + anti-CTLA4 en comparación con el control (Ver Figura 7). Sorprendentemente, la administración simultánea de mJX-594 y anti-PD-1 dio como resultado una supresión (retraso) más significativa del crecimiento tumoral que la administración secuencial de estos agentes (consulte la Figura 7). Se observó un mayor retraso en el crecimiento del tumor en el grupo de administración triple simultánea ("Combi (mJX-594+ α PD1 + α CTLA4") (Ver Figura 7).

[0159] Cuando se comparó el tamaño del tumor de cada ratón entre los grupos de tratamiento, se confirmó la regresión del tumor en los grupos de combinación en comparación con el control. Mientras que la regresión del tumor se observó

desde el día 12 en el grupo secuencial, los tumores tienden a retroceder desde el día 6 en los grupos de combinación simultánea y triple simultánea.

[0160] Estos resultados sugieren sorprendentemente que el régimen de administración y potencialmente la vía de administración pueden afectar significativamente los efectos antitumorales de la terapia combinada. En particular, el virus vaccinia tiene sinergia con el inhibidor de puntos de control (anti-PD-1, CTLA-4) para inducir una fuerte reacción inmune antitumoral si el virus vaccinia y el inhibidor de puntos de control se administran simultáneamente. En algunos casos, hubo una fuerte reacción inmune antitumoral cuando el virus vaccinia se administró por vía intratumoral como parte de la administración simultánea. Los efectos antitumorales sinérgicos observados para la administración simultánea de virus vaccinia e inhibidor de puntos de control son particularmente sorprendentes porque se entiende en la técnica que los inhibidores de puntos de control inmunitarios inhiben la replicación de virus oncolíticos tales como vaccinia (Rojas et al., J. Immunol., 192 (1 Suplemento): 142.3 (2014)).

Virus vaccinia + anti-CTLA4

[0161] Se inyectaron subcutáneamente 5×10^5 células Renca (cáncer de riñón) en el flanco derecho de ratones inmunocompetentes BALB/c de 8 semanas de edad. El tratamiento se inició (día 0) cuando el tamaño del tumor alcanzó 50-100 mm³.

[0162] Los ratones se asignaron aleatoriamente a cinco grupos de tratamiento: (i) Grupo de control: se inyectó PBS por vía intratumoral los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15; (ii) grupo de monoterapia con mJX-594: se inyectaron intratumoralmente 1×10^7 ufp de mJX-594 los días 0, 3, 6 y 9; (iii) grupo de monoterapia anti-CTLA4: se inyectaron 4 mg/kg de anticuerpo por vía intraperitoneal los días 0, 3, 6, 9, 12, 15; (iv) grupo de combinación secuencial mJX-594 + anti-CTLA4: mJX-594 y anti-CTLA4 se administraron secuencialmente, con mJX-594 inyectado intratumoralmente los días 0, 3, 6 y 9 y anti-CTLA4 administrado intraperitonealmente los días 6, 9, 12 y 15; (v) grupo de combinación simultánea de mJX-594 y anti-CTLA4: mJX-594 y anti-CTLA4 se administraron secuencialmente, con mJX-594 inyectado intratumoralmente los días 0, 3, 6 y 9 y anti-CTLA4 inyectado intraperitonealmente los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 (**Ver Figura 8**).

[0163] El tamaño de los tumores se midió cada 3 días en todos los grupos. Los ratones se sacrificaron cuando se realizó la observación (día 16) mediante CO₂ y se tomó el tumor y se sometió a análisis de citometría de flujo (linfocitos infiltrantes de tumores CD4+ y CD8+ (TIL), Gr1+/CD11b+).

[0164] Se confirmó que el crecimiento tumoral se suprimió en todos los grupos de tratamiento en comparación con el control. (**Ver Figura 9**). Se observó una supresión significativamente mayor del crecimiento tumoral en los grupos de tratamiento combinado, observándose la mayor supresión del crecimiento tumoral en el grupo de administración simultánea (consulte la **Figura 9**).

[0165] Cuando se comparó el tamaño del tumor de cada ratón entre los grupos de tratamiento, se confirmó la regresión del tumor en los grupos de combinación en comparación con los grupos de monoterapia y control. Se observó una mayor infiltración de células T CD8 en todos los grupos de tratamiento en comparación con el control. (**Ver Figura 10A**). Mientras que el nivel de MDSC aumentó en el grupo de monoterapia con mJX-594 en comparación con el control, no se observó ningún cambio significativo en el grupo de tratamiento de combinación secuencial y se observó una disminución en el nivel de MDSC en el grupo de tratamiento de combinación simultánea (consulte la **Figura 10B**).

Administración simultánea de JX929 e inhibidores de puntos de control inmunitario

[0166] Se probaron los efectos antitumorales en el modelo de Renca de ratón descrito anteriormente para JX929 administrado IT (6×10^7 ufp) simultáneamente con inhibidor del punto de control de PD-1 administrado por vía intraperitoneal. JX929 es una cepa de virus vaccinia de reserva occidental con alteraciones en los genes virales TK y VGF (fenotipo TK⁻/VGF⁻) y no expresa GM-CSF.

Líneas celulares –

[0167] Las células RENCA murinas (ATCC) se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, penicilina-estreptomycin al 1 % y se mantuvieron a 37 °C con CO₂ al 5 %.

Estudios In Vivo –

Se inyectaron células RENCA (2×10^6 células) en 100 µl de PBS a ratones BALB/c hembra de ocho semanas de edad en la subcápsula del riñón izquierdo. El día 10 después de la implantación, los ratones que albergaban tumores de Renca (50 mm³ -100 mm³ como se visualiza con el sistema de imágenes in vivo IVIS[®] Spectrum) se trataron por vía intraperitoneal (ip) con (i) PBS (control) (ii) virus vaccinia. (JX-929) en monoterapia (6×10^7 PFU los días 10, 11 y 12 después de la implantación para un total de 3 dosis) (iii) monoterapia anti-PD1 (BioXcell, West Lebanon, NH, 100 µl) (días 10, 11 y 12 postimplantación para un total de 3 dosis) o (iv) tratamiento simultáneo con JX929 + anti-PD1 (cada uno administrado los días 10, 11 y 12 postimplantación, con JX-929 administrado por la mañana e ICI por la

mañana), tarde del mismo día con un intervalo de 9 horas) según el régimen mostrado en la **Figura 1B**.

[0169] Los ratones se sacrificaron 2 días después del tratamiento final para análisis histológicos y de citometría de flujo adicionales.

Citometría de flujo -

[0170] Se recogieron muestras de sangre periférica y se lisaron glóbulos rojos con tampón de lisis RBC. Las células se lavaron en PBS que contenía FBS al 1 % y a continuación se tiñeron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD8, de conejo anti-CD4 y de conejo anti-CD3 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y a continuación se incubaron con anticuerpos anti-ratón de cabra conjugados con FITC o anti-ratón de cabra conjugados con APC (Santa Cruz Biotechnology). Para cada muestra, se analizaron 10.000 células utilizando el instrumento FACS Calibur (BD biosciences, CA, EE. UU.).

Análisis Histológico -

[0171] Se sacrificaron los ratones y se obtuvieron órganos vitales, incluidos riñones y pulmones portadores de tumores, que se fijaron con formalina castrada al 10 % (BBC Biochemical, WA, EE. UU.). Los tejidos se incluyeron en parafina y las secciones (4 µm de grosor) se tiñeron usando hematoxilina y eosina para el análisis histológico básico. Para la inmunofluorescencia y la inmunohistoquímica, las secciones se tiñeron mediante el procedimiento estándar utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón específico para CD8 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.). A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con FITC (Santa Cruz Biotechnology) para inmunofluorescencia, o con el kit Vectastain® Elite ABC-Peroxidase (Vector Laboratories, CA, EE. UU.) y se visualizaron mediante Vector SG (Vector Laboratories) para inmunohistoquímica. Se midieron y compararon el peso y el volumen de los tumores extraídos de cada grupo de tratamiento.

Ensayo ELISpot -

[0172] Las células secretoras de IFNγ se evaluaron utilizando el kit de IFNγ de ratón ELISpot (Mabtech, Cincinnati, OH) según el protocolo del fabricante. Los bazo se aislaron y prepararon como suspensiones unicelulares. Los esplenocitos se mezclaron con células tumorales RENCA o esplenocitos de ratones infectados con el virus Vaccinia en una proporción de 5:1 y se incubaron durante 24 horas a 37°C. La intensidad de puntos específicos se analizó utilizando el software ImageJ (NIH).

Análisis estadístico -

[0173] Todos los valores se presentaron como media ± desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó utilizando InStat 3 (GraphPad Software, CA, EE. UU.). Se analizaron comparaciones múltiples mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y una prueba de comparación pareada post-hoc de Bonferroni.

El tratamiento con mJX594 induce la expresión de proteínas de punto de control

[0174] A ratones Balb/c que portaban tumores de Renca superiores a 50 mm³ se les administraron cuatro dosis intratumorales de mJX594 (1 × 10⁷ en cada uno de los días 0, 3, 6 y 9) o control de PBS según el régimen de tratamiento mostrado en la **Figura 1C**.

[0175] El nivel de proteína de punto de control inmunitario en los tumores de los animales de control y tratados con mJX594 se midió el día 0 (antes del tratamiento) y el día 12 después del sacrificio. La Figura 13 ilustra los cambios en las proteínas de punto de control después del tratamiento en ratones tratados con mJX594 en relación con ratones de control. Como se muestra en la Figura 13, el tratamiento con mJX594 induce la expresión de las proteínas del punto de control, incluidas PD-1 (aumento de 4 veces), PD-L1, PD-L2, CTLA4 (aumento de más de 2 veces), LAG3, TIM3 (aumento de más de 3 veces) y TIGIT (aumento de más de 2 veces). El tratamiento con virus vaccinia oncolítico replicativo da como resultado cambios dinámicos en el microentorno inmunológico del tumor, incluidos aumentos significativos en las proteínas de punto de control PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM3 y TIGIT, sensibilizando así a los tumores al bloqueo de cada una de estas proteínas de punto de control con sus respectivos inhibidores de puntos de control. Los ensayos clínicos han demostrado que las células infiltrantes de tumores y la expresión de la proteína de punto de control (por ejemplo, PD-L1) son indicadores del potencial de tratamiento con inhibidores de puntos de control (por ejemplo, tratamiento anti-PD-L1), lo que respalda la eficacia de la terapia combinada descrita en este documento no solo en pacientes con tumores que expresan proteínas de punto de control particulares, sino también en pacientes con tumores que expresan niveles bajos (o no expresan) proteínas de punto de control particulares.

EJEMPLO 2**La remodelación del microentorno tumoral mediante el virus vaccinia oncolítico intratumoral mejora la eficacia del bloqueo de los puntos de control inmunitario****RESUMEN**

[0176] La inmunoterapia contra el cáncer es una modalidad de tratamiento potente y duradera, pero su beneficio clínico todavía no es universal. Aquí, empleamos mJX-594, un virus vaccinia oncolítico (VV) dirigido y armado con GM-CSF, como compañero de combinación para inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) en ratones con cáncer de riñón implantado, cáncer de colon y aquellos con cáncer de mama espontáneo. La inyección intratumoral de VV indujo una profunda remodelación del microentorno tumoral, transformando el tumor de un tumor no inflamado de células T a un tumor inflamado de células T con un mayor número y una función efectora mejorada de las células T CD8⁺. Además, la terapia combinada de VV e ICI fue capaz de inducir la regresión del tumor con una mejor supervivencia y un efecto antimetastático. Nuestros hallazgos indican que VV provoca una sólida inmunidad anticancerígena en combinación con ICI, superando la resistencia a la inmunoterapia.

INTRODUCCIÓN

[0177] La inmunoterapia contra el cáncer con inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) dirigidos a PD-1 o CTLA-4 ha demostrado una eficacia terapéutica potente y duradera y ha surgido como una nueva arma en la guerra contra el cáncer (Hegde et al., 2016; Topalian et al., 2015; Wolchok y Chan, 2014). Sin embargo, la eficacia clínica de los ICI se limita a tumores con un microentorno tumoral (TME) inflamado por células T (Gajewski, 2015; Topalian et al., 2016). En tumores poco inmunogénicos con pocos linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), el TME carece de firma de interferón tipo I y quimiocinas para el reclutamiento de células T (Gajewski et al., 2013). Además, las vasculaturas tumorales y los componentes estromales pueden representar una barrera contra el tráfico intratumoral de células T y sus funciones efectoras en las células tumorales (De Palma y Jain, 2017; Rivera y Bergers, 2015; Sharma et al., 2017). Por lo tanto, se requieren intervenciones terapéuticas adicionales para que estos tumores no inflamados por células T remodelen adecuadamente el TME para hacer que estos tumores sean más sensibles a los tratamientos con ICI.

[0178] Los virus oncolíticos (OV) se han propuesto como una nueva clase de terapia anticancerígena, y actualmente se están evaluando OV con diferentes esqueletos y transgenes en ensayos clínicos (Bell, 2014; Lichty et al., 2014). Aunque el éxito de los OV se evaluó inicialmente por su replicación más rápida y su capacidad oncolítica mejorada durante la última década, ahora están comenzando a ser reconocidos como agentes inmunoterapéuticos porque las respuestas más fuertes y duraderas después de la viroterapia oncolítica se combinaron con una inducción exitosa de inmunidad antitumoral con aumento de células T efectoras y de memoria específicas del tumor (Bell, 2014; Chiocca y Rabkin, 2014; Thorne, 2014). No obstante, debido a que la eficacia terapéutica de los OV se vio muy obstaculizada por el TME inmunosupresor, liberar los frenos del sistema inmunológico es fundamental para maximizar la eficacia inmunoterapéutica de los OV (Bell and Ilkow, 2017; Hou et al., 2016; Liu et al., 2017). Por lo tanto, la combinación de OV e ICI es una estrategia racional y atractiva para superar el TME inmunosupresor y poco inmunogénico.

[0179] JX-594 (pexastimogene devacirepvec, Pexa-vec) es un virus vaccinia oncolítico (VV) que está diseñado para expresar un transgén de activación inmune, GM-CSF, y tiene el gen viral de timidina quinasa alterado (Kirn y Thorne, 2009). JX-594 mostró una impresionante actividad anticancerígena con baja toxicidad en estudios preclínicos y clínicos y se convirtió en una de las plataformas OV más factibles y prometedoras en desarrollo clínico (Breitbach et al., 2011a; Cripe et al., 2015; Heo et al., 2013; Park et al., 2008). Además de su actividad oncolítica y de alteración vascular, se propone que JX-594 muestre un efecto de vacunación contra el cáncer in situ porque puede provocar una respuesta inmune adaptativa contra los antígenos tumorales para la alteración selectiva del tumor y la posterior liberación adicional de antígenos tumorales (Breitbach et al., 2011b; Breitbach et al., 2015a). Aunque JX-594 se encuentra ahora en un ensayo clínico aleatorizado de fase III en carcinoma hepatocelular avanzado (Abou-Alfa et al., 2016), muy pocos estudios caracterizaron sus funciones inmunomoduladoras en TME primario, así como en lesiones distantes después del tratamiento con JX-594 (Kim et al., 2018). Además, aún no se ha buscado ni verificado la combinación óptima de JX-594 con agentes inmunoterapéuticos, tales como ICI.

[0180] Aquí, analizamos exhaustivamente la remodelación dinámica de TME con la variante de ratón de JX-594 (mJX-594, WR.TK⁻ mGM-CSF) e investigamos su potencial inmunoterapéutico para proporcionar una estrategia combinatoria racional con ICI en modelos de tumores poco inmunogénicos.

RESULTADOS**mJX-594 convierte tumores inmunosupresores no inflamados en tumores inflamados**

[0181] Para determinar el potencial inmunomodulador del virus oncolítico mJX-594, examinamos los cambios temporales del microentorno tumoral en los tumores de Renca poco inmunogénicos después de una única inyección de mJX-594. El nivel de mJX-594 ya era alto el día 1, alcanzó su punto máximo el día 3 y casi indetectable el día 7 después de la inyección (**Figuras 33A y 33B**). Por el contrario, la vasculatura tumoral mostró la respuesta opuesta a los niveles virales; la densidad vascular del tumor se redujo notablemente entre el día 1 y el día 3 pero se recuperó el día 7 y posteriormente después de la inyección (**Figuras 33A y 33B**), lo que indica que mJX-594 induce una alteración vascular del tumor potente pero transitoria. Cabe destacar que la población de células T citotóxicas CD8⁺ dentro del

área intratumoral, que comprende el aspecto más crítico de la inmunidad anticancerígena, comenzó a aumentar sorprendentemente el día 5, alcanzó su punto máximo el día 7 y permaneció en una densidad alta 2 semanas después de la inyección (**Figuras 33A y 33B**), lo que demuestra claramente una conversión distinta y duradera de un tumor no inflamado en un tumor inflamado con células T mediante mJX-594. En comparación, las células dendríticas (DC) CD11c⁺ emergieron transitoriamente el día 3 y disminuyeron posteriormente (**Figuras 33A y 33B**). El nivel de expresión de PD-L1 fue mínimo el día 0 y se incrementó después del tratamiento con mJX-594 (**Figuras 1A y 1B**). Curiosamente, la regulación positiva temporal de PD-L1 sigue inmediatamente después de la afluencia masiva de TIL CD8⁺ (Figura 1C), lo que indica la activación de la vía de retroalimentación negativa que intenta suprimir la inmunidad mediada por células T. La mayoría de las células que expresaban PD-L1 eran células tumorales de citoqueratina⁺, y algunas células mieloides CD11b⁺ también expresaban PD-L1, mientras que las células T no (**Figura 1D**). Por lo tanto, mJX-594 es un potenciador de la inmunidad anticancerígena potente y duradero al reclutar células T CD8⁺ citotóxicas en los tumores fríos, así como un disruptor transitorio de la vasculatura tumoral.

[0182] Para dilucidar las vías inmunitarias del cáncer moduladas por mJX-594, analizamos exhaustivamente los cambios en los niveles de expresión de 750 genes relacionados con el sistema inmunitario después de la monoterapia con mJX-594 utilizando un panel PanCancer Immune Profiling. Los resultados mostraron diferencias prominentes en las firmas inmunes relacionadas con genes entre los tumores de control y los tratados con mJX-594 (**Figura 33E**). Aproximadamente 100 genes inmunomoduladores mostraron cambios estadísticamente significativos en sus niveles de expresión, incluidos aquellos implicados en la activación de la señalización de tipo IIFN, la maduración de DC y la activación de células T (**Figura 33F**). En particular, observamos expresiones generalmente más altas de moléculas de puntos de control inmunes inhibitoras (incluidas Pd-1, Pd-11, Ctla-4 y Lag-3) y agonistas (incluidas Icos, Gitr y Cd27) en TME en comparación con el control (**Figuras 33G**). Además, análisis adicionales del TME revelaron aumentos en los genes relacionados con la respuesta Th1 y Th2, lo que sugiere inmunomodulación por monoterapia con mJX-594 (**Figuras 33G**). También encontramos que varios genes implicados en TME y células mieloides aumentaron significativamente (**Figuras 33G**). En particular, los aumentos en las expresiones de Nos2 y Cd86 representan la polarización de las células mieloides a macrófagos M1. Estos resultados indican que mJX-594 provoca una activación inmunitaria a largo plazo a través de cambios dinámicos en el TME para remodelar tumores no inflamados en tumores inflamados por células T que pueden responder al bloqueo de los puntos de control inmunitario.

mJX-594 aumenta la infiltración intratumoral de células T CD8⁺ e induce la repolarización de células mieloides

[0183] El retraso en el crecimiento tumoral inducido por mJX-594 dependía de la dosis (**Figuras 34A y 34B**). Paralelamente, los aumentos inducidos por mJX-594 en la infiltración de células T CD8⁺ en regiones tanto peritumorales como intratumorales también fueron dependientes de la dosis (**Figuras 34C y 34D**). De hecho, el análisis de subconjunto por citometría de flujo del compartimento de células linfoides también reveló que los números absolutos aumentados inducidos por mJX-594 de células T CD8⁺ y CD4⁺ intratumorales dependían de la dosis (**Figura 34E y 34G**). Aunque el número de células T reguladoras CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ también aumentó después de la administración triple de mJX-594 (**Figura 34H**), la proporción de células T CD8⁺ con respecto a células T reguladoras fue 5,3 veces mayor en comparación con la del tratamiento de control. (**Figura 34I**), lo que implica un aumento general en la función efectora de las células T en TME mediante el tratamiento con mJX-594. Además, las expresiones de ICOS y granzima B (GzB), que son marcadores coestimuladores y de activación de células T, aumentaron en células T CD8⁺ después del tratamiento con mJX-594 (**Figura 34J**). Un análisis de subconjunto adicional del compartimento de células mieloides reveló que no hay cambios significativos en la fracción de células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en tumores tratados con tratamiento mJX-594 (**Figura 34K**). Sin embargo, la fracción de células mieloides monocíticas CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺ aumentó, mientras que la fracción de células mieloides granulocíticas CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int} se redujo, lo que indica la polarización de las células mieloides después de la administración de mJX-594 (**Figuras 34L y 34M**). Estos hallazgos demuestran que la administración repetida de mJX-594 mejoró la inmunidad anticancerígena, lo que resultó en una mayor infiltración de células T activadas y repolarización de células mieloides.

La inyección intratumoral de mJX-594 conduce a respuestas inmunes sistémicas y específicas del cáncer

[0184] Para determinar si la inyección local de mJX-594 podría inducir una respuesta inmune sistémica en tumores distantes no inyectados, administramos mJX-594 en el tumor del lado derecho después de la implantación de tumores de Renca en ambos flancos laterales. Este tratamiento suprimió el crecimiento de los tumores de Renca tanto derecho como izquierdo (lado opuesto, no inyectado) (**Figura 35A**). De acuerdo con la inhibición del crecimiento tumoral en los lados bilaterales, las infiltraciones de células T CD8⁺ en regiones intratumorales aumentaron 7,9 y 5,5 veces en los tumores de Renca derecho e izquierdo (**Figuras 35B y 35C**), lo que sugiere que la viroterapia con mJX-594 local es capaz de activar fuertemente la inmunidad anticancerígena sistémica.

[0185] A continuación, para excluir la posibilidad de propagación viral directa a tumores distantes a través de la circulación sistémica después de la viroterapia local, examinamos la replicación viral en los tumores de Renca izquierdos no inyectados y no encontramos virus vaccinia detectable en los tumores izquierdos (**Figura 41**), lo que indica que la actividad anticancerígena de mJX-594 estaba mediada inmunitariamente y no era el resultado de la propagación viral sistémica.

[0186] Para evaluar si la respuesta inmune sistémica observada era específica del tumor, realizamos un experimento similar usando ratones a los que se les implantaron tumores Renca en el flanco derecho y tumores CT26 en el flanco izquierdo. El tratamiento intratumoral del tumor de Renca derecho con mJX-594 disminuyó notablemente el crecimiento del tumor inyectado, mientras que el crecimiento del tumor CT26 izquierdo no tratado no se vio afectado (**Figura 35D**). Los análisis microscópicos proporcionaron resultados consistentes en que las células T CD8⁺ se acumularon en los tumores Renca pero no en CT26 (**Figuras 35E y 35F**), lo que indica que la viroterapia con mJX-594 indujo una respuesta de células T CD8⁺ específica del tumor. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tratamiento local con mJX-594 puede provocar inmunidad anticancerígena sistémica, con infiltración de linfocitos específica del tumor incluso en tumores distantes.

La inmunidad anticancerígena desempeña un papel fundamental en la eficacia terapéutica general de JX.

[0187] Para determinar qué componentes del sistema inmunitario eran responsables de la eficacia terapéutica de mJX-594, examinamos su efecto sobre tumores en ratones tratados con anticuerpos neutralizantes contra CD8, CD4 o GM-CSF (**Figura 36A**). Es de destacar que el agotamiento de las células T CD8⁺ o CD4⁺ anuló la inhibición efectiva del crecimiento tumoral mediante la monoterapia con mJX-594 (**Figuras 36B y 36C**), enfatizando la importancia del mecanismo mediado por el sistema inmunitario en lugar de la oncólisis directa, en la inhibición tumoral inducida por mJX-594. Curiosamente, el agotamiento de las células T CD4⁺ en el momento de la inyección de mJX-594 disminuyó de manera intrigante la infiltración intratumoral de las células T CD8⁺ (**Figura 36D**), lo que indica que las células T CD4⁺ están implicadas en la activación y el reclutamiento de las células T CD8⁺ en TME. Sin embargo, el agotamiento de las células T CD8⁺ no alteró significativamente la infiltración de las células T CD4⁺ (**Figura 36E**), lo que indica que las células T CD8⁺ no afectaron a las células T CD4⁺ en TME. Estos datos muestran que el tratamiento intratumoral de mJX-594 induce el cebado de las células T CD8⁺ y CD4⁺, que pueden interactuar entre sí para mediar la inmunidad anticancerígena. La viroterapia anterior basada en el virus del herpes y vaccinia utilizó GM-CSF como un transgén de activación inmune, que recluta y activa células presentadoras de antígenos (APC) que posteriormente desencadenan la respuesta de las células T. Sin embargo, el uso de GM-CSF sigue siendo controvertido debido a sus posibles funciones inmunosupresoras en la progresión tumoral, tal como la inducción de la proliferación de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) (Thorne, 2014). En consecuencia, exploramos si se requiere GM-CSF para el efecto terapéutico de mJX-594. Curiosamente, el agotamiento de GM-CSF anuló el efecto antitumoral de mJX-594 y redujo los niveles de células T CD8⁺ y CD4⁺, lo que sugiere que GM-CSF es importante para la eficacia inmunoterapéutica de mJX-594 (**Figuras 36C-36E**). Por tanto, tanto las células T CD8⁺ como las CD4⁺ son mediadores indispensables del efecto anticancerígeno de mJX-594, y el GM-CSF podría proporcionar un beneficio inmunoterapéutico.

La combinación de mJX-594 con el bloqueo del punto de control inmunitario provoca un efecto anticancerígeno sinérgico con una mayor infiltración de linfocitos T en el tumor

[0188] Para superar la resistencia a la monoterapia con ICI, evaluamos el beneficio de combinar mJX-594 con ICI. La combinación de αPD-1 y mJX-594 redujo el crecimiento tumoral en un 70 %, mientras que cada monoterapia con αPD-1 y mJX-594 retrasó el crecimiento tumoral en un 22,8 % y un 44 % a los 12 días después de los tratamientos (**Figuras 37A y 37B**). En apoyo de estos hallazgos, los análisis microscópicos identificaron un aumento notable en el reclutamiento de células T CD8⁺ en regiones peritumorales (18,8 veces) e intratumorales (21,4 veces) de tumores tratados con terapia combinada en comparación con el control (**Figuras 37C y 37D**). Los vasos sanguíneos del tumor CD31⁺ se redujeron significativamente en estas regiones (1,8 veces y 2,6 veces, respectivamente; **Figuras 37C y 37D**). Además, se observó una apoptosis tumoral más extensa en los tumores tratados con terapia combinada en comparación con el control (**Figuras 5C y 5D**). Aunque la expresión de PD-L1 fue mínima en los tumores de control, está muy regulada positivamente después del tratamiento con mJX-594 (**Figuras 37C y 37D**). Este hallazgo sugiere que la expresión de PD-L1 inducida en TME es un mecanismo adaptativo de retroalimentación negativa que amortigua la inmunidad anticancerígena después de la viroterapia oncolítica, por lo que proporciona una base racional para la terapia combinada de mJX-594 y el bloqueo de PD-1/PD-L1 para potenciar el efecto inmunoterapéutico de mJX-594 (**Figura 37E**).

[0189] En general, estos resultados sugieren que la terapia de combinación puede superar la resistencia a la monoterapia con mJX594 o αPD-1 a través de una inmunidad anticancerígena mejorada al aumentar la infiltración de células T CD8⁺.

[0190] De manera similar, el tratamiento combinado con αCTLA-4 y mJX-594 también fue sinérgico. Aunque el crecimiento tumoral fue inhibido modestamente por la monoterapia con mJX-594 (42,0 %) o αCTLA-4 (20,0 %), se observó una inhibición más fuerte (57,6 %) con la terapia combinada (**Figuras 42A y 42B**). Además, después de la terapia de combinación, se observó una mayor acumulación de células T CD8⁺ en las regiones periféricas (aumento de 27,0 veces) y central (aumento de 26,4 veces) de los tumores en comparación con los controles (**Figuras 42C y 42D**). Junto con niveles aumentados de células T CD8⁺ intratumorales, los vasos CD31⁺ también estaban marcadamente alterados tanto en las regiones periféricas como en las centrales en comparación con el control (reducciones de 2,1 veces y 3,8 veces, respectivamente; **Figuras 42C y 42E**). Además, la citometría de flujo reveló que la infiltración intratumoral de células T CD8⁺ y CD4⁺ también aumentó con la terapia combinada de mJX-594 y αCTLA-4 (**Figuras 42F-42H**).

[0191] En conjunto, estos resultados indican que la terapia combinada usando mJX-594 e ICI puede superar la resistencia a la inmunoterapia en TME inmunosupresores, lo que da como resultado efectos anticancerígenos sinérgicos.

5 **La eficacia de la inmunoterapia combinada con mJX-594 intratumoral e ICI no se ve afectada en gran medida por el programa de tratamiento.**

[0192] Debido a que ICI pueden afectar negativamente a la replicación viral y conducir a una depuración prematura de OV, varios estudios exploraron esquemas óptimos de tratamiento usando combinaciones de viroterapia oncolítica sistémica e ICI, e informaron que algunos esquemas combinados podrían inducir a antagonizar la eficacia terapéutica (Liu et al., 2017; Rojas et al., 2015). Sin embargo, no se han descrito estudios similares que examinen la viroterapia oncolítica local. Para establecer el programa de combinación óptimo para mJX-594 intratumoral e ICI, comparamos lo siguiente: (1) administración simultánea de mJX-594 e ICI (programa I); (2) inicio de ICI 3 días después de la administración de mJX-594 (programa II); y (3) administración de mJX-594 3 días después del inicio de ICI (programa III; **Figura 38A**). Todos los esquemas de combinación retrasaron el crecimiento del tumor en aproximadamente un 40 % (**Figuras 38B y 38C**). Asimismo, los niveles de células T CD8⁺ y CD4⁺ infiltrantes de tumores aumentaron >8 veces y >4,0 veces, respectivamente, lo que también mostró niveles notablemente aumentados de expresión de ICOS y GzB en células T CD8⁺ (**Figuras 38D-38F**).

[0193] De manera similar a la terapia de combinación con mJX-594 y αPD-1, la combinación de mJX-594 y αCTLA-4 inhibió el crecimiento tumoral en ~40 % independientemente del programa de tratamiento (**Figuras 43A y 43B**). Además, la infiltración intratumoral de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ (aumentos >7 veces y >7 veces, respectivamente), así como la expresión de GzB e ICOS en células T CD8⁺, fueron mayores independientemente del programa de tratamiento (**Figuras 43C- 43E**).

[0194] En conjunto, la terapia combinada con inyección intratumoral de mJX-594 y bloqueo del punto de control inmunitario sistémico condujo a una respuesta inmune anticancerígena eficaz independientemente del programa de tratamiento, lo que sugiere que la administración intratumoral de mJX-594 no se ve afectada significativamente por el programa variable de administración de ICI.

30 **La triple combinación de mJX-594, αPD1 y αCTLA4 puede inducir la regresión tumoral completa y proporciona un beneficio de supervivencia a largo plazo en el cáncer de riñón implantado**

[0195] Como las combinaciones duales de mJX-594 e ICI no indujeron la regresión tumoral completa, exploramos la terapia de combinación triple usando mJX-594, αPD-1 y αCTLA-4. Mientras que la combinación dual de αPD-1 y αCTLA-4 retrasó el crecimiento tumoral en un 14,5 %, y la monoterapia con mJX-594 inhibió el crecimiento tumoral en un 36,9 %, la combinación triple inhibió el crecimiento tumoral en un 76,5 % (**Figuras 39A y 39B**). En particular, unos pocos (~40 %) de este grupo de combinación triple dieron como resultado una regresión tumoral completa, que no se observó en ningún otro grupo (**Figura 39C**).

[0196] Para confirmar si los potentes efectos anticancerígenos inducidos por la terapia de combinación triple podrían traducirse en un beneficio de supervivencia a largo plazo, realizamos análisis de supervivencia de ratones portadores de tumores. De hecho, los ratones tratados con terapia de combinación triple mostraron un beneficio de supervivencia notable en comparación con los otros tratamientos (**Figura 39D**). Además, los ratones con regresión tumoral completa estuvieron libres de tumores durante más de 12 semanas después del final del tratamiento y estuvieron completamente protegidos contra la nueva exposición a células tumorales, lo que sugiere el establecimiento de una memoria inmune efectiva a largo plazo (**Figura 39E**).

[0197] Estos hallazgos demuestran que la inmunoterapia de combinación triple tiene el potencial de inducir la regresión tumoral completa y la supervivencia a largo plazo.

50 **La terapia de combinación triple mejora las respuestas inmunes contra el cáncer en un modelo de cáncer de mama espontáneo**

[0198] Para validar definitivamente la eficacia inmunoterapéutica a largo plazo de la terapia de combinación triple en tumores inmunorresistentes, empleamos el modelo de ratón transgénico *MMTV-PyMT*, que es un modelo de cáncer de mama espontáneo con resistencia intrínseca a la inmunoterapia contra el cáncer (Schmittnaegel et al., 2017). Después de 4 semanas de tratamiento, los ratones tratados con la combinación triple de mJX-594, αPD-1 y αCTLA-4 exhibieron una reducción significativa en la carga tumoral general en un 38,7 % y en el número de nódulos tumorales mamarios palpables en comparación con los ratones de control (**Figura 40A-40D**). Además, la terapia de combinación triple condujo a una reducción del 48,1 % en el tamaño promedio de cada nódulo tumoral y mejoró la supervivencia general en comparación con otros tratamientos (**Figura 40E-40F**). Los análisis histológicos (**Figura 40G**, ver leyenda para una explicación detallada) revelaron un carcinoma menos invasivo con márgenes tumorales bien conservados en el grupo de combinación triple, lo que indica que la combinación triple retrasa de manera eficaz la progresión y la invasión del tumor. Por otro lado, los tumores tratados con una combinación dual de αPD-1 y αCTLA-4 mostraron un fenotipo de carcinoma invasivo comparable al del grupo de control, que había invadido los tejidos

circundantes y formado láminas sólidas de células tumorales. En consecuencia, después de la terapia de combinación triple, el reclutamiento intratumoral de células T CD8⁺ aumentó notablemente > 50 veces en comparación con cualquier otro tratamiento (**Figuras 40H y 40I**). Sin embargo, la densidad vascular del tumor fue similar entre los grupos de tratamiento (**Figura 40J**). Estos hallazgos indican que la inmunidad anticancerígena mejorada, no el efecto de alteración vascular, es fundamental para la eficacia terapéutica duradera de la inmunoterapia de combinación triple con mJX-594 e ICI. Finalmente, el número de metástasis pulmonares hematógenas se redujo significativamente en el grupo de combinación triple (**Figuras 40K y 40L**), lo que indica efectos antimetastásicos eficaces mediante la terapia de combinación triple.

[0199] En conjunto, estos resultados demostraron que la inmunoterapia de combinación triple con mJX-594 e ICI puede provocar una respuesta inmune anticancerígena robusta incluso en un modelo de cáncer de mama espontáneo poco inmunogénico.

DISCUSIÓN

[0200] Aquí, demostramos que la terapia de combinación con mJX-594 e ICI es una estrategia terapéutica eficaz para tumores inmunorresistentes. La terapia combinada condujo a un "punto de ebullición" inmunológico en el que un tumor frío y no inflamado se quema lo suficiente como para permitir que el sistema inmunológico del huésped erradique las células tumorales. El efecto más profundo se observó con la inmunoterapia triple con mJX-594, anti-PD-1 y anti-CTLA4, que indujo una regresión completa en aproximadamente el 40 % de los tumores de Renca, que es uno de los tumores singénicos más resistentes a la inmunoterapia. Esta fuerte sinergia puede explicarse por la cooperación mutuamente complementaria de VO e ICI.

[0201] JX-594 es un OV en la etapa más avanzada de ensayos clínicos, que se sabe que actúa a través de diversos mecanismos (Abou-Alfa et al., 2016). Aunque puede inducir rápidamente oncólisis directa y alteración vascular en el tumor, estos efectos son transitorios y en su mayoría disminuyen dentro de la semana posterior a la inyección. A partir de entonces, las células T CD8⁺ se infiltran ampliamente en el tumor para iniciar respuestas inmunitarias anticancerígenas. Sin embargo, al mismo tiempo, los tumores comienzan a evolucionar para evitar la eliminación mediada por el sistema inmunológico mediante la regulación positiva de moléculas de puntos de control inhibidores del sistema inmunitario, tales como PD-1, PD-L1 o CTLA-4 en el TME. Debido a que los efectos anticancerígenos más potentes y duraderos de OV se logran cuando se combina con una inducción y mantenimiento exitosos de la inmunidad antitumoral, es razonable combinar ICI con OV para evitar el cierre temprano de la inmunidad anticancerígena inducida por OV.

[0202] Aunque la monoterapia con ICI revolucionó el panorama del tratamiento del cáncer, su espectacular respuesta terapéutica se limita a un subconjunto de pacientes. Esto dio origen al concepto de tumores inmunológicamente "calientes" o "fríos"; los tumores calientes responden bien a ICI, ya que están inmunológicamente inflamados con TIL y tienen una alta expresión de PD-L1, mientras que los tumores fríos son refractarios a ICI debido a la escasez de TIL CD8⁺ y TME inmunosupresor (Bell e Ilkow, 2017; Gajewski et al., 2013). Por lo tanto, los esfuerzos actuales se centran en superar la resistencia a ICI mediante la conversión de tumores inmunológicamente fríos en tumores calientes. En estos aspectos, nuestro resultado presenta mJX-594 como un socio combinado ideal para ICI. Puede replicarse selectivamente en células tumorales, destruirlas y liberar antígenos tumorales para estimular el sistema inmunológico del huésped. Además, nuestro estudio muestra que puede convertir drásticamente el TME del estado frío al estado caliente al inducir respuestas inflamatorias intratumorales: inducción de respuestas Th1, activación y reclutamiento de células T, regulación positiva de PD-L1 y polarización de células mieloides hacia actividad antitumoral. Curiosamente, se sabe que la replicación y propagación de OV es más activa en tumores fríos donde hay pocas células inmunes para eliminar OV, mientras que los tumores calientes con abundantes TIL residentes podrían inducir la eliminación prematura de OV y atenuar sus efectos terapéuticos (Bell e Ilkow, 2017). Por lo tanto, junto con los resultados de este estudio, mJX-594 es un compañero de combinación óptimo para ICI, especialmente para tumores fríos no inflamados con resistencia intrínseca a la inmunoterapia.

[0203] GM-CSF es la carga genética terapéutica de OV más utilizada. Dos OV que se encuentran en las fases más avanzadas de ensayos clínicos, T-Vec y Pexa-Vec (JX-594), están armados con GM-CSF. Aunque se sabe generalmente que el GM-CSF induce la proliferación de diversas células inmunitarias, tales como las CD, existe preocupación con respecto a la proliferación no deseada de células inmunosupresoras, tales como las MDSC (Hou et al., 2016). En el presente estudio, revelamos que mJX-594 no alteró significativamente la fracción de células CD11b+Gr1+ intratumorales. Además, la neutralización de GM-CSF eliminó la eficacia terapéutica de mJX-594, lo que se debió en parte a la reducción de CD8⁺ TIL, lo que indica que GM-CSF tiene un papel indispensable en la inmunidad contra el cáncer provocada por mJX-594.

[0204] Estudios anteriores informaron que, aunque la combinación de OV e ICI provoca una respuesta inmune impresionante, su eficacia terapéutica puede verse afectada en gran medida por la vía de administración y el programa de tratamiento. En particular, cuando tanto OV como ICI se administran sistémicamente simultáneamente, la combinación podría ser antagonista debido a la inmunidad antiviral inducida por ICI que puede facilitar la depuración viral prematura, lo que indica la importancia de un intervalo de tiempo adecuado entre tratamientos para que OV induzca una inmunidad anticancerígena exitosa. En el presente estudio, la inyección local de mJX-594 indujo

consistentemente inmunidad anticancerígena sin verse afectada significativamente por las secuencias de administración. Suponemos que esto se debe a que la inyección intratumoral proporcionó a OV un lapso de tiempo suficiente para inflamar el TME antes de ser eliminado por la inmunidad antiviral sistémica. Por lo tanto, al diseñar ensayos clínicos de combinación de ICI y OV, la terapia con OV intratumoral podría ser más factible en comparación con la terapia con OV sistémica en términos de programa de administración.

[0205] Además de nuestros resultados alentadores con la combinación de mJX-594 e ICI, ya están en curso varios ensayos clínicos para investigar la eficacia de JX-594 en combinación con α PD-1, α CTLA-4 o α PD-L1 para apuntar a diversos cánceres sólidos, incluido el cáncer de hígado, el cáncer renal y el cáncer de colon (ClinicalTrials.gov: NCT03071094, NCT02977156, NCT03294083 y NCT03206073). Por lo tanto, podríamos verificar los hallazgos de este estudio en un entorno clínico en un futuro próximo.

[0206] En conclusión, este estudio indicó que la inyección intratumoral de mJX-954 induce una remodelación profunda de TME del estado frío al estado caliente y provoca una inmunidad anticancerígena robusta en combinación con ICI, superando la resistencia a la inmunoterapia.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Ratones y líneas celulares.

[0207] Se adquirieron ratones BALB/c macho de entre 6 y 8 semanas de edad de Orient Bio Inc. (Seongnam, Gyeonggi, Corea), y se adquirieron ratones transgénicos *MMTV-PyMT* hembra (FVB/N) de Jackson Laboratory (Bar Harbor), YO, EE. UU., #002374). Los ratones se alojaron en una instalación para animales libre de patógenos específicos en la Universidad CHA (Seongnam, Gyeonggi, Corea). Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC, #170025) de la Universidad CHA y se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados. La línea celular de cáncer renal murino Renca y la línea celular de cáncer de colon murino CT26 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA, EE. UU. #CRL-2947) y del Banco de Líneas Celulares Coreanas (Seúl, Corea, #80009). Estas células se mantuvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 o medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), cada uno suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y 1 % de penicilina/estreptomicina, y se incubaron a 37°C, 5 % CO₂ en incubadora.

Generación y cuantificación de virus.

[0208] mJX-594, proporcionado por Sillajen, Inc. (Seúl, Corea), es una cepa de reserva occidental (WR) del virus vaccinia que codifica GM-CSF murino en el locus del gen de la timidina quinasa de vaccinia bajo el control del promotor p7.5 y se utilizó a lo largo de este estudio. Este virus se amplificó en células HeLaS3 antes de la purificación. En resumen, se infectaron células HeLaS3 con virus vaccinia recombinante durante 3 días, se recogieron mediante centrifugación, a continuación se homogeneizaron y se centrifugaron una vez más. El sobrenadante que contenía el virus se colocó en capas sobre un cojín de sacarosa al 36 % y se centrifugó a 32.900 g y el sedimento viral purificado se resuspendió en Tris 1 mM, pH 9,0. Para determinar el título viral, se aplicó virus diluido en serie en DMEM sin suero sobre una monocapa de células OS U-2 durante 2 horas, y a continuación se añadió carboximetilcelulosa al 1,5 % en DMEM suplementada con FBS al 2 %. Después de 72 horas, las células se tiñeron con cristal violeta al 0,1 % y se contaron las placas.

Modelos tumorales y regímenes de tratamiento.

[0209] Se implantaron tumores mediante inyección subcutánea de 2×10^5 células Renca en el flanco derecho de ratones BALB/c de tipo salvaje. Cuando los tumores alcanzaron $> 50 \text{ mm}^3$, los ratones se trataron con PBS o 1×10^7 unidades formadoras de placas (ufp) de mJX-594 mediante inyección intratumoral cada 3 días. Para el modelo de tumor bilateral, se implantaron 2×10^5 células Renca por vía subcutánea en el flanco derecho, y 1×10^5 células Renca o CT26 se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo 4 días después. Para el estudio de agotamiento celular, se utilizaron anticuerpos contra CD4 (200 μg , clon GK1.5, BioXCell), CD8 (200 μg , clon 53-6.72, BioXCell) o GM-CSF (200 μg , clon MP1-22E9, BioXCell) inyectados por vía intraperitoneal junto con mJX-594. Para el bloqueo del punto de control inmunitario, se inyectaron por vía intraperitoneal anticuerpos anti-PD-1 (10 mg/kg, clon J43, BioXCell) y/o anti-CTLA-4 (4 mg/kg, clon 9D9, BioXCell) con o sin mJX-594, cada 3 días dependiendo del esquema de dosificación. Los tumores se midieron cada 2 o 3 días usando un calibrador digital y los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula elipsoide modificada ($1/2 \times (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$). El día 50, los ratones supervivientes con regresión tumoral completa se volvieron a exponer a 2×10^5 células Renca en el flanco izquierdo y se controló el crecimiento y la supervivencia del tumor. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron 1,5 cm de diámetro o cuando los ratones estaban moribundos.

[0210] Se adquirieron ratones transgénicos *MMTV-PyMT* hembra de Jackson Laboratory. Nueve semanas después del nacimiento, se midió el volumen de cada nódulo tumoral palpable ($> 20 \text{ mm}^3$) y se utilizó el volumen total de todos los tumores combinados para calcular la carga tumoral por ratón. Los ratones *MMTV-PyMT* se aleatorizaron según su carga tumoral inicial y se trataron con 1×10^7 ufp de mJX-594 en presencia o ausencia de los inhibidores de puntos de control inmunitario PD-1 (10 mg/kg) o CTLA-4 (4 mg/kg) en los puntos de tiempo indicados. Después de 4 semanas

de tratamiento, se anestesiaron los ratones y se recogieron tejidos para análisis adicionales. Los análisis de MMTV-PyMT se realizaron tal como se describió anteriormente (Kim et al., 2014; Park et al., 2016).

Análisis histológico

[0211] Para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E), los tumores se fijaron durante la noche en paraformaldehído (PFA) al 4 %. Después del procesamiento del tejido utilizando procedimientos estándar, las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 3 µm, seguido de tinción con H&E. La inmunofluorescencia se realizó en secciones de tejido congelado. Los tumores se fijaron en PFA al 1 % a temperatura ambiente y se enjuagaron varias veces con PBS, se infiltraron con sacarosa al 30 % y se congelaron en compuesto OCT. Se bloquearon secciones congeladas (50 µm de grosor) con suero de cabra normal al 5 % en PBS-T (Triton X-100 al 0,1 % en PBS) y a continuación se incubaron durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios: virus anti-vaccinia (conejo, Abcam), anti-CD31 (hámster, clon 2H8, Millipore; conejo, Abcam), anti-CD8 (rata, clon 53-6.7, BD Pharmingen), anti-CD11c (hámster, clon HL3, BD Pharmingen), anti-PD-L1 (conejo, clon 28-8, Abcam), anti-Caspasa3 (conejo, R&D Systems), anti-Pan-Citoqueratina (Ratón, clon AE1/AE3, DAKO), anti-CD11b (rata, clon M1/70, BD Pharmingen) o anti-CD3e (Hamster, clon 145-2C11, BD Pharmingen). Después de varios lavados, las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo conjugada con FITC, Cy3 o Cy5 (Jackson ImmunoResearch), IgG anti-rata conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch), IgG anti-hámster conjugada con FITC o Cy3 (Jackson ImmunoResearch), o IgG anti-ratón conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch). Los núcleos celulares se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen). Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje fluorescente (DAKO) y las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss).

Análisis morfométrico

[0212] Las mediciones de densidad del virus vaccinia, vasos sanguíneos, linfocitos T y células dendríticas, así como la medición del área de células mieloides, se realizaron utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para determinar el nivel de infección por el virus vaccinia, se calculó el área VV+ por campo aleatorio de 0,49 mm² en secciones de tumor. Para la densidad de los vasos sanguíneos, se calculó el área CD31+ por campo aleatorio de 0,49 mm² en las regiones peritumorales e intratumorales. El grado de infiltración de linfocitos T citotóxicos se presentó como porcentaje de área de CD8⁺ por campo aleatorio de 0,49 mm² en regiones peritumorales e intratumorales. El nivel de células dendríticas se midió calculando el porcentaje de área de CD11c⁺ en campos aleatorios de 0,49 mm². El grado de apoptosis se presentó como el porcentaje de área de Caspasa3⁺ por campos aleatorios de 0,49 mm². Para definir las células PD-L1⁺, se identificó la colocalización de PD-L1⁺ con Pan-CK⁺, CD11b⁺ y CD3⁺ en un campo aleatorio de 0,01 mm². La metástasis pulmonar en ratones MMTV-PyMT se cuantificó midiendo colonias tumorales > 100 µm de diámetro. Todas las mediciones se realizaron en al menos 5 campos por ratón.

Análisis por citometría de flujo de células inmunes infiltrantes de tumores.

[0213] Se trituraron los tumores de cada grupo de tratamiento antes de la incubación con agitación durante 1 hora a 37 °C, en presencia de collagenasa D (20 mg/ml, Roche) y ADNasa I (2 mg/ml, Roche). Se generaron suspensiones celulares mediante pipeteo repetido y a continuación se filtraron a través de un colador celular de 70 µm y se lisaron para eliminar los glóbulos rojos. Después de lavar con PBS, las células resuspendidas se filtraron a través de una malla de nailon. Se bloquearon suspensiones de células individuales de tejidos tumorales con un anticuerpo contra CD16/32 (clon 2.4G2, BD Pharmingen) y se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable (eFluor450, eBioscience) para distinguir las células vivas. Para el análisis de los marcadores de superficie, las células se tiñeron en PBS que contenía FBS al 1 %, con anticuerpos dirigidos a CD45 (30-F11, BD Pharmingen), CD4 (RM4-5, BD Pharmingen), CD8 (53-6.7, BD Pharmingen), CD3 (17A2 o 145-2C11, eBioscience), ICOS (7E.17G9 o 15F9, eBioscience), CD11b (M1/70, BD Pharmingen), F4/80 (BM8, eBioscience), MHC II (M5/114.15.2, eBioscience), Ly6C (HK1.4, eBioscience), Ly6G (1A8-Ly6g o RB6-8C5, eBioscience) o CD206 (MR5D3, eBioscience), durante 30 min en hielo. Las células se permeabilizaron posteriormente utilizando un kit de permeabilización y fijación de FoxP3 (eBioscience) y se tiñeron para FoxP3 (FJK-16s, eBioscience), CD25 (PC61.5, eBioscience) o Granzyme B (NGZB, eBioscience). Las células marcadas se adquirieron utilizando un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) y se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Aislamiento de ARN y análisis de expresión génica con NanoString.

[0214] Se extrajo ARN total de lisados tumorales completos usando TRIzol (Invitrogen) y se purificó con etanol; la calidad del ARN se confirmó utilizando un instrumento Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, IA, EE. UU.). El perfil inmunológico se realizó con un panel de ratón NanoString nCounter PanCancer Immune Profiling multiplexado digital (NanoString Technologies), utilizando 100 ng de ARN total aislado de tejidos tumorales. Las hibridaciones se llevaron a cabo a 65 °C durante 16-30 h combinando 5 µl de cada muestra de ARN con 8 µl de sonda nCounter Reporter en tampón de hibridación y 2 µl de sondas nCounter Capture, para un volumen de reacción total de 15 µl. El exceso de sonda se eliminó mediante una purificación basada en microesferas magnéticas de dos pasos utilizando la estación de preparación nCounter (NanoString Technologies). La abundancia de moléculas diana específicas se cuantificó con el analizador digital nCounter contando códigos de barras fluorescentes individuales y

evaluando las moléculas diana correspondientes. Para cada ensayo, se realizó un escaneo de alta densidad que abarcaba 280 campos de visión. Los datos se recopilaron utilizando el analizador digital nCounter después de adquirir imágenes de los reporteros fluorescentes inmovilizados en el cartucho de muestra con una cámara CCD. El análisis de los datos se realizó utilizando el software nSolver (NanoString Technologies). Los datos del perfil de ARNm se normalizaron con respecto a los genes constitutivos y se analizaron utilizando el software R (www.r-project.org).

Análisis estadístico

[0215] Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) y PASW stats 18 (SPSS). Los valores se representan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) a menos que se indique lo contrario. Las diferencias estadísticas entre medias se probaron mediante pruebas t de Student no apareadas. Las curvas de supervivencia se generaron mediante el procedimiento de Kaplan-Meier y las diferencias estadísticas entre las curvas se analizaron mediante la prueba de rangos logarítmicos. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

REFERENCIAS

[0216]

- Abou-Alfa, G. K., Galle, P. R., Chao, Y., Brown, K. T., Heo, J., Borad, M. J., Luca, A., Pelusio, A., Agathon, D., y Lusky, M. (2016). PHOCUS: A phase 3 randomized, open-label study comparing the oncolytic immunotherapy Pexa-Vec followed by sorafenib (SOR) vs SOR in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) without prior systemic therapy. In, (2016 ASCO Annual Meeting).
- Bell, J. (2014). Oncolytic viruses: immune or cytolytic therapy? *Molecular Therapy* 22, 1231-1232.
- Bell, J. C., y Ilkow, C. S. (2017). A viro-immunotherapy triple play for the treatment of glioblastoma. *Cancer cell* 32, 133-134.
- Breitbart, C. J., Burke, J., Jonker, D., Stephenson, J., Haas, A. R., Chow, L. Q., Nieva, J., Hwang, T. H., Moon, A., Patt, R., et al. (2011a). Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477, 99-102.
- Breitbart, C. J., De Silva, N. S., Falls, T. J., Aladi, U., Evgin, L., Paterson, J., Sun, Y. Y., Roy, D. G., Rintoul, J. L., Daneshmand, M., et al. (2011b). Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 886-894.
- Breitbart, C. J., Parato, K., Burke, J., Hwang, T.-H., Bell, J. C., y Kirn, D. H. (2015a). Pexa-Vec double agent engineered vaccinia: oncolytic and active immunotherapeutic. *Current opinion in virology* 13, 49-54.
- Breitbart, C. J., Parato, K., Burke, J., Hwang, T. H., Bell, J. C., y Kirn, D. H. (2015b). Pexa-Vec double agent engineered vaccinia: oncolytic and active immunotherapeutic. *Current opinion in virology* 13, 49-54.
- Chiocca, E. A., y Rabkin, S. D. (2014). Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer immunology research* 2, 295-300.
- Cripe, T. P., Ngo, M. C., Geller, J. I., Louis, C. U., Currier, M. A., Racadio, J. M., Towbin, A. J., Rooney, C. M., Pelusio, A., Moon, A., et al. (2015). Phase 1 study of intratumoral Pexa-Vec (mJX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus, in pediatric cancer patients. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 602-608.
- De Palma, M., y Jain, R. K. (2017). CD4+ T cell activation and vascular normalization: Two sides of the same coin? *Immunity* 46, 773-775.
- Gajewski, T. F. (2015). The Next Hurdle in Cancer Immunotherapy: Overcoming the Non-T-Cell-Inflamed Tumor Microenvironment. *Seminars in oncology* 42, 663-671.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., y Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology* 14, 1014-1022.
- Hegde, P. S., Karanikas, V., y Evers, S. (2016). The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 1865-1874.
- Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbart, C. J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H. Y., Chung, H. C., Kim, C. W., et al. (2013). Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia mJX-594 in liver cancer. *Nature medicine* 19, 329-336.
- Hou, W., Sampath, P., Rojas, J. J., y Thorne, S. H. (2016). Oncolytic Virus-Mediated Targeting of PGE2 in the Tumor Alters the Immune Status and Sensitizes Established and Resistant Tumors to Immunotherapy. *Cancer cell* 30, 108-119.
- Kim, C., Yang, H., Fukushima, Y., Saw, P. E., Lee, J., Park, J.-S., Park, I., Jung, J., Kataoka, H., y Lee, D. (2014). Vascular RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption. *Cancer cell* 25, 102-117.
- Kim, M., Nitschké, M., Sennino, B., Murer, P., Schriver, B. J., Bell, A., Subramanian, A., McDonald, C. E., Wang, J., y Cha, H. (2018). Amplification of oncolytic vaccinia virus widespread tumor cell killing by sunitinib through multiple mechanisms. *Cancer research* 78, 922-937.
- Kirn, D. H., y Thorne, S. H. (2009). Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 64.

- Lichty, B. D., Breitbach, C. J., Stojdl, D. F., y Bell, J. C. (2014). Going viral with cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 14, 559.
- Liu, Z., Ravindranathan, R., Kalinski, P., Guo, Z. S., y Bartlett, D. L. (2017). Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy. *Nature communications* 8, 14754.
- 5 Park, B. H., Hwang, T., Liu, T. C., Sze, D. Y., Kim, J. S., Kwon, H. C., Oh, S. Y., Han, S. Y., Yoon, J. H., Hong, S. H., et al. (2008). Use of a targeted oncolytic poxvirus, mJX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *The Lancet Oncology* 9, 533-542.
- 10 Park, J.-S., Kim, I.-K., Han, S., Park, I., Kim, C., Bae, J., Oh, S. J., Lee, S., Kim, J. H., y Woo, D.-C. (2016). Normalization of tumor vessels by Tie2 activation and Ang2 inhibition enhances drug delivery and produces a favorable tumor microenvironment. *Cancer cell* 30, 953-967.
- Rivera, L. B., y Bergers, G. (2015). Intertwined regulation of angiogenesis and immunity by myeloid cells. *Trends in immunology* 36, 240-249.
- Rojas, J. J., Sampath, P., Hou, W., y Thorne, S. H. (2015). Defining Effective Combinations of Immune Checkpoint Blockade and Oncolytic Virotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 5543-5551.
- 15 Schmittnaegel, M., Rigamonti, N., Kadioglu, E., Cassará, A., Rmili, C. W., Kiialainen, A., Kienast, Y., Mueller, H.-J., Ooi, C.-H., y Laoui, D. (2017). Dual angiopoietin-2 and VEGFA inhibition elicits antitumor immunity that is enhanced by PD-1 checkpoint blockade. *Science translational medicine* 9, eaak9670.
- 20 Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., y Ribas, A. (2017). Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168, 707-723.
- Thorne, S. H. (2014). Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Frontiers in oncology* 4, 155.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., y Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell* 27, 450-461.
- 25 Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A., y Pardoll, D. M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 16, 275.
- Wolchok, J. D., y Chan, T. A. (2014). Cancer: Antitumour immunity gets a boost. *Nature* 515, 496.

REIVINDICACIONES

1. Terapia de combinación que comprende (a) un virus vaccinia oncolítico replicativo y (b) uno o más inhibidores de proteínas de punto de control inmunitario para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto humano, en la que el virus vaccinia oncolítico replicativo está diseñado para expresar GM-CSF, y en la que el virus vaccinia oncolítico replicativo y el uno o más inhibidores de proteínas de puntos de control inmunitarios se administran simultáneamente al paciente.
2. Combinación para su uso, según la reivindicación 1, en la que el virus vaccinia oncolítico replicativo se administra por vía intratumoral, por vía intravenosa, intraarterial o intraperitoneal.
3. Combinación para su uso, según la reivindicación 1 o 2, en la que el inhibidor de la proteína del punto de control inmunitario es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína del punto de control inmunitario.
4. Combinación para su uso, según la reivindicación 3, en la que el inhibidor de la proteína del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a PD-1 o PD-L1; o en la que el inhibidor de la proteína del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a CTLA-4.
5. Combinación para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el virus vaccinia oncolítico replicativo es una cepa Wyeth, una cepa Western Reserve, una cepa Lister o una cepa Copenhagen.
6. Combinación para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el virus vaccinia comprende genes 14L y/o F4L funcionales.
7. Combinación para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento del carcinoma de células renales.
8. Combinación para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el sujeto no ha tenido éxito en al menos una quimioterapia o inmunoterapia previa, preferiblemente en la que el sujeto tiene un cáncer que es refractario a una terapia inhibidora de puntos de control inmunitario, preferiblemente en la que el cáncer es resistente al tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-CTLA-4.
9. Combinación para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que se administran simultáneamente al sujeto una primera dosis del virus vaccinia oncolítico replicativo y una primera dosis del inhibidor de proteína del punto de control inmunitario, seguido de al menos una administración simultánea consecutiva posterior del virus y del inhibidor de la proteína del punto de control al sujeto, opcionalmente en la que se administra al sujeto al menos una primera, segunda y tercera administración simultánea consecutiva del virus vaccinia oncolítico replicativo y del inhibidor de la proteína del punto de control.
10. Combinación para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la terapia de combinación proporciona efectos antitumorales mejorados con respecto a la administración única del virus vaccinia oncolítico replicativo o uno o más inhibidores de proteínas de puntos de control inmunitarios.

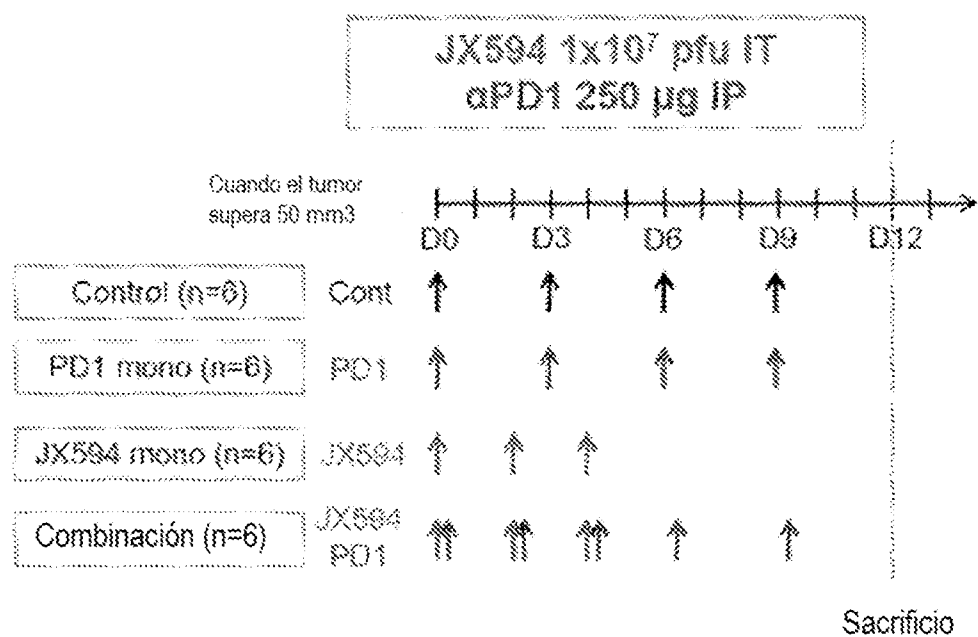


Figura 1B

Grupos

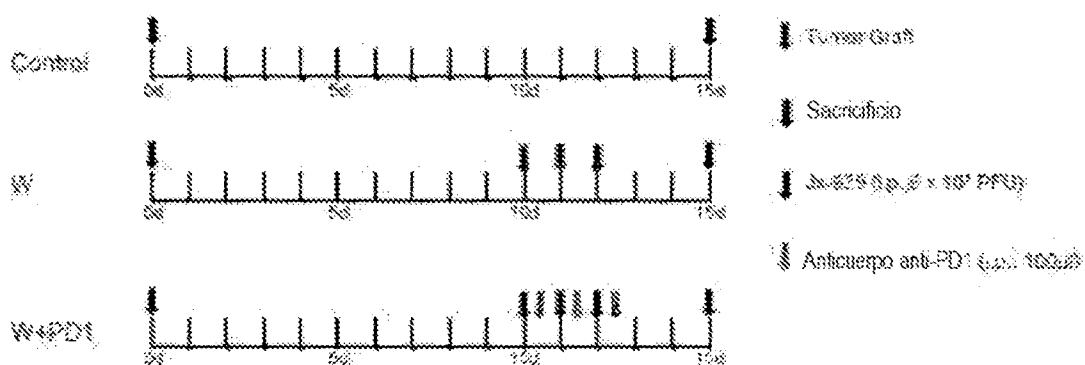


Figura 1C

Figure 1C

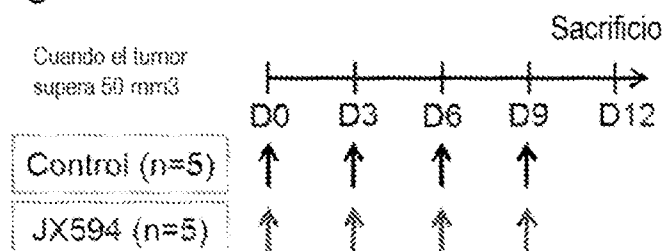


Figura 2A

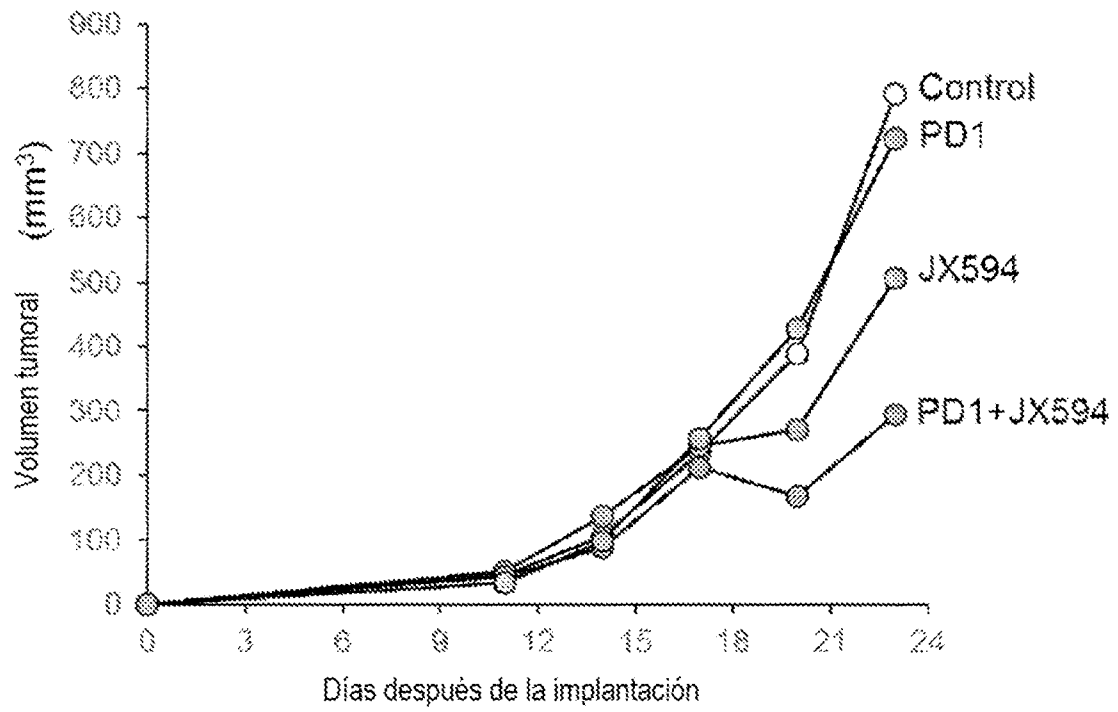


Figura 2B

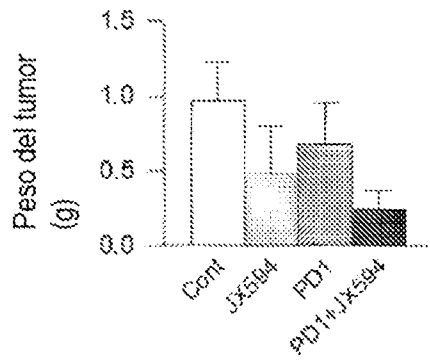


Figura 3A

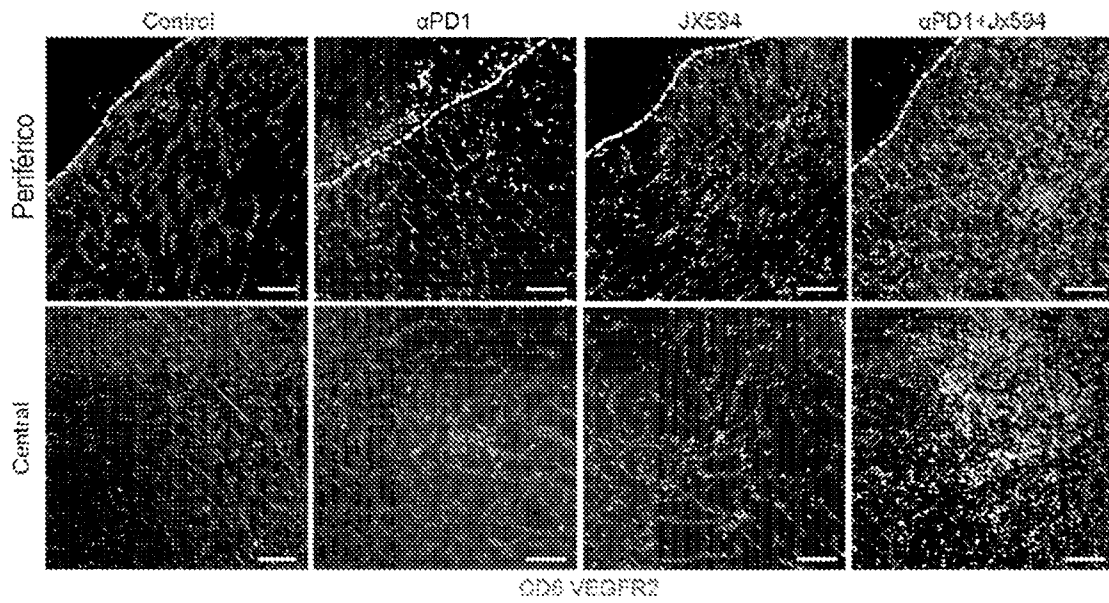


Figura 3B

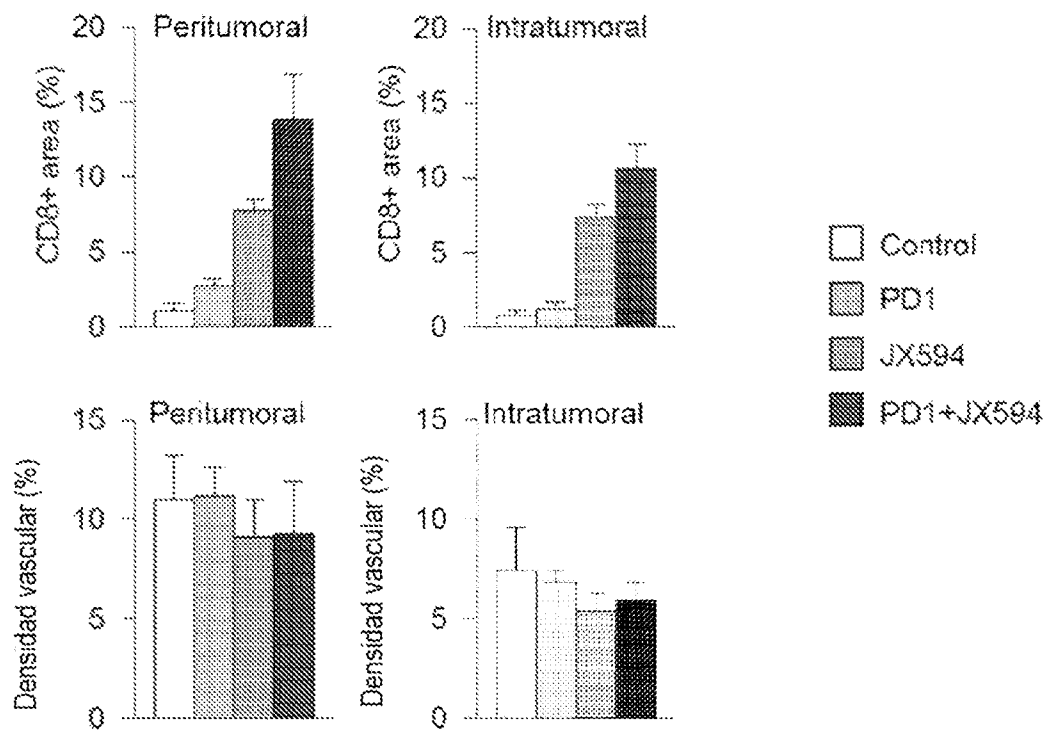


Figura 4A

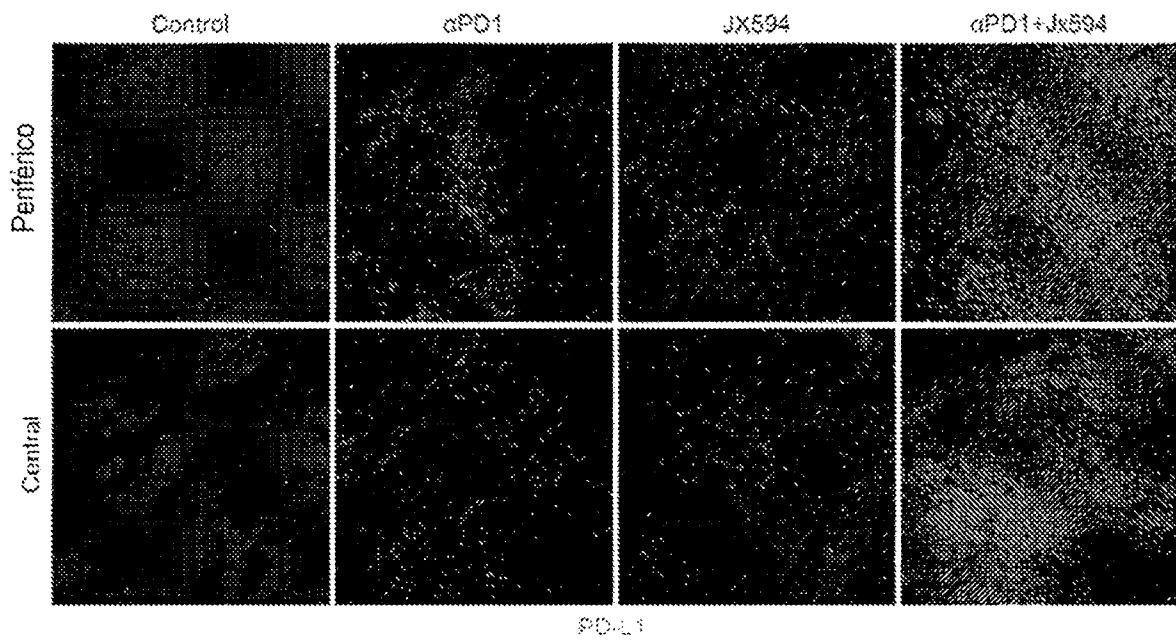


Figura 4B

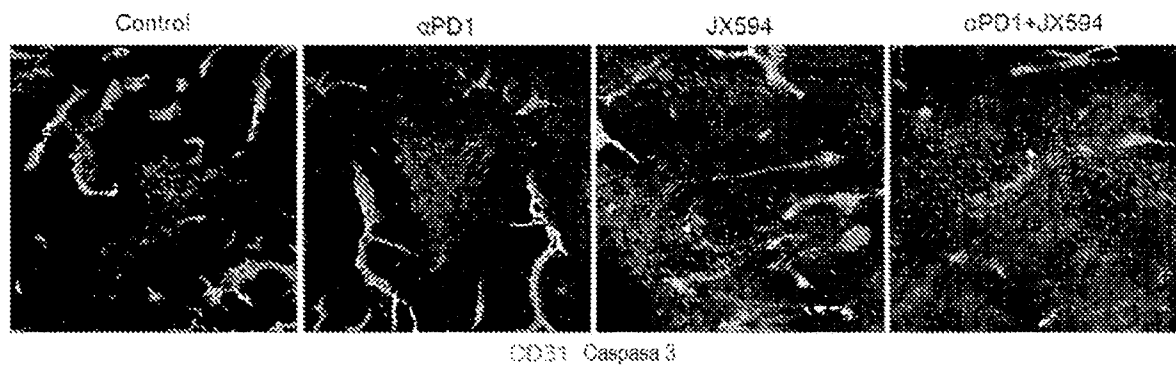


Figura 5A

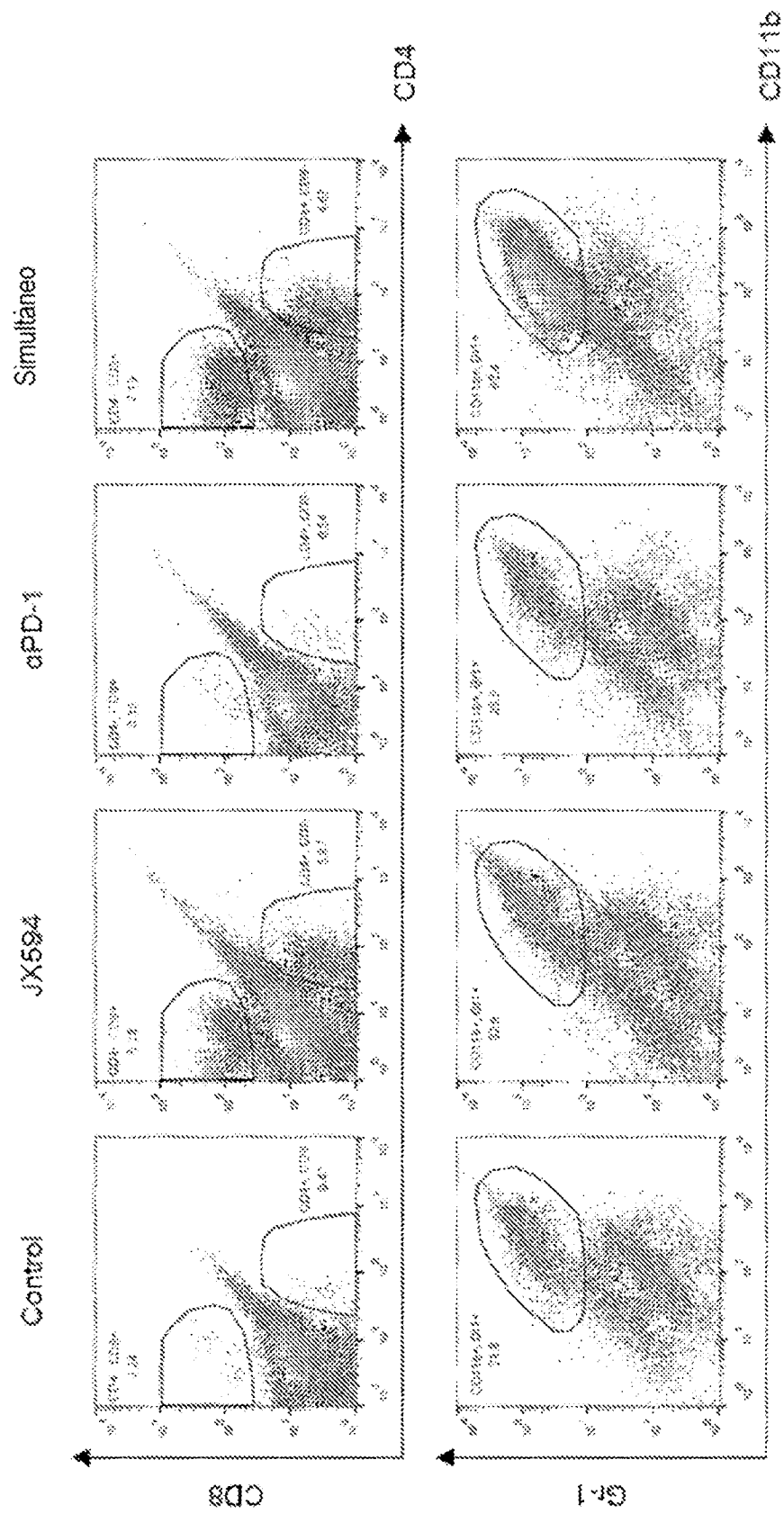


Figura 5B

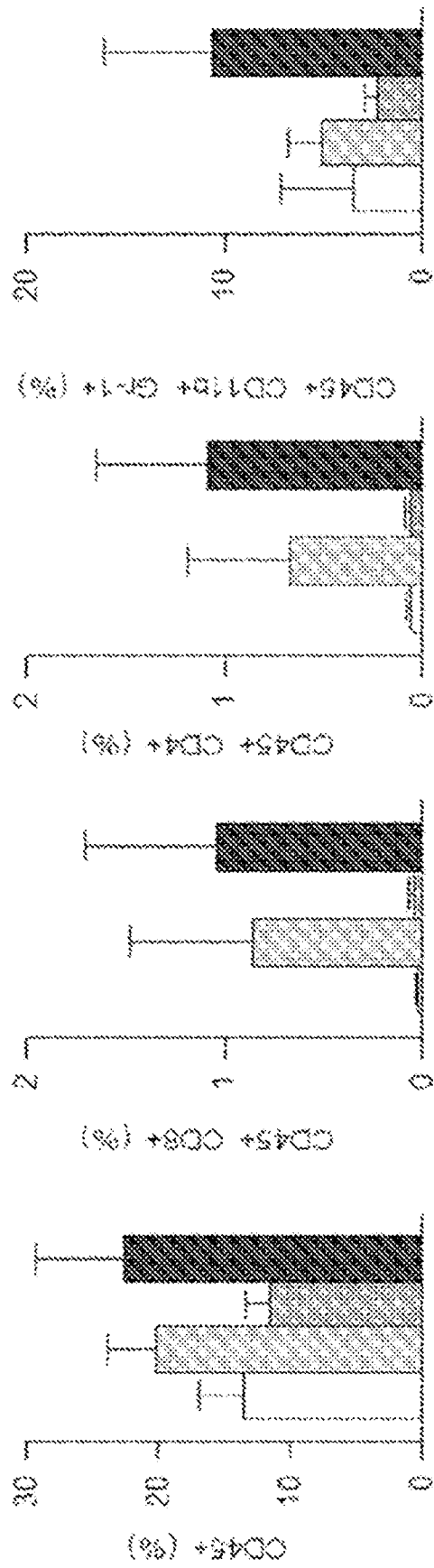


Figura 6

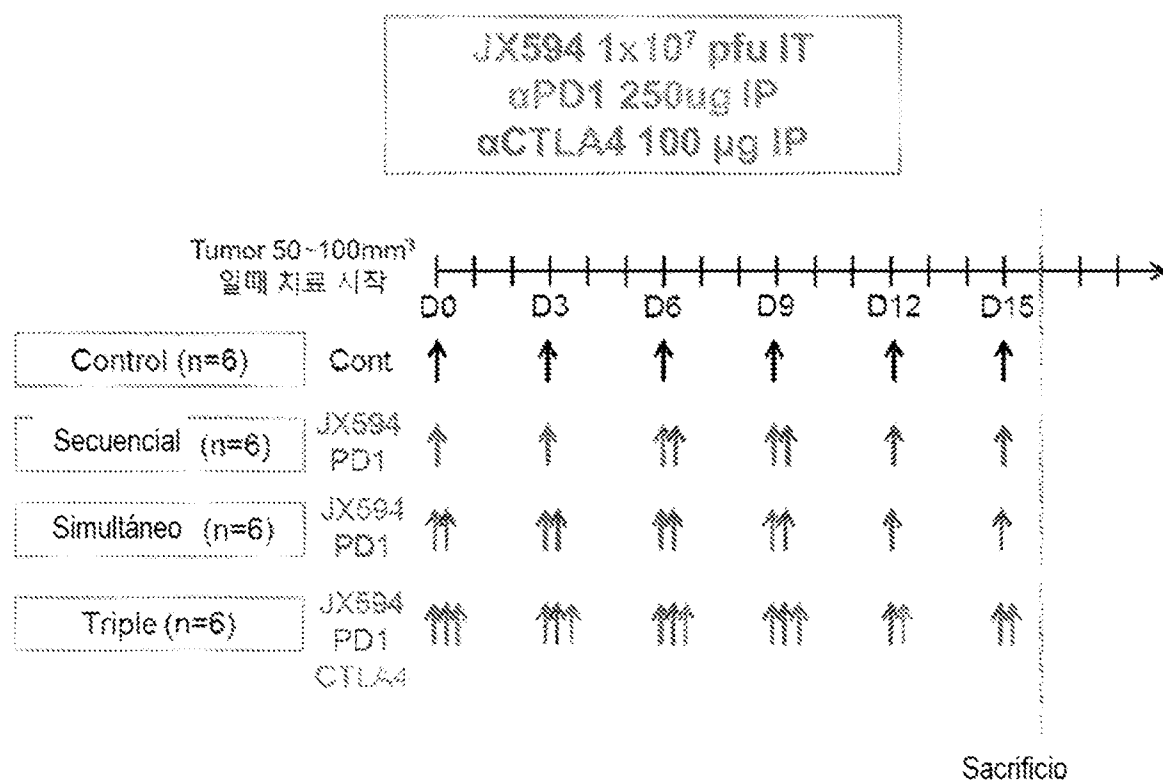


Figura 7

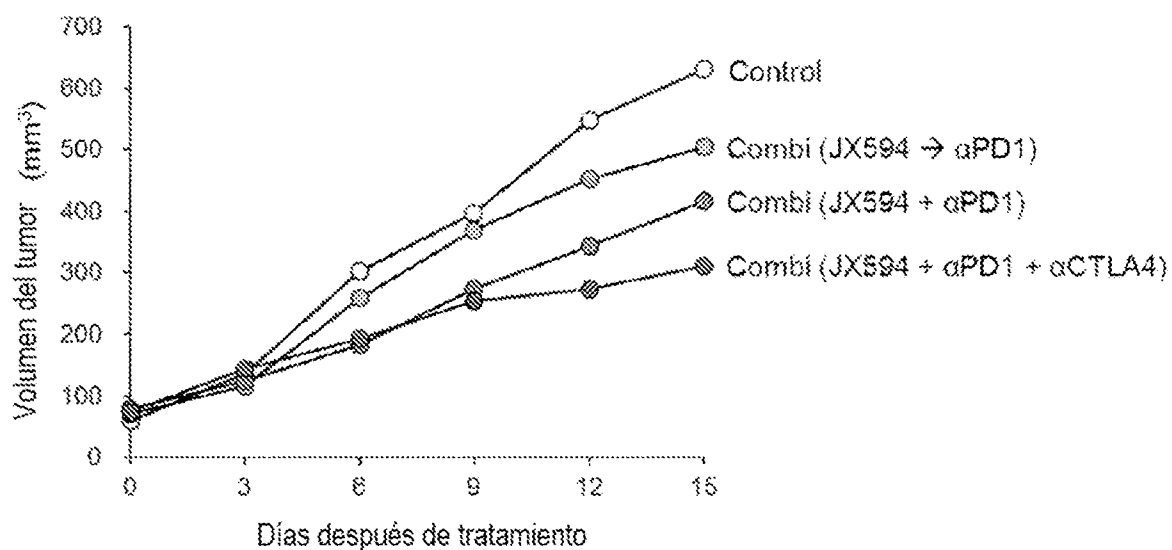


Figura 8

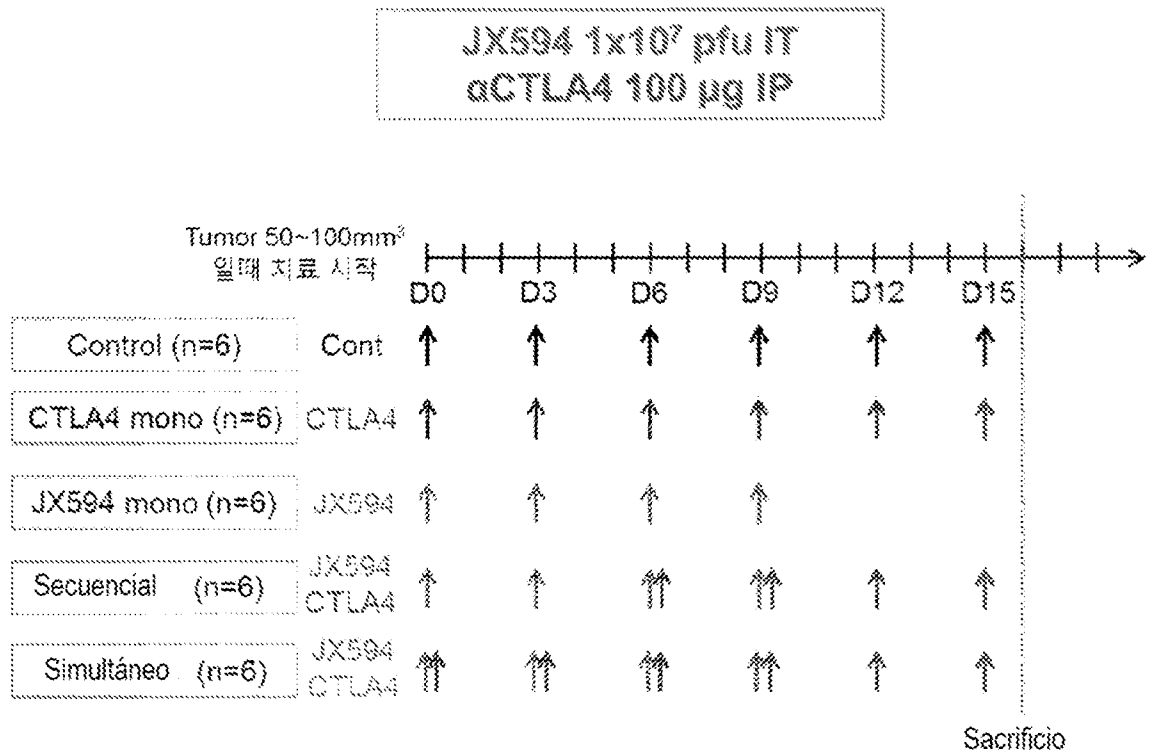


Figura 9

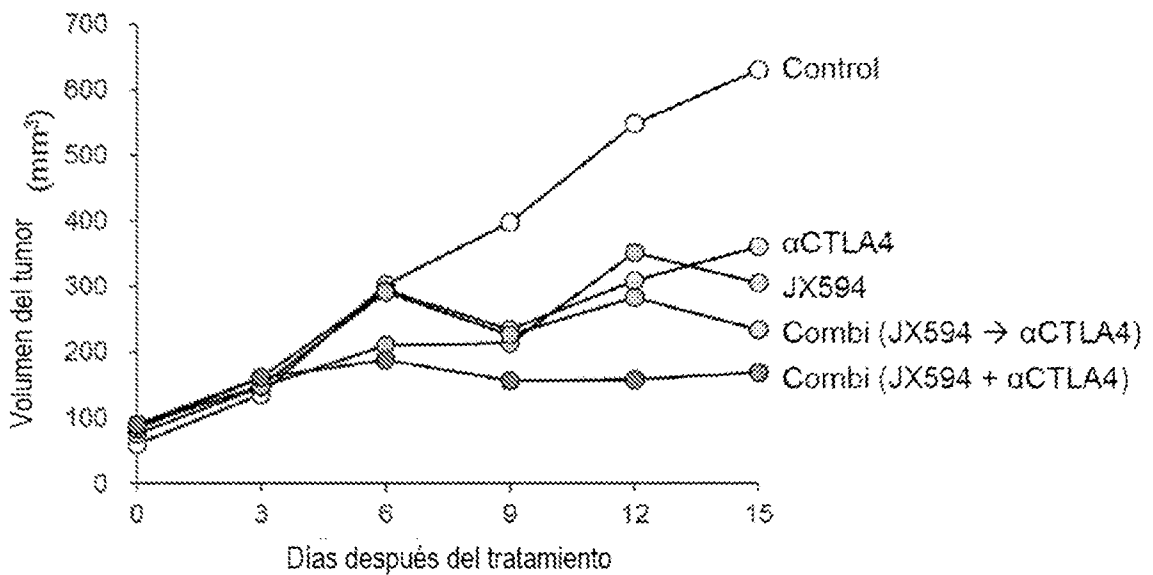
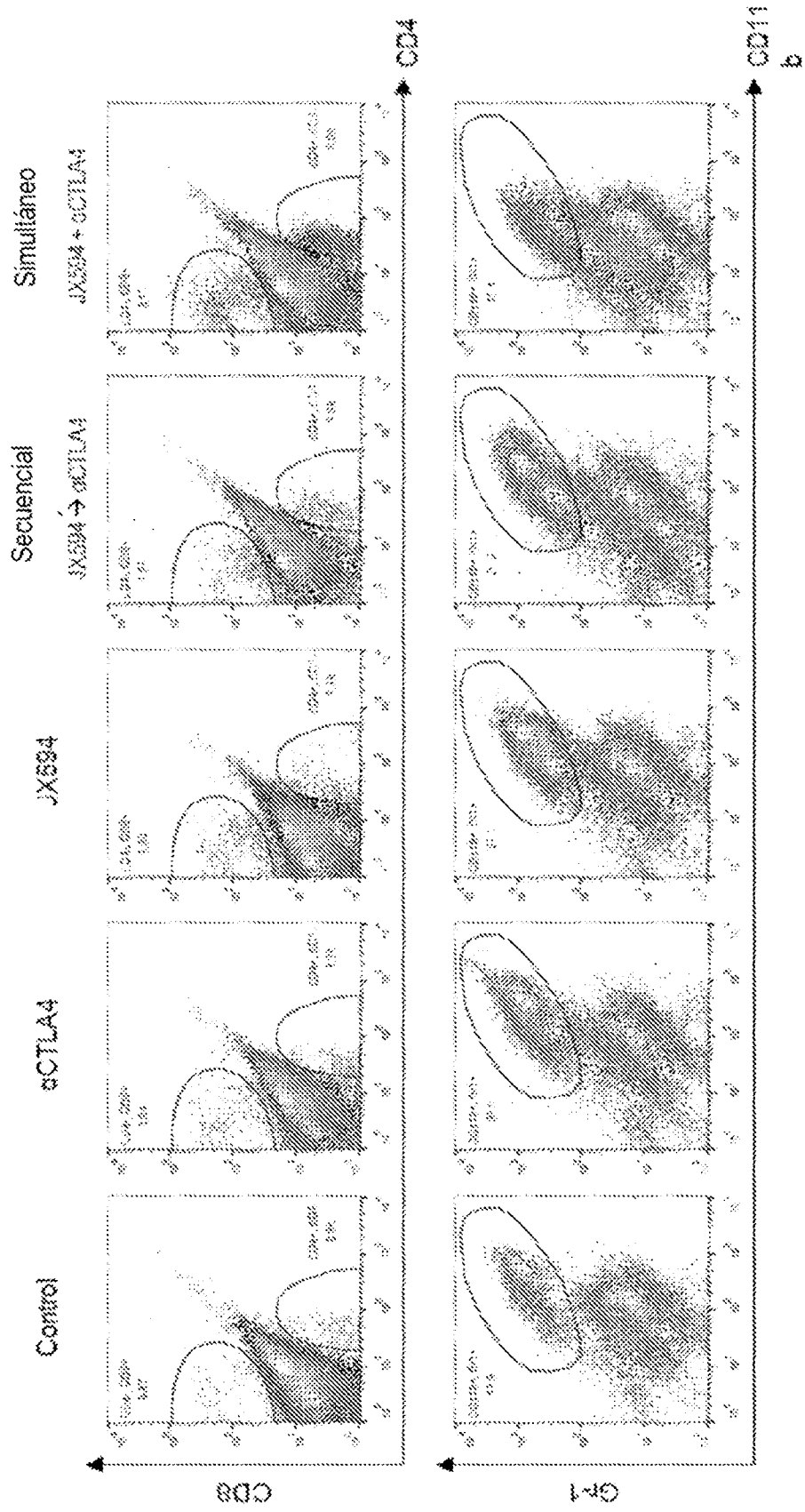


Figura 10A



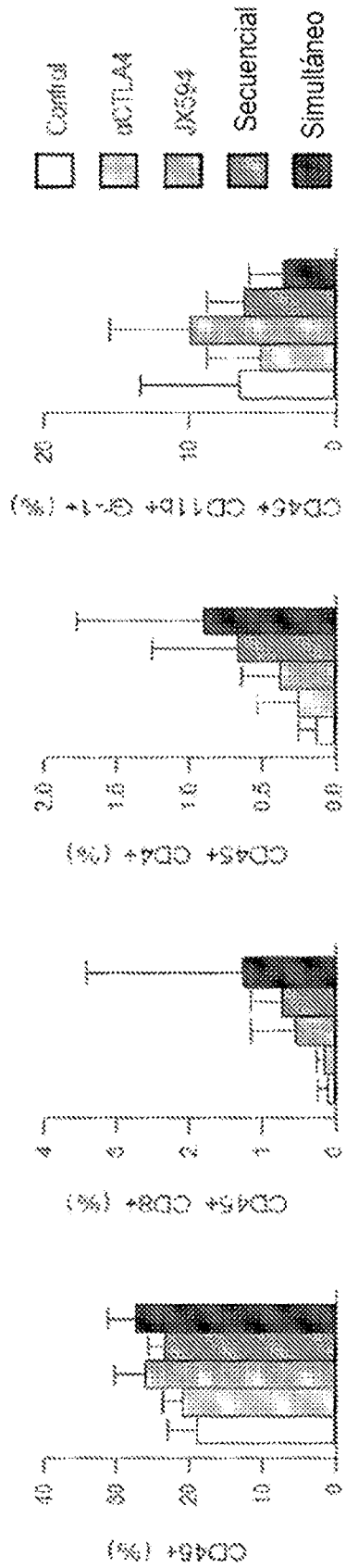


Figura 10B

Figura 11

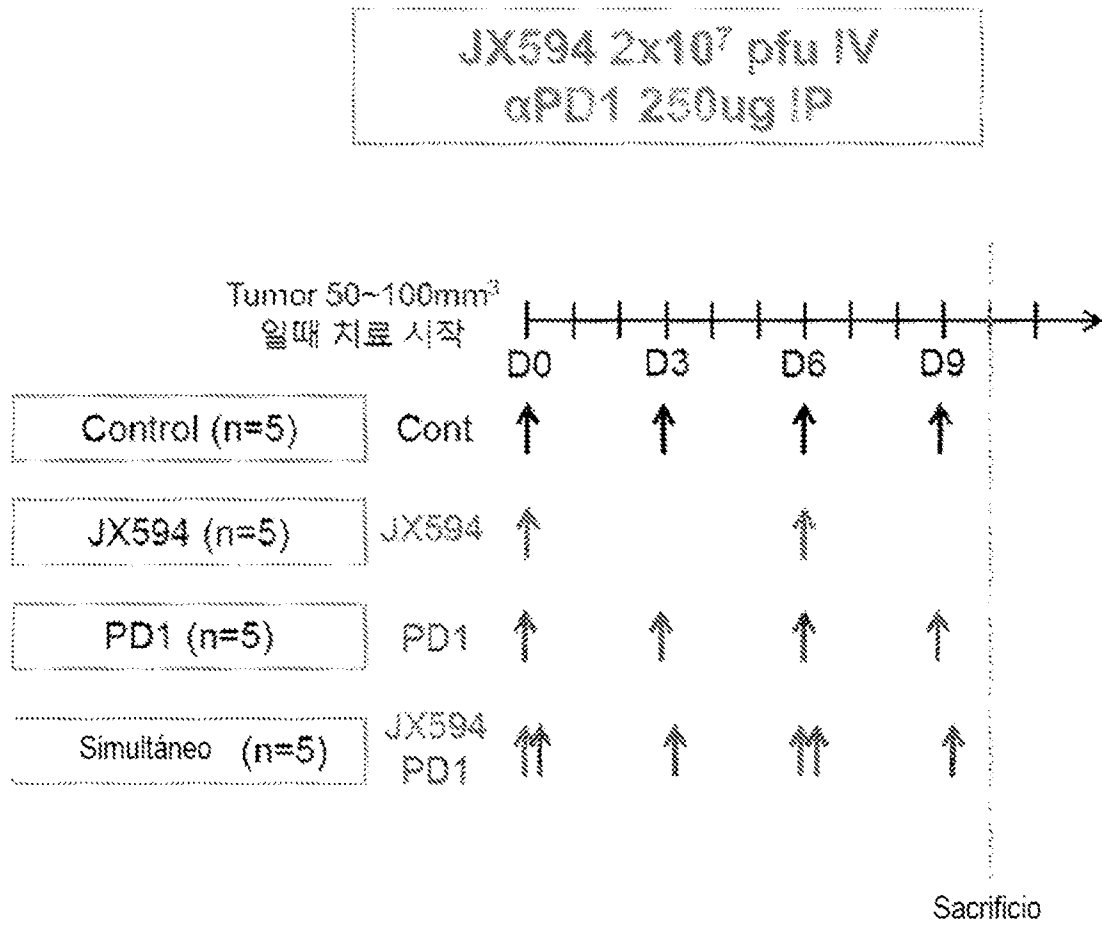


Figura 12

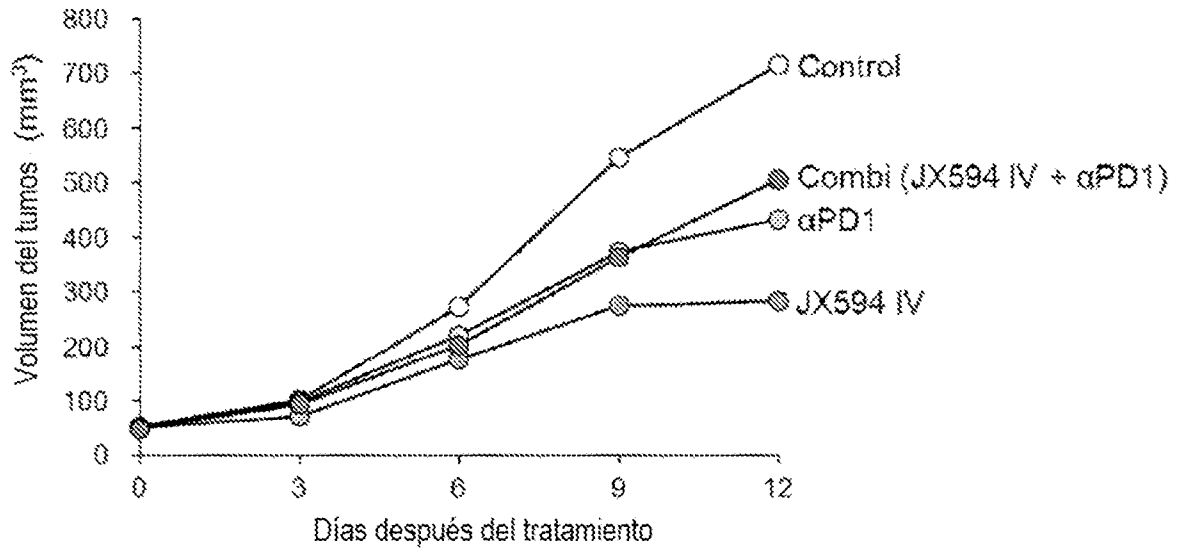


Figura 13

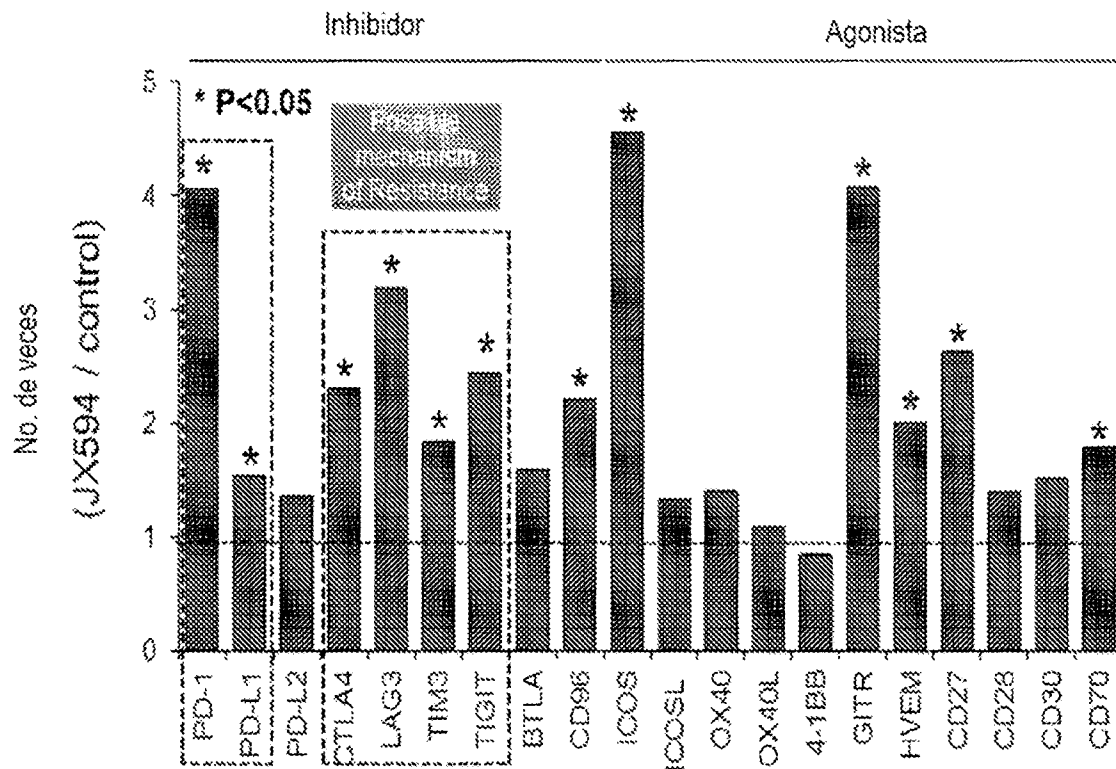
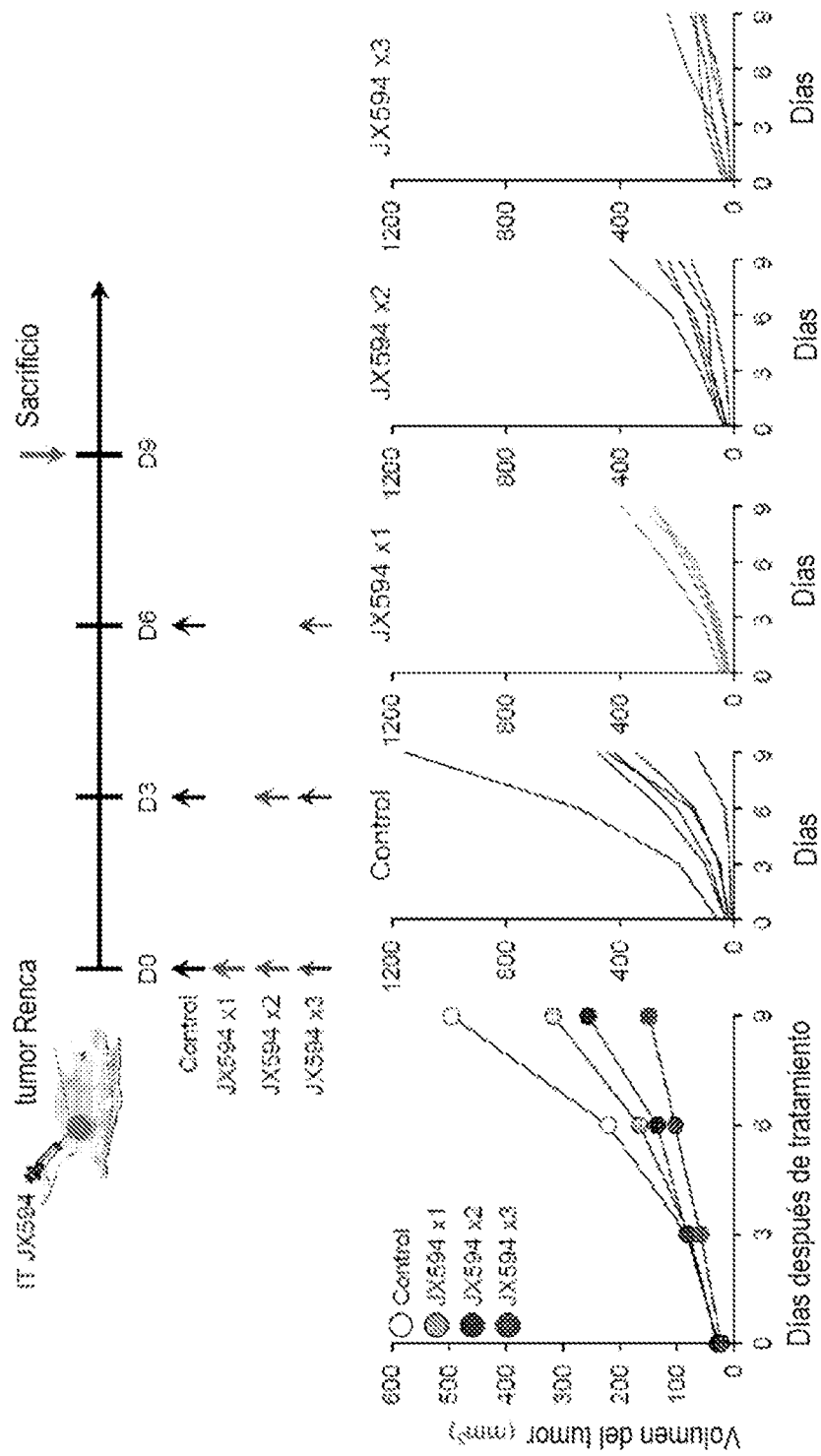


Figura 14



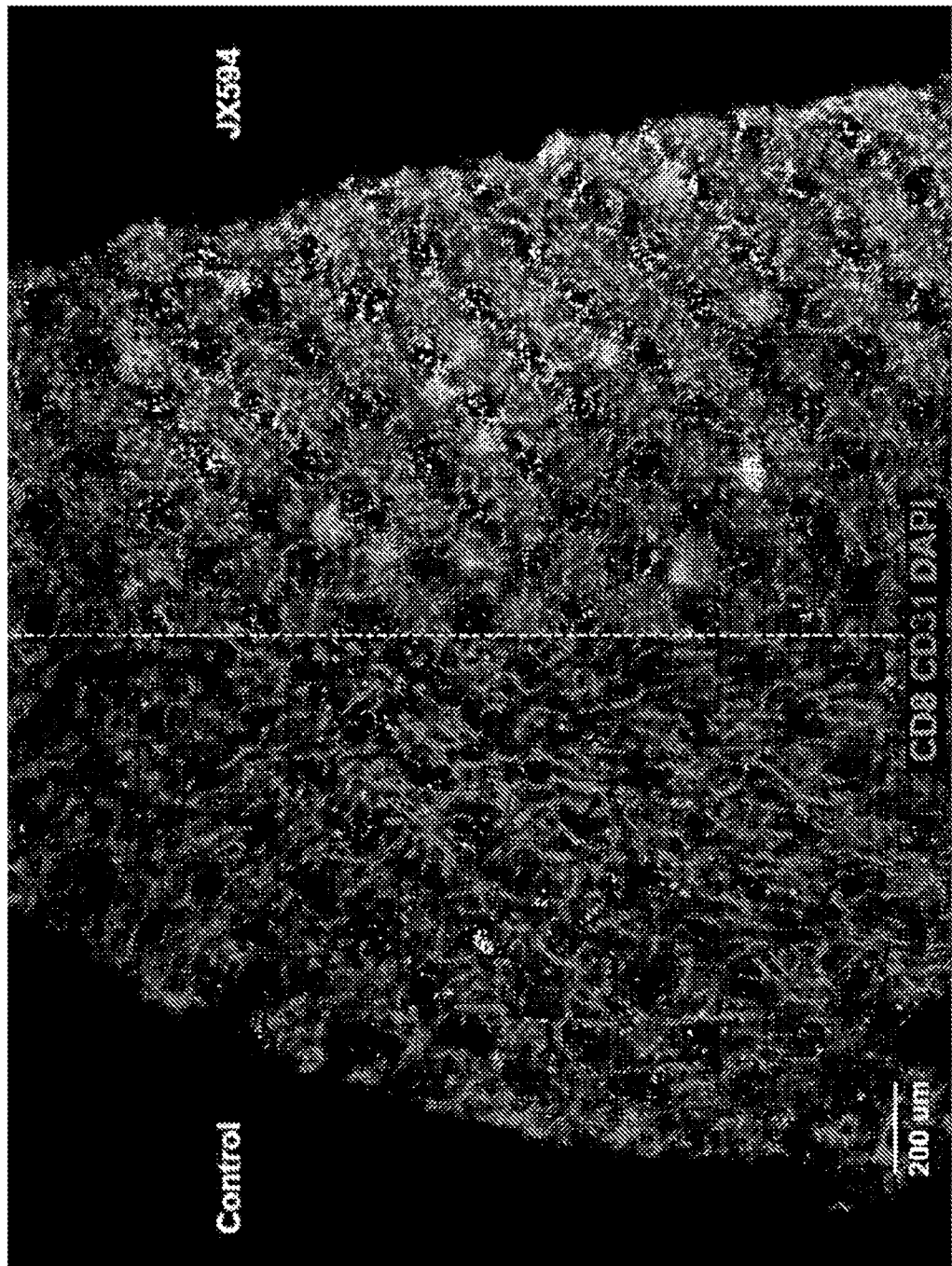
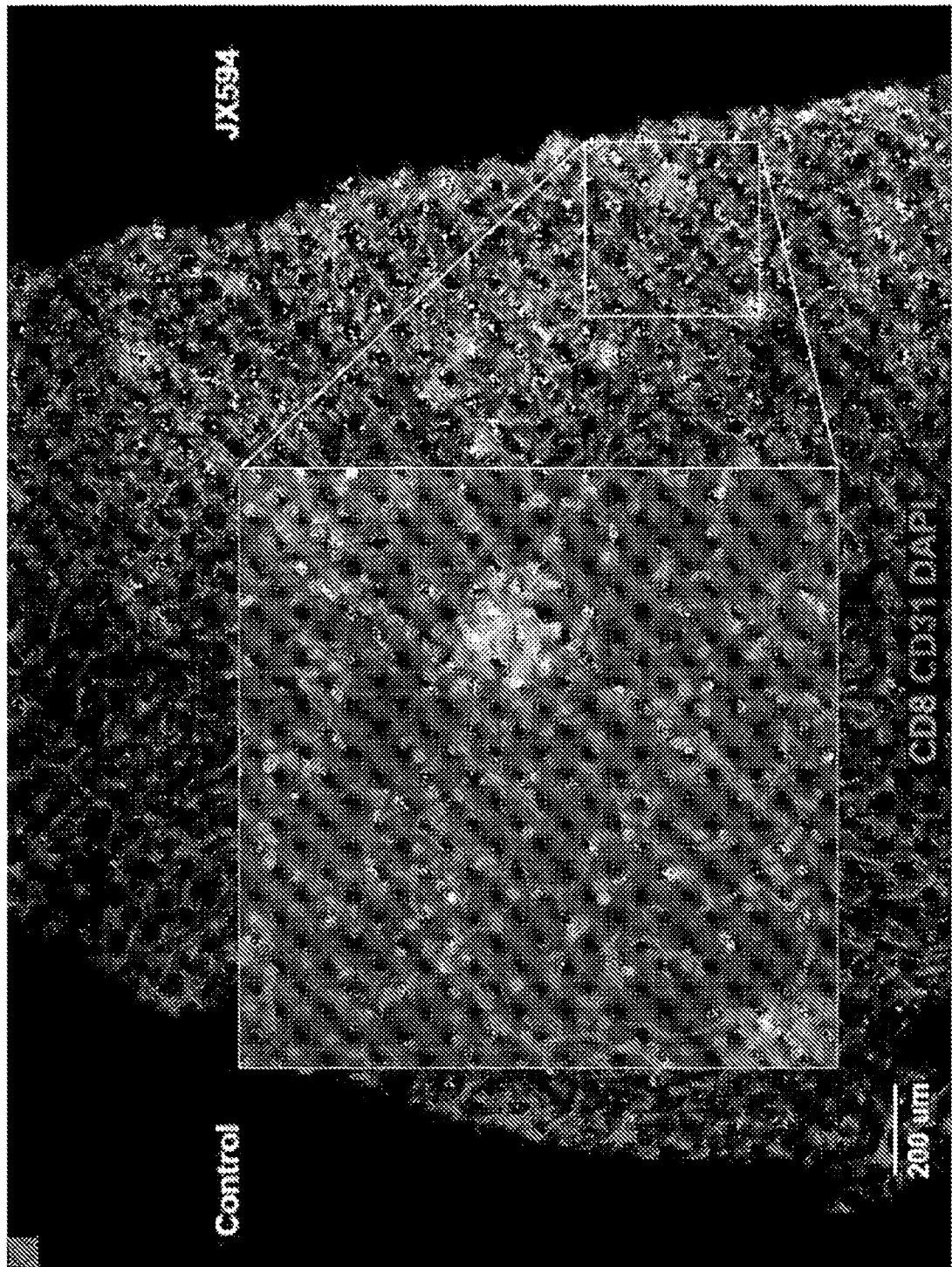


Figura 15

Figura 16



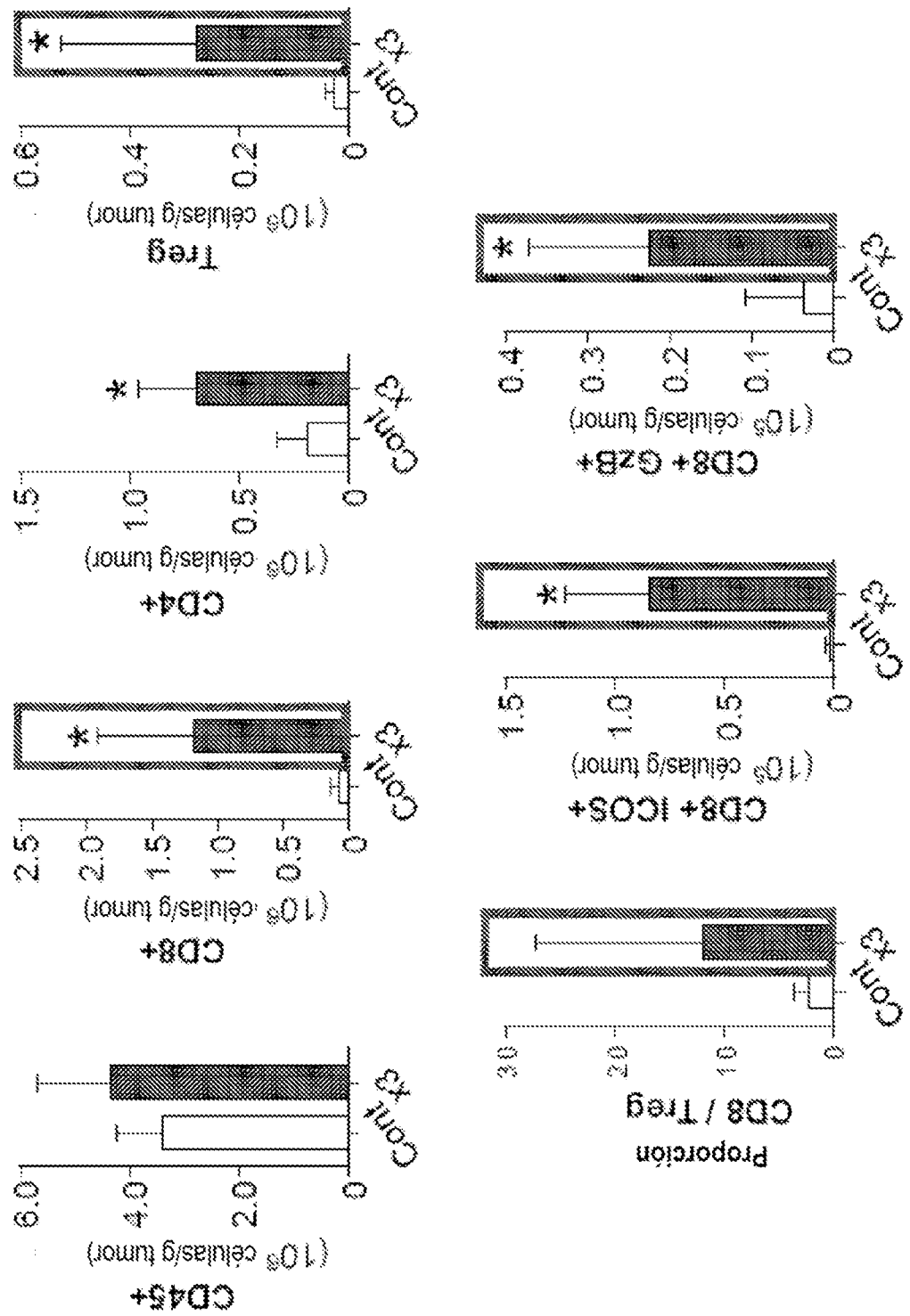


Figura 17

Figura 18

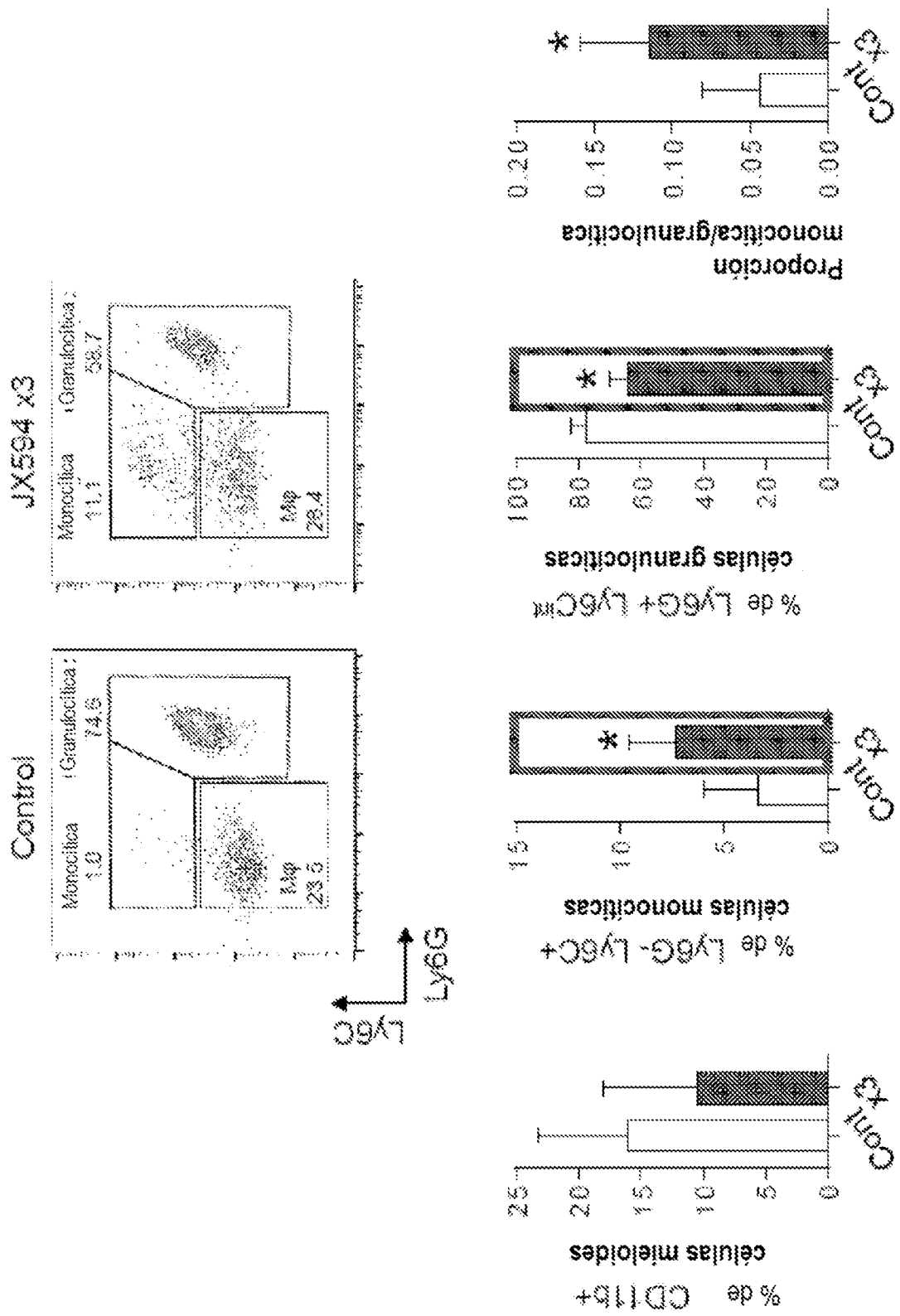


Figura 19

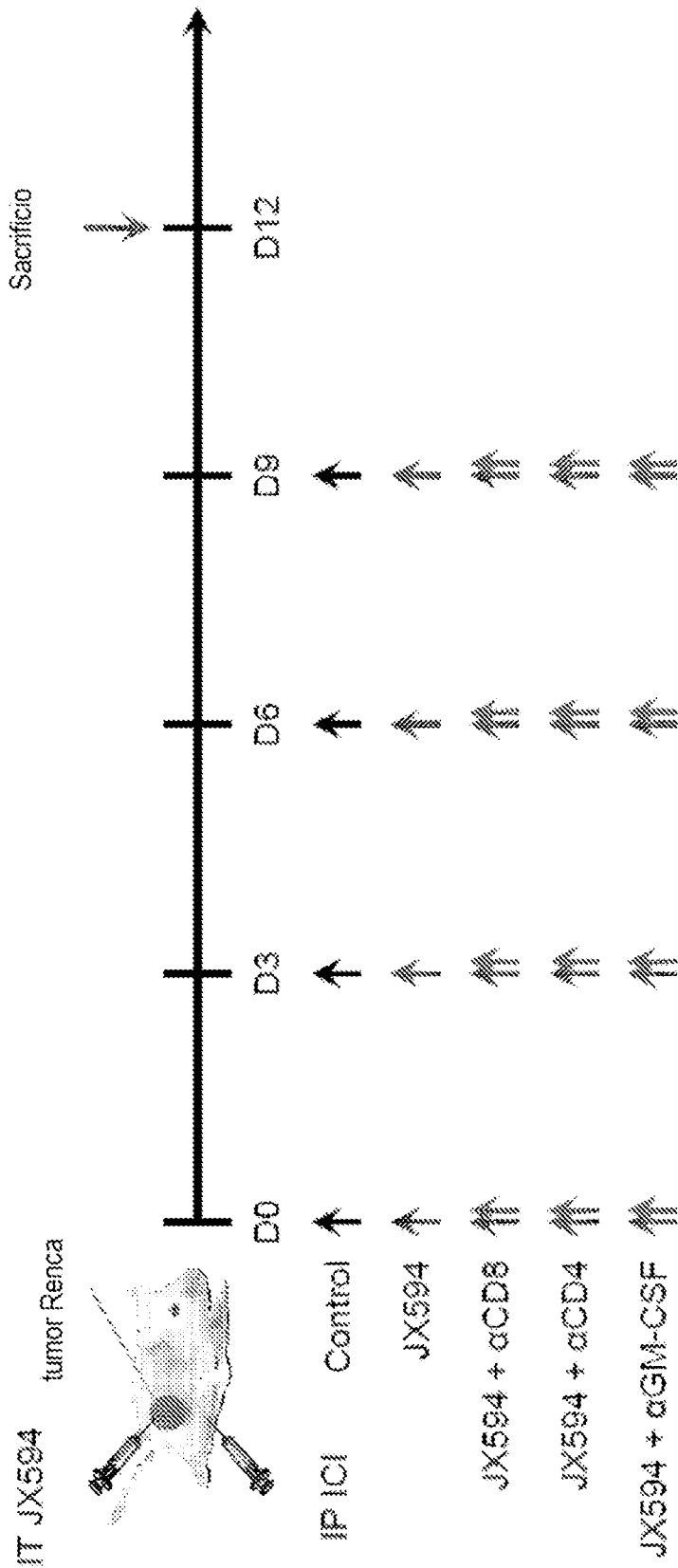
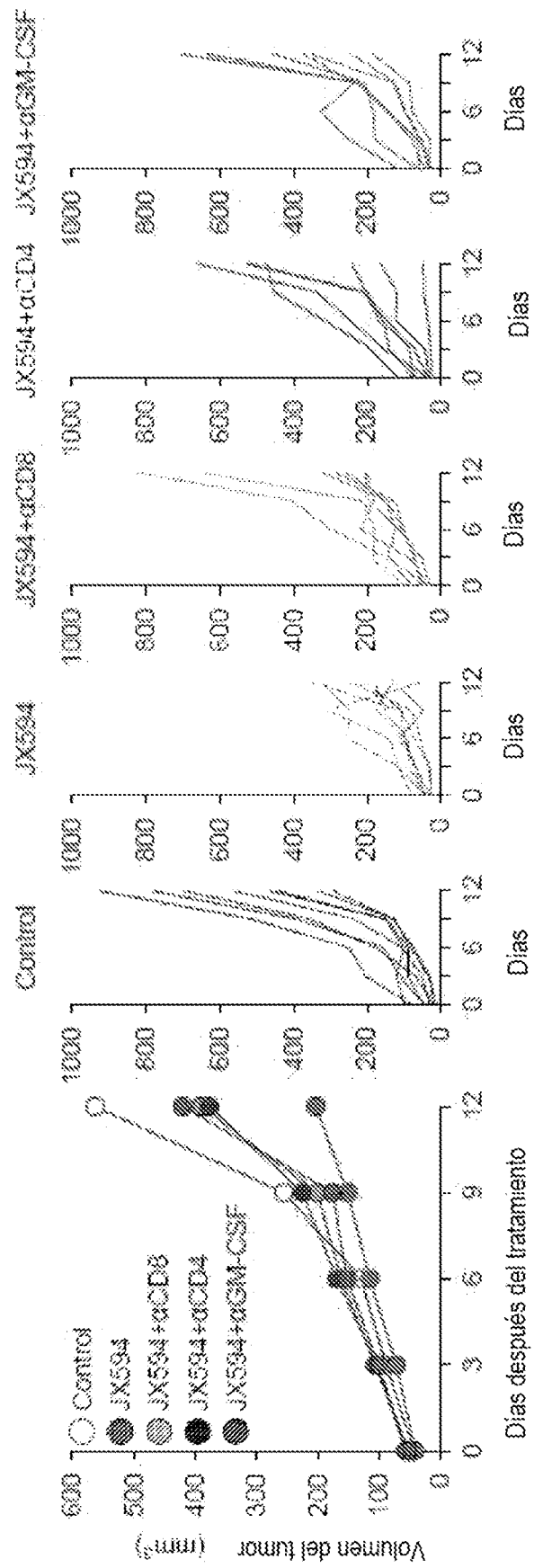


Figura 20



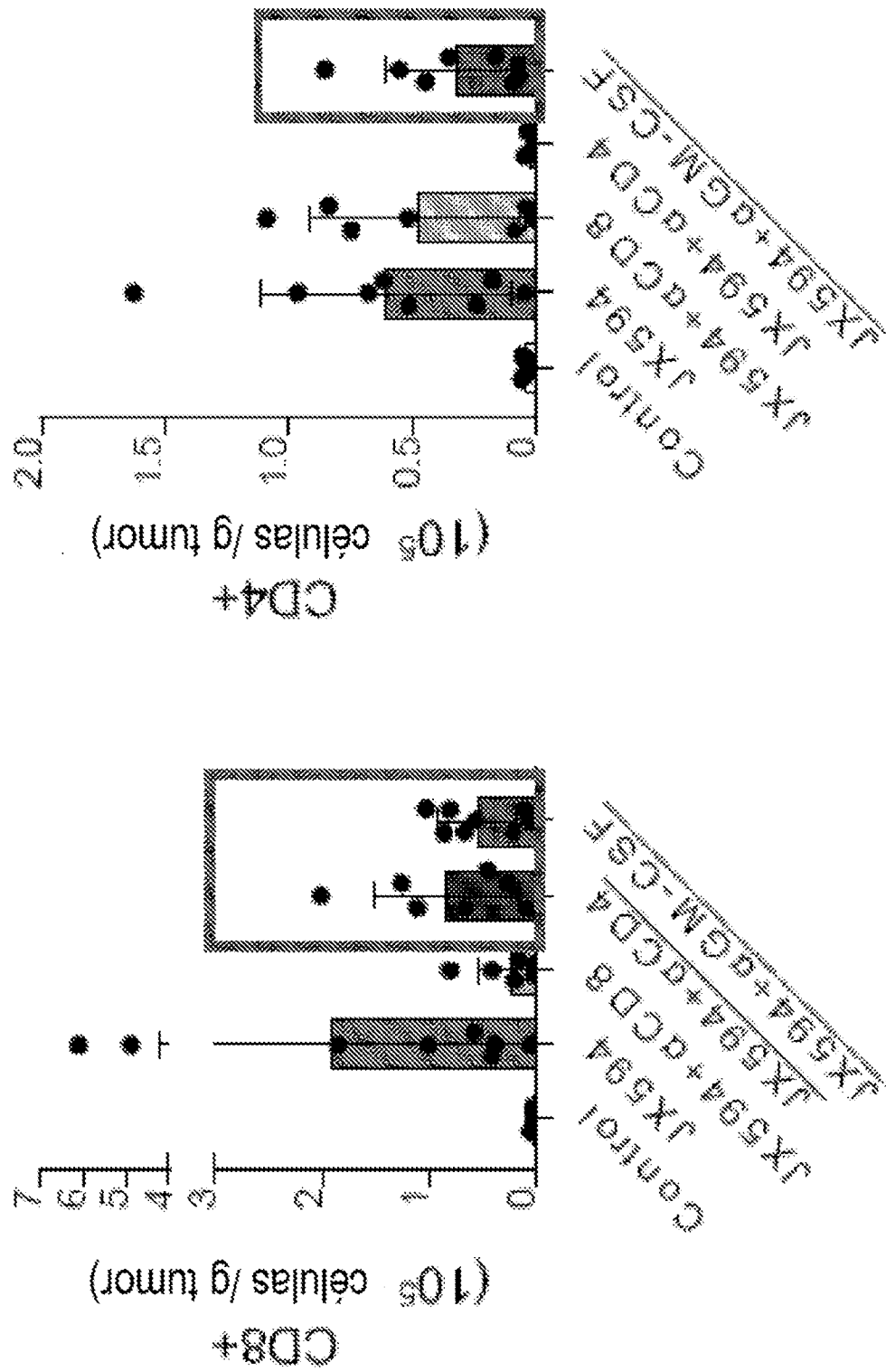


Figura 21

Figura 22

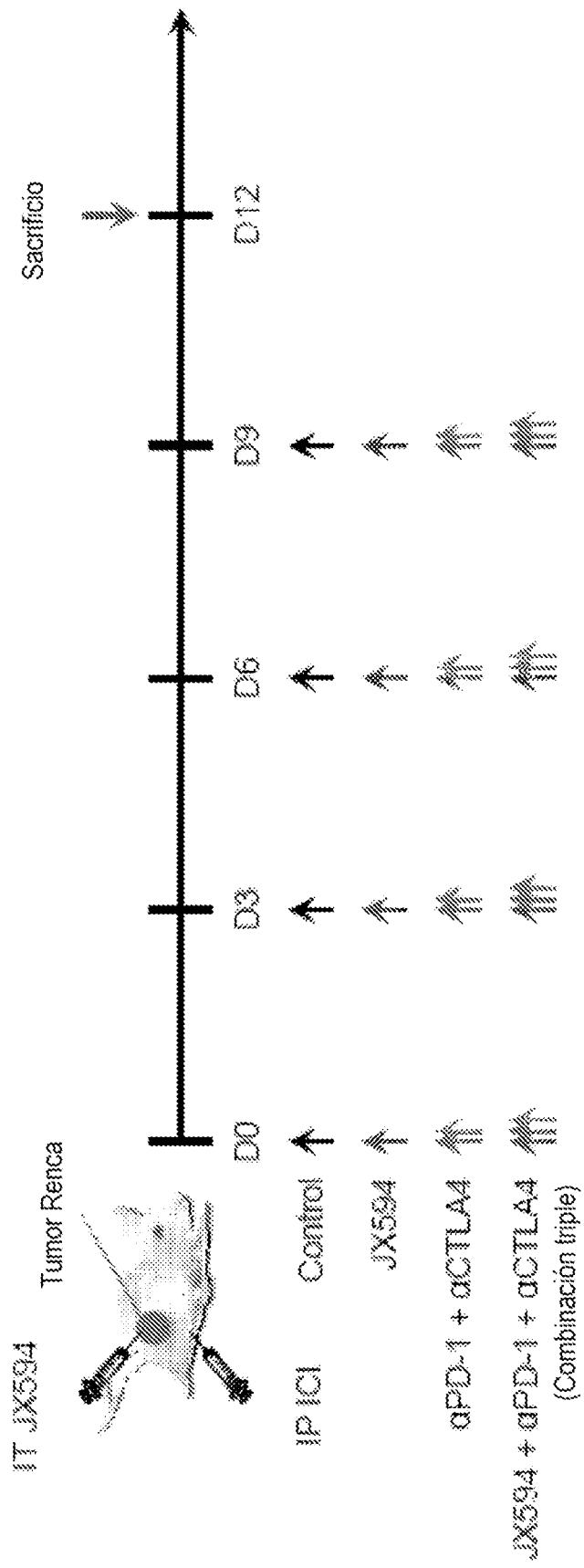


Figura 23

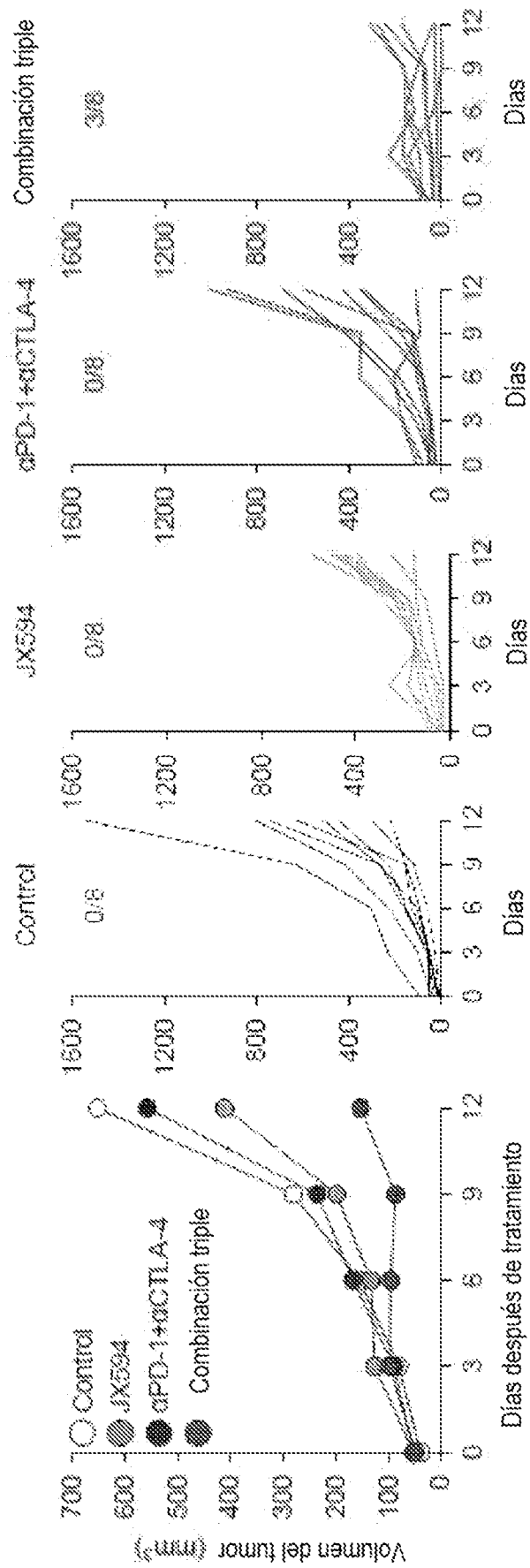


Figura 24

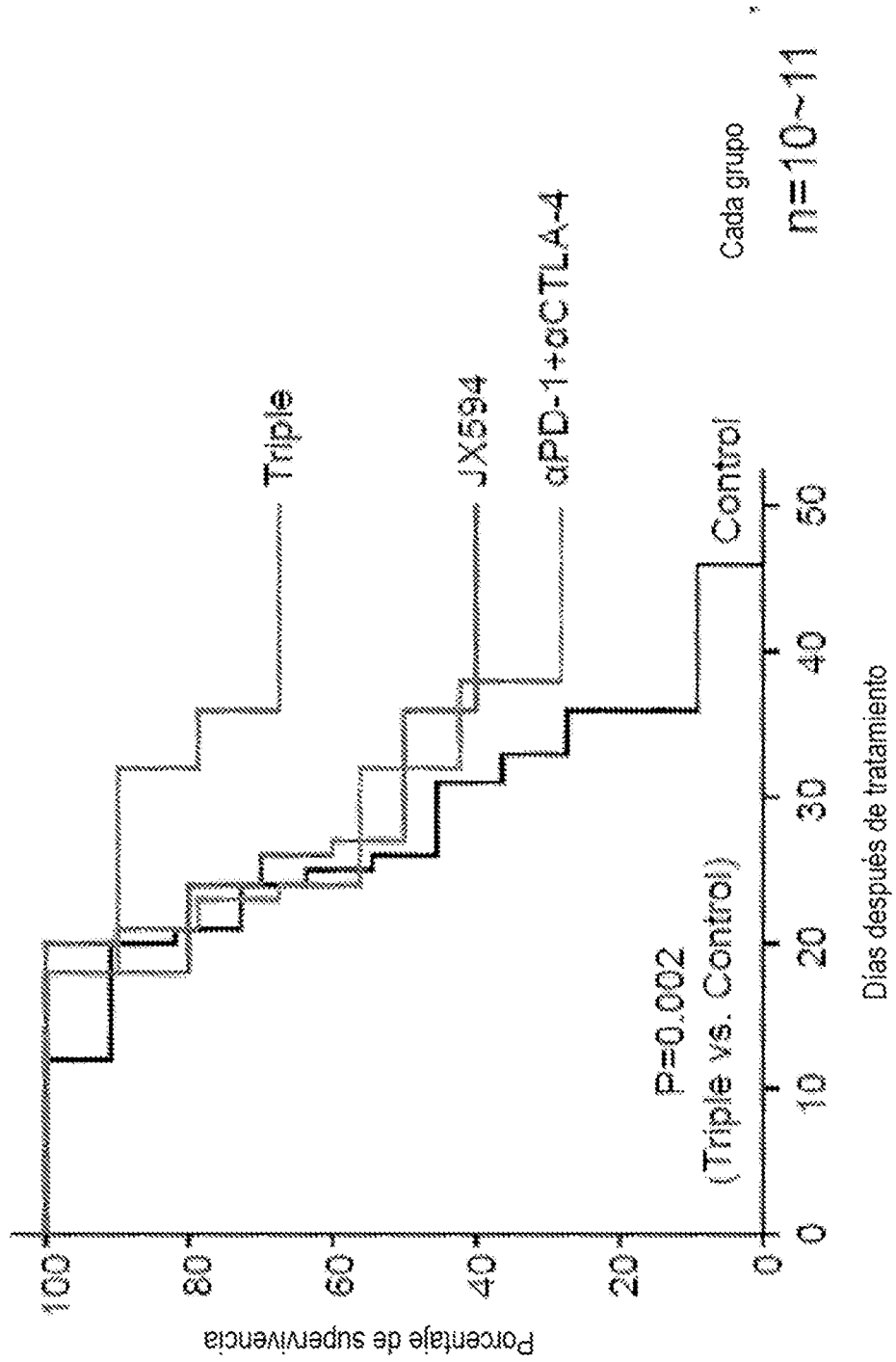


Figura 25

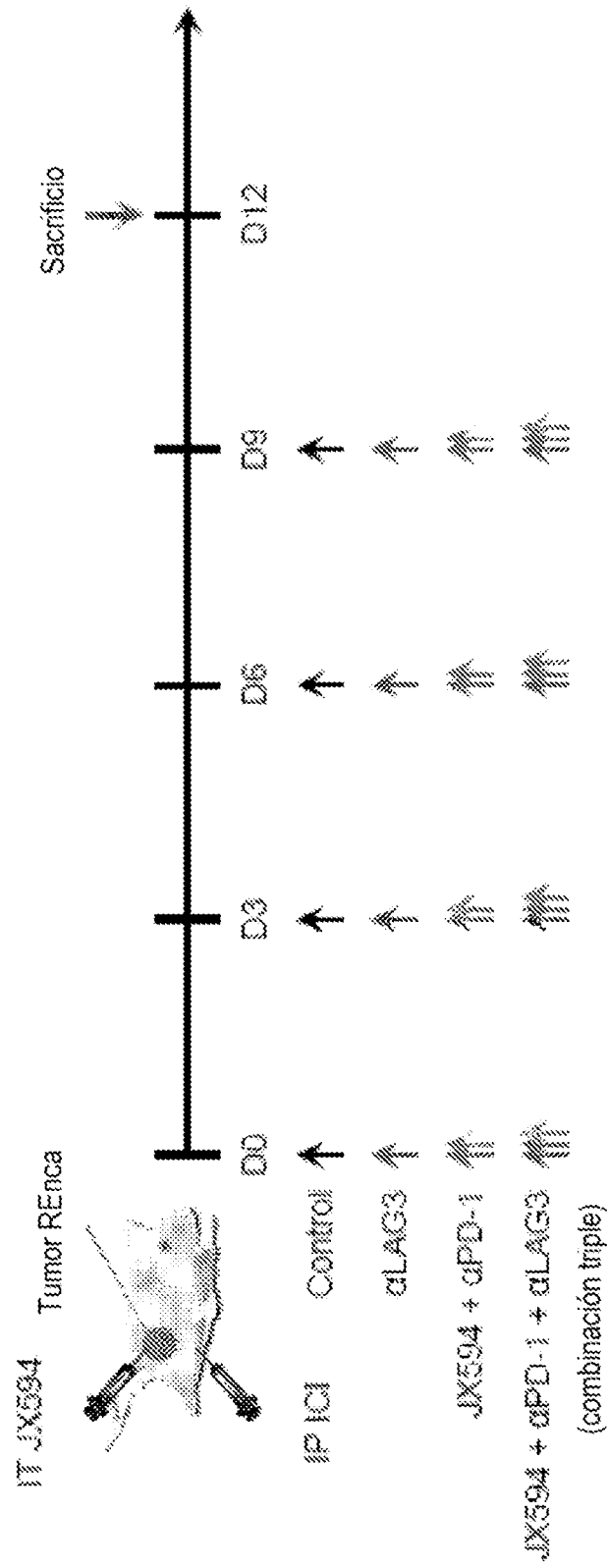
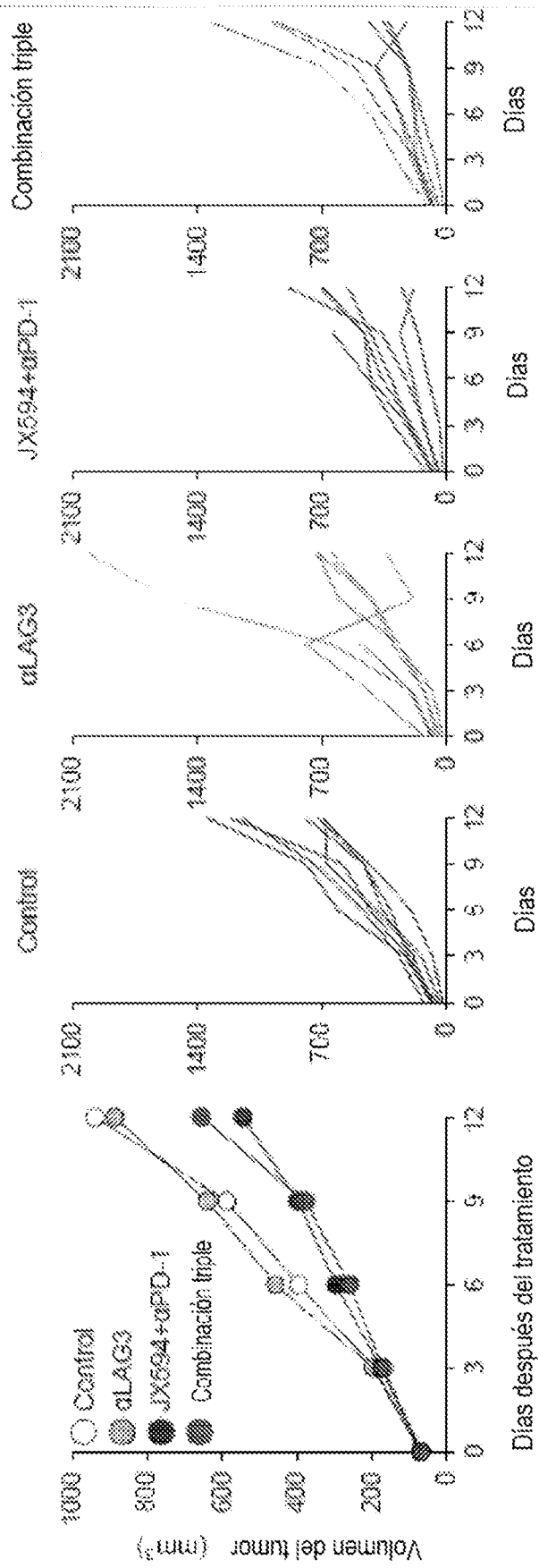


Figura 26



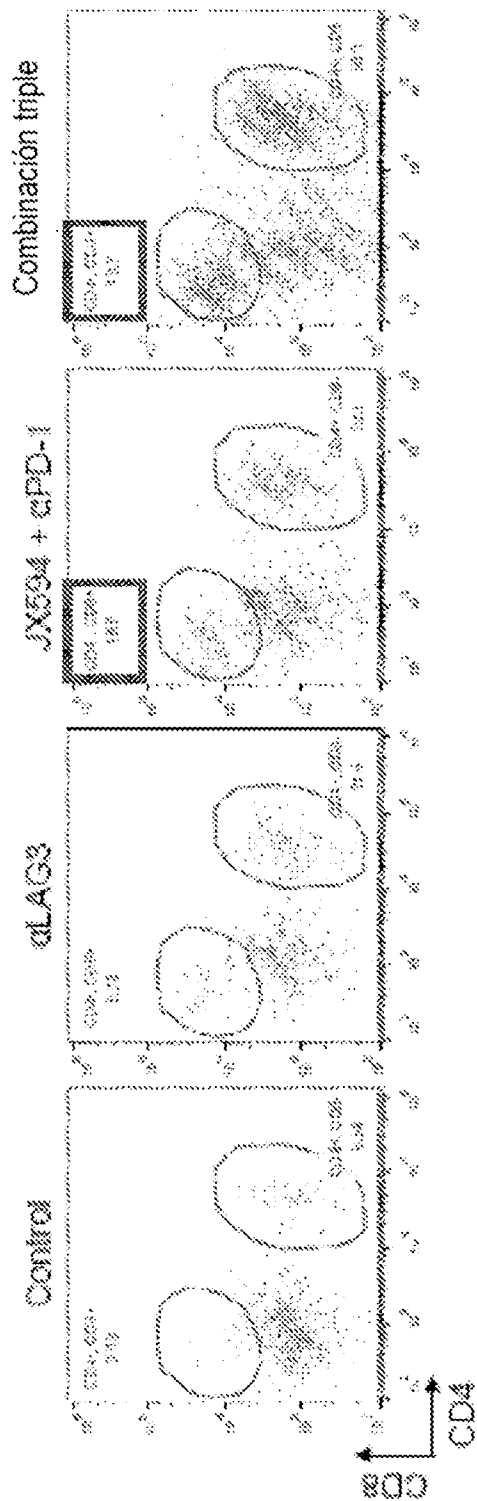


Figura 27

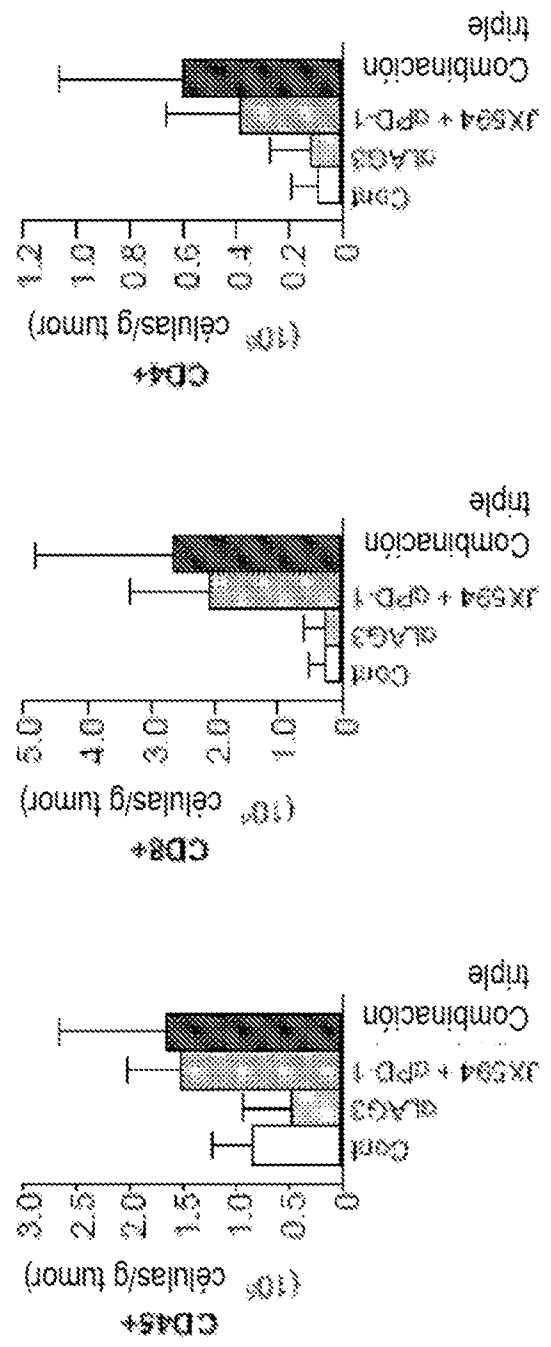


Figura 28

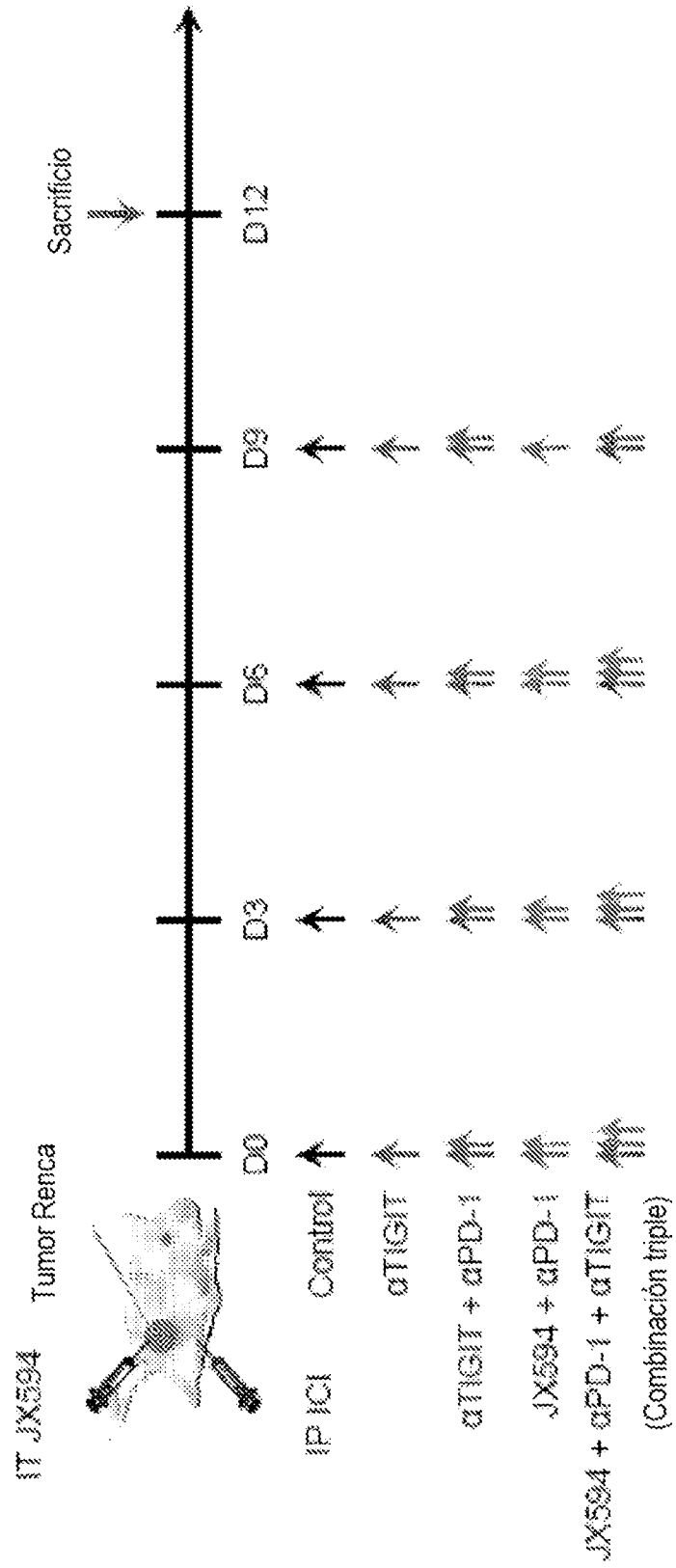


Figura 29

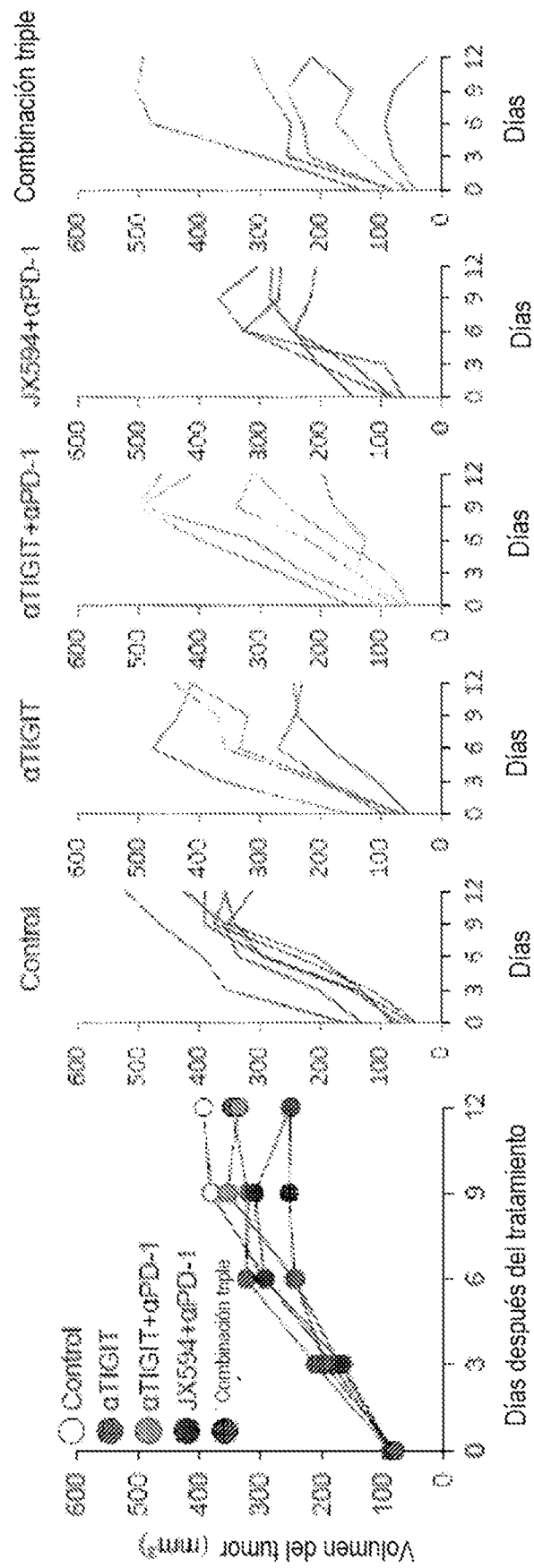


Figura 30

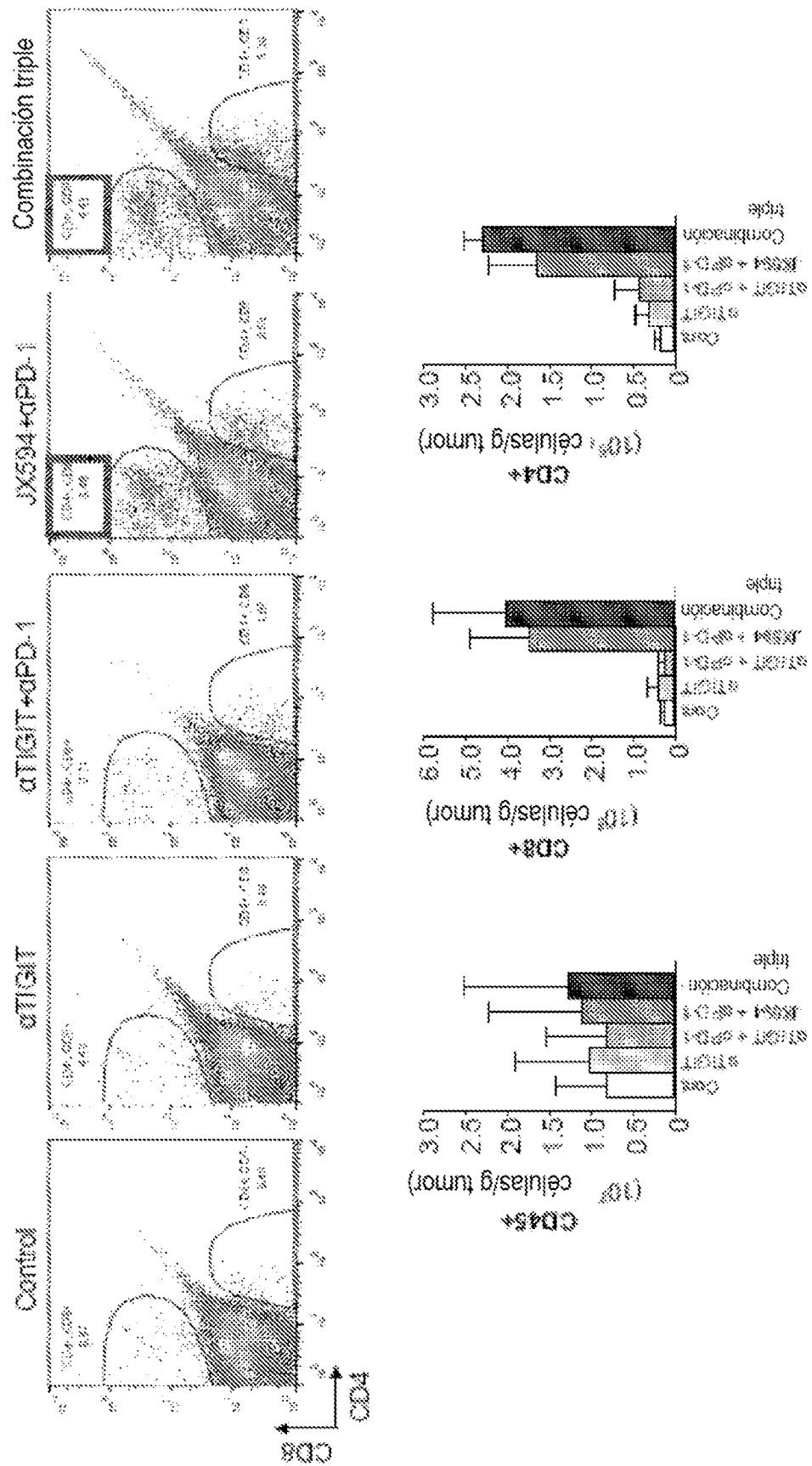


Figura 31

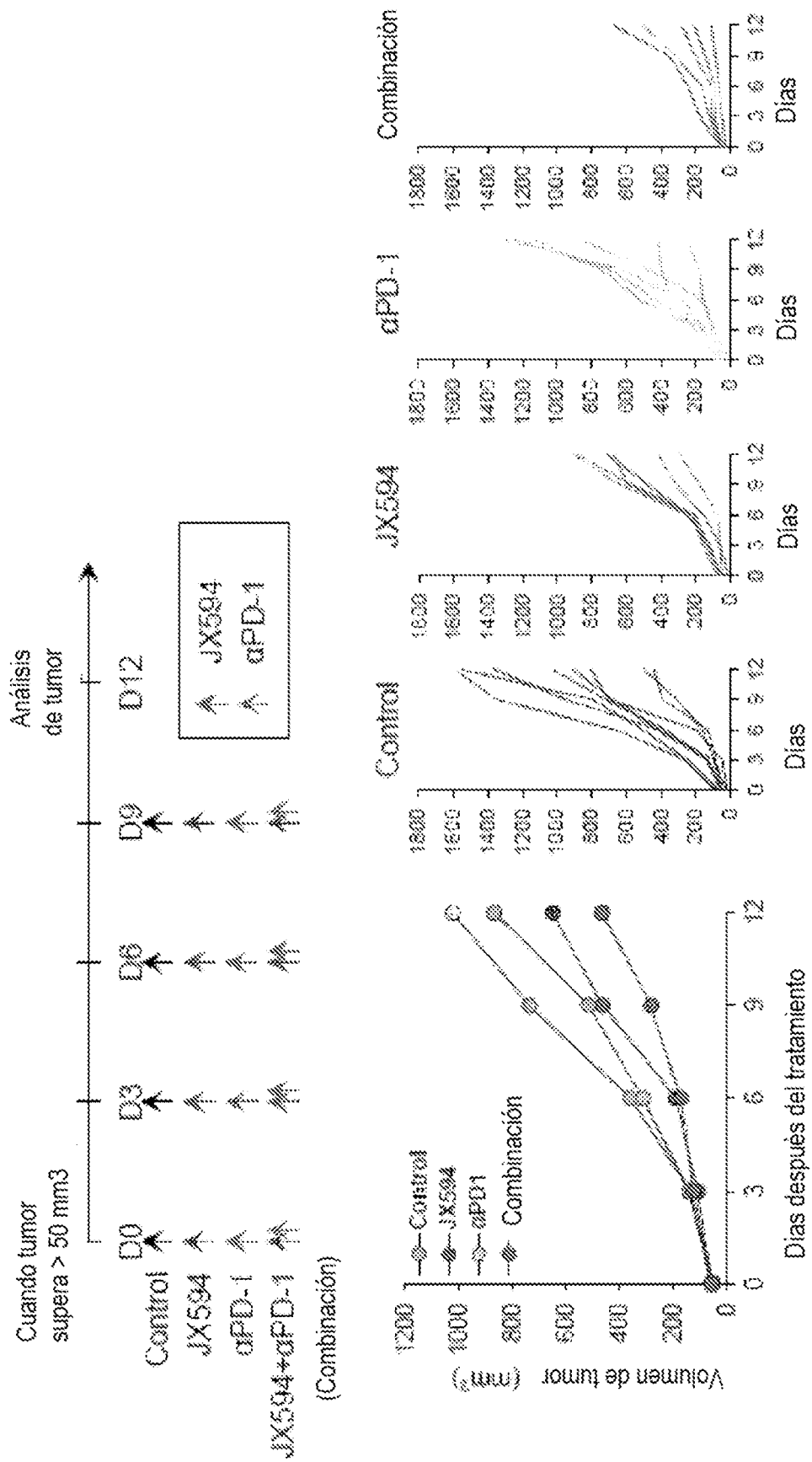
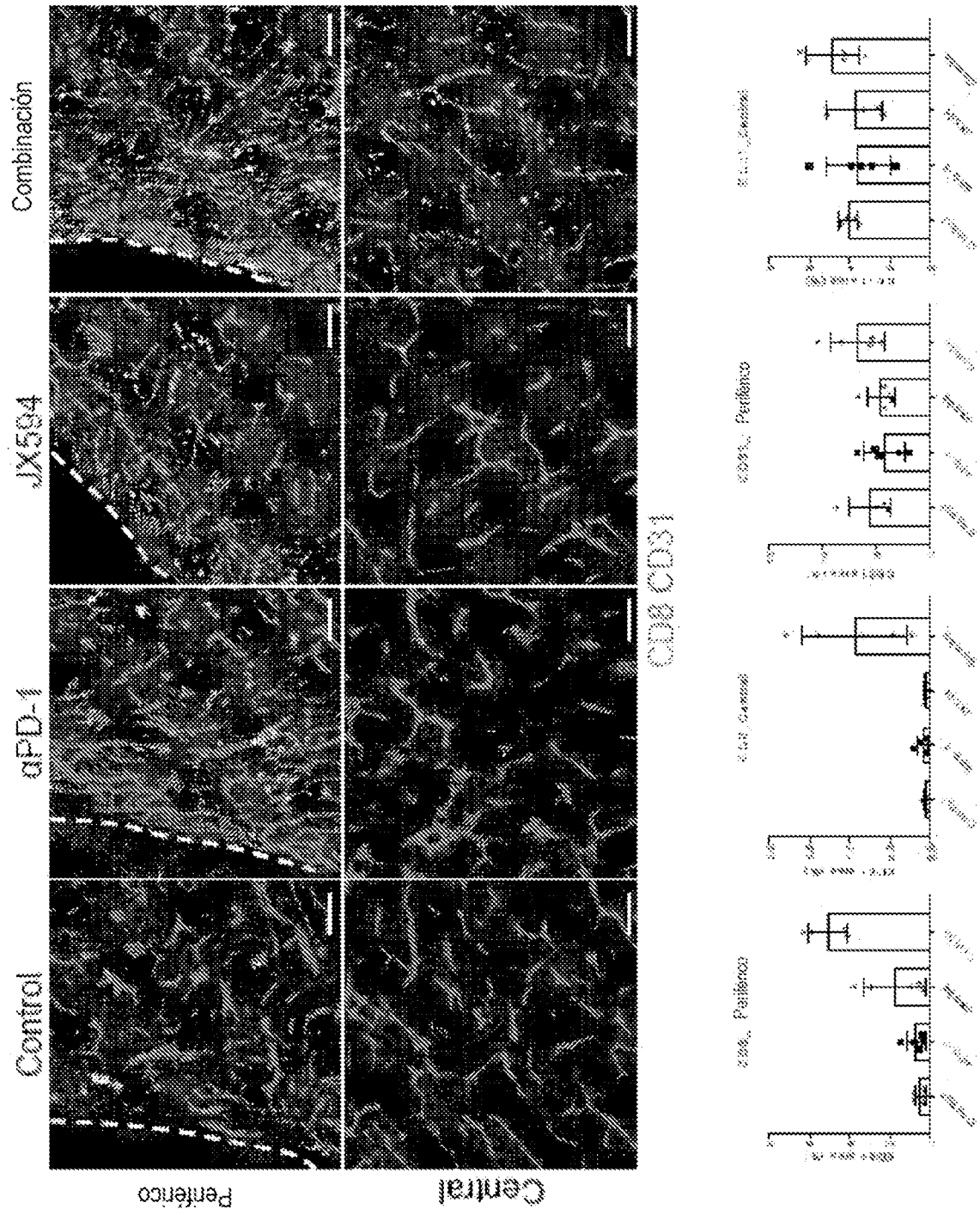


Figura 32



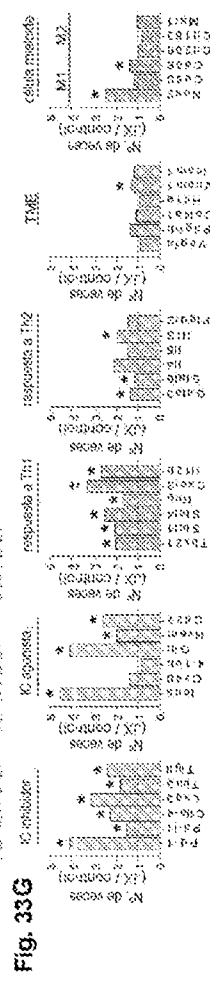
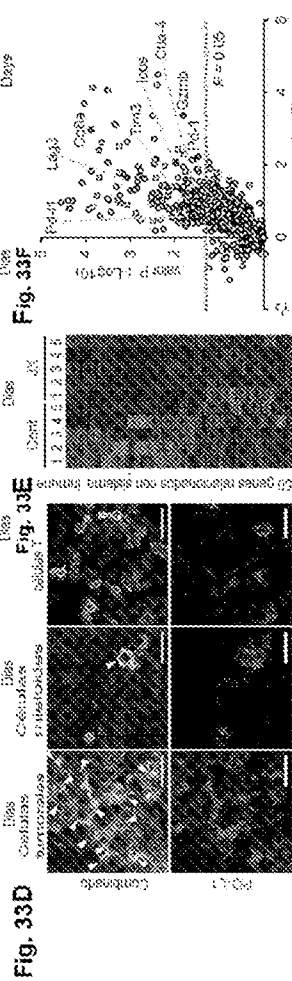
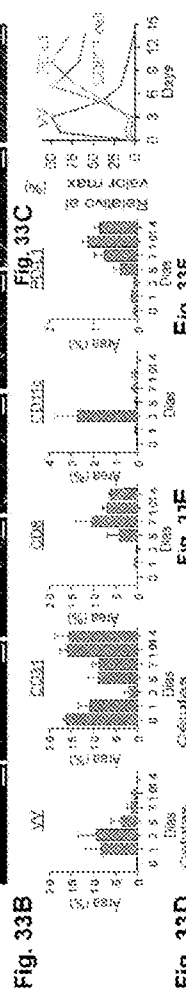
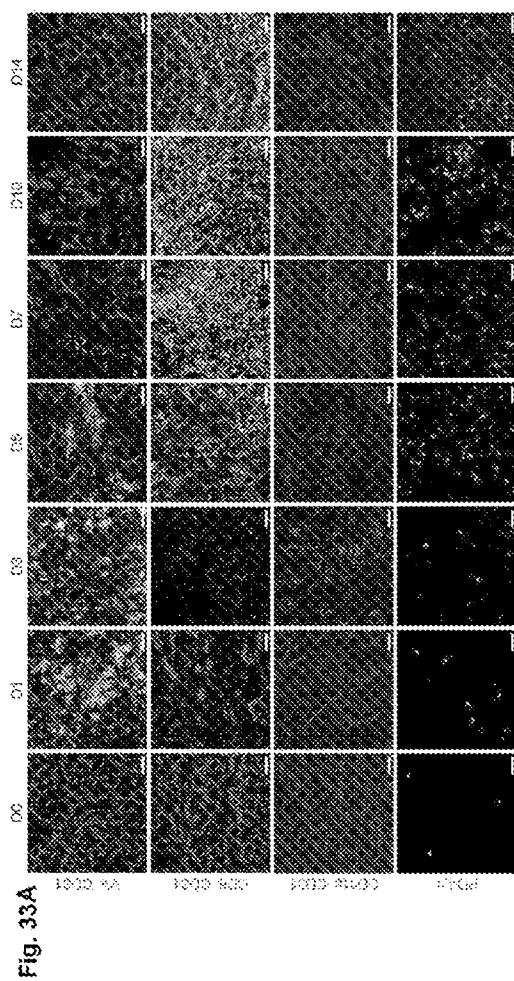


Figura 34A

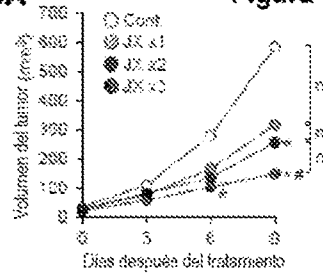


Figura 34B

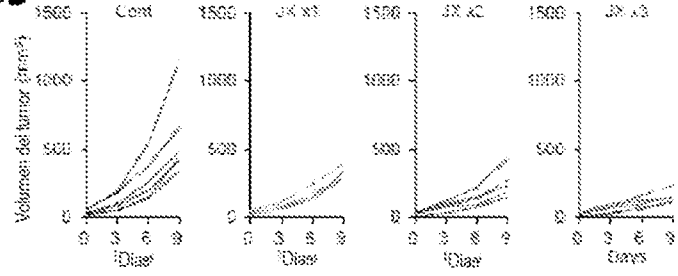


Figura 34C

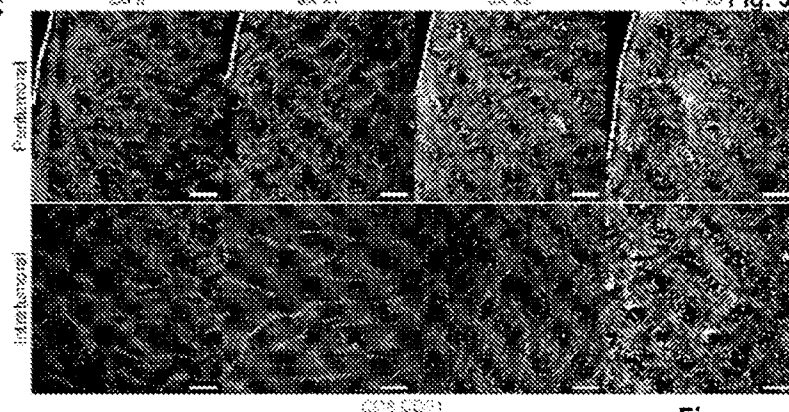


Fig. 34D

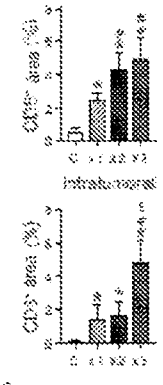


Figura 34E

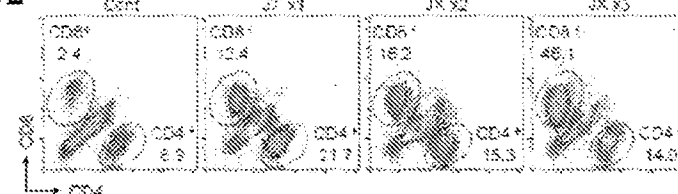


Figura 34F

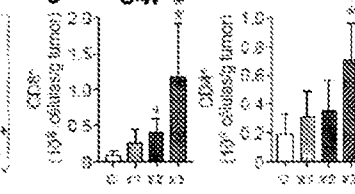


Figura 34G

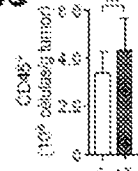


Fig. 34H

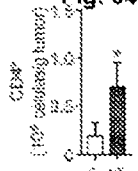


Fig. 34I

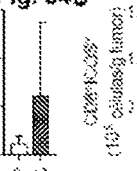


Fig. 34J



Figura 34K

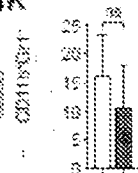


Fig. 34L



M

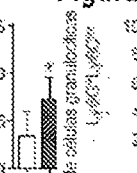


Figura 34M

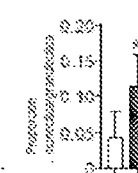


Figura 35A

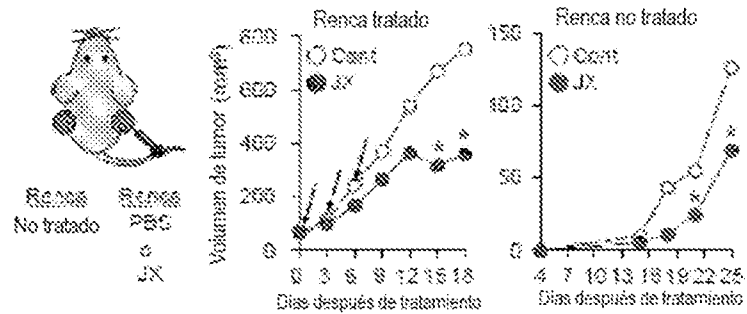


Figura 35 B

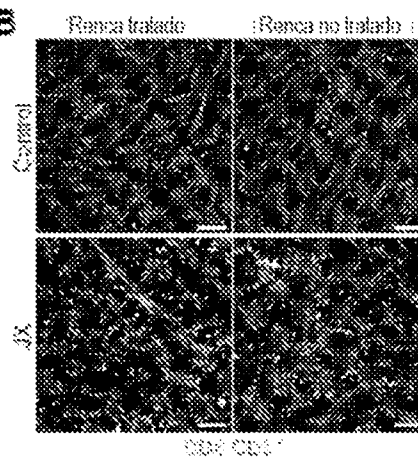


Figure 35C

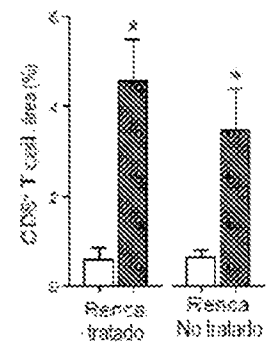


Figura 35D

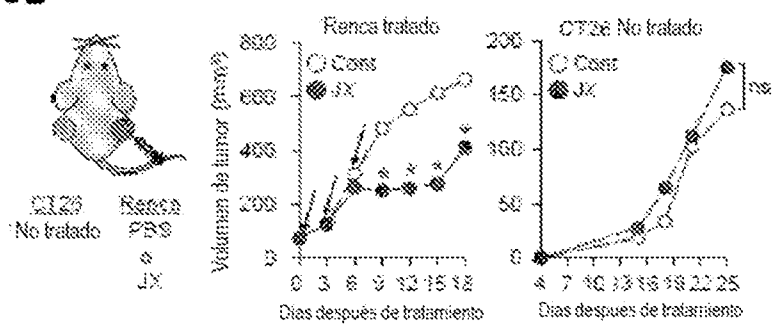


Figura 35 E

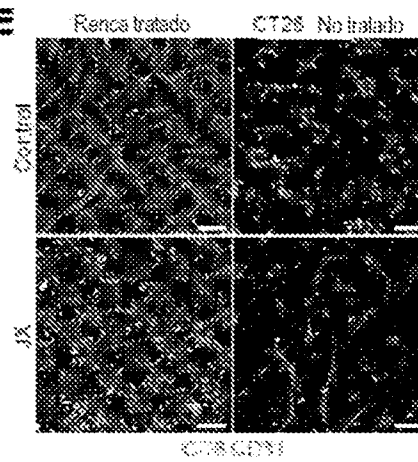


Figura 35F

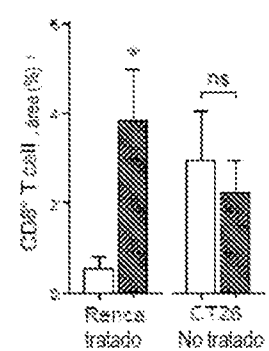


Figura 36A



Fig. 36B

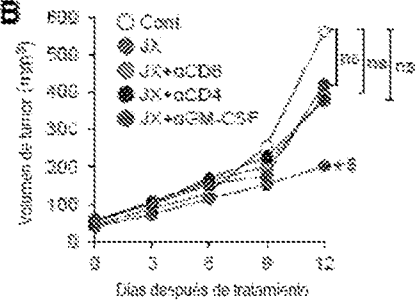


Figura 36C

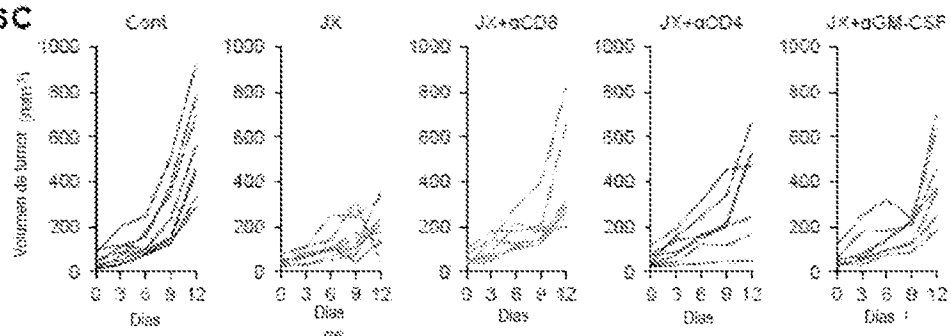


Figura 36D

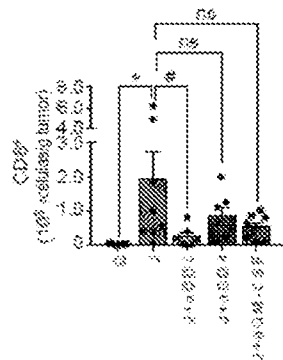


Figura 36E

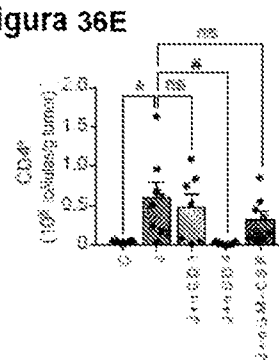


Figura 37A

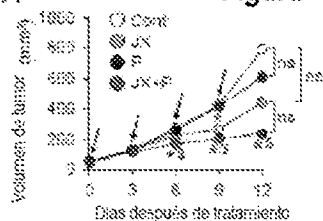


Figura 37 B

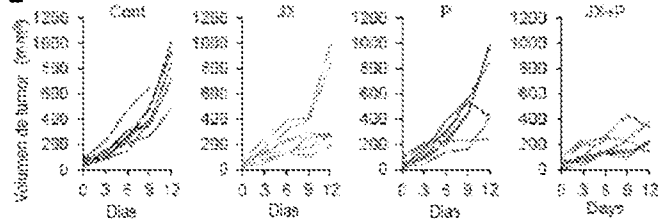


Figura 37c

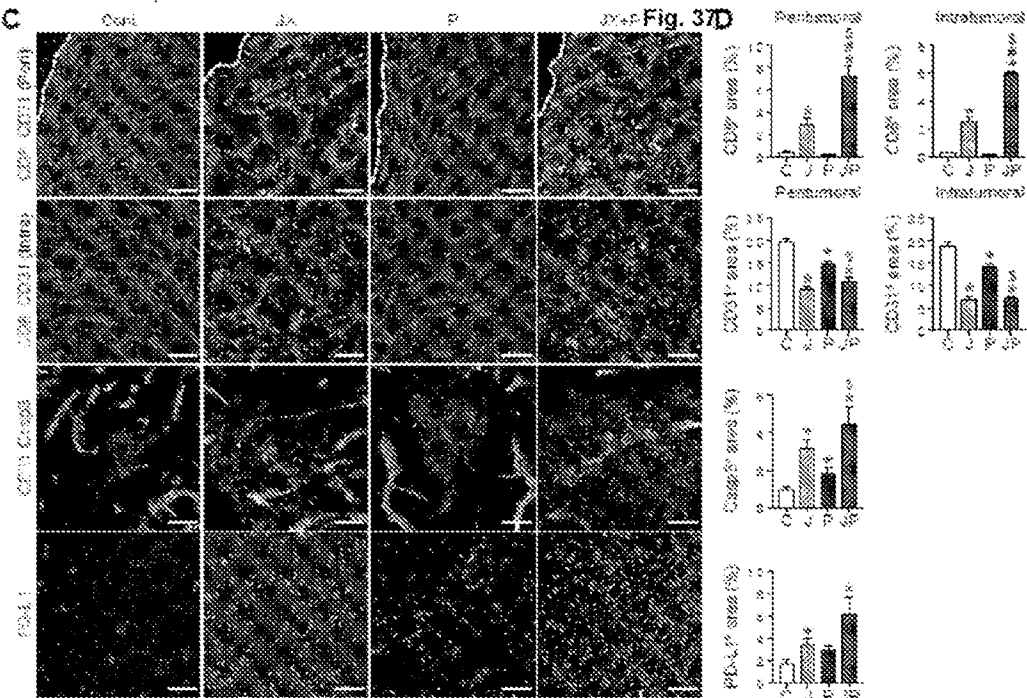


Figura 37E

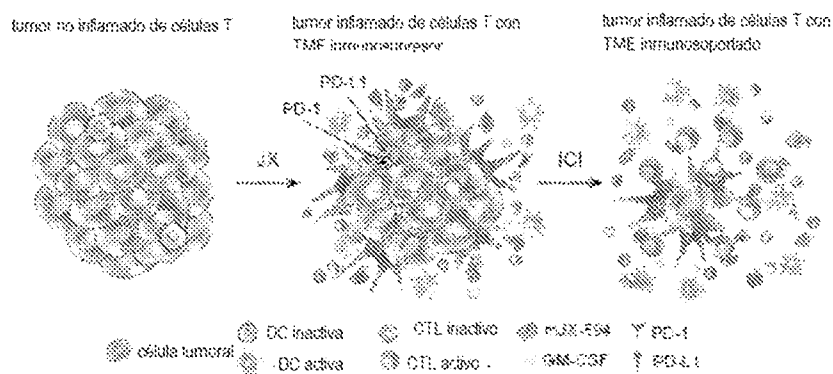


Figura 38A

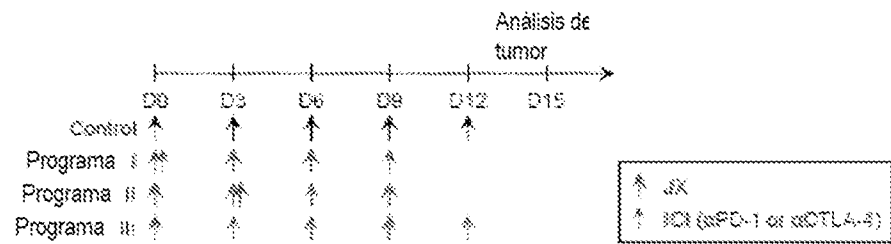


Figura 38B

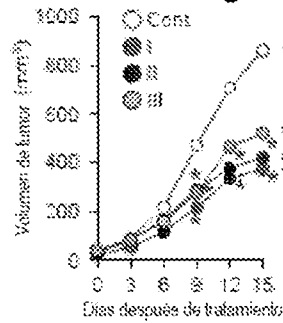


Figura 38C

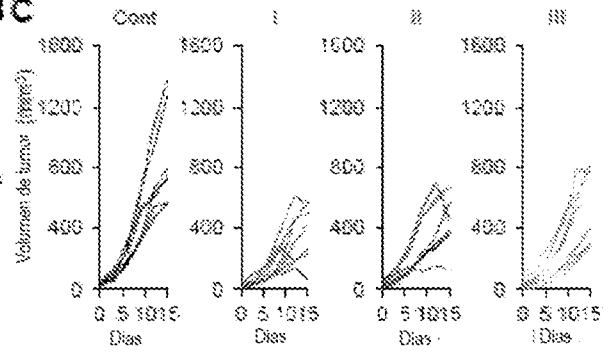


Figura 38D

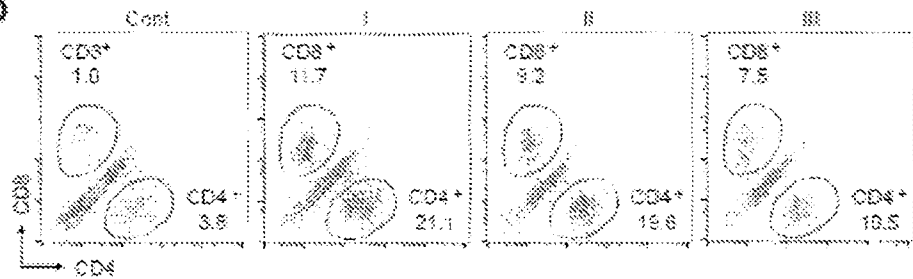


Figura 38E

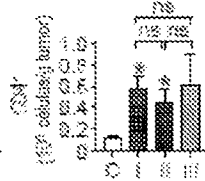
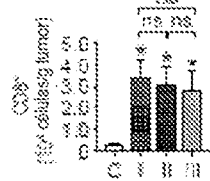


Figura 38F

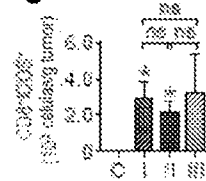


Figura 39A

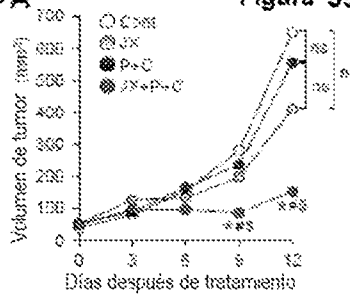


Figura 39B

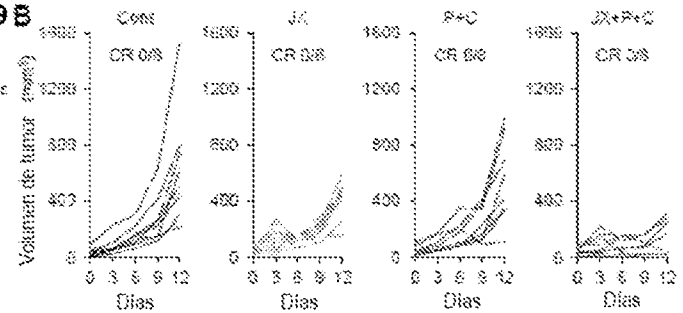


Figura 39C

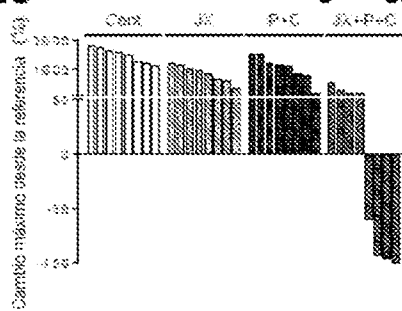


Figura 39D

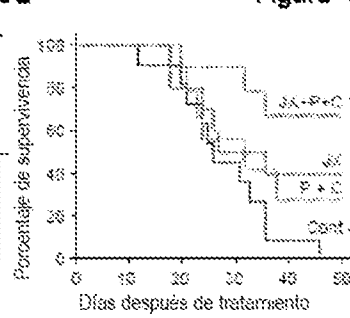
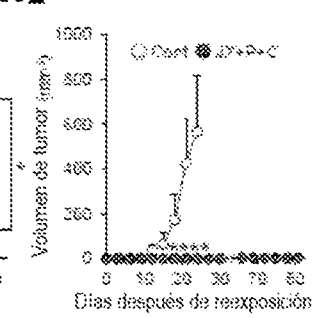


Figura 39E



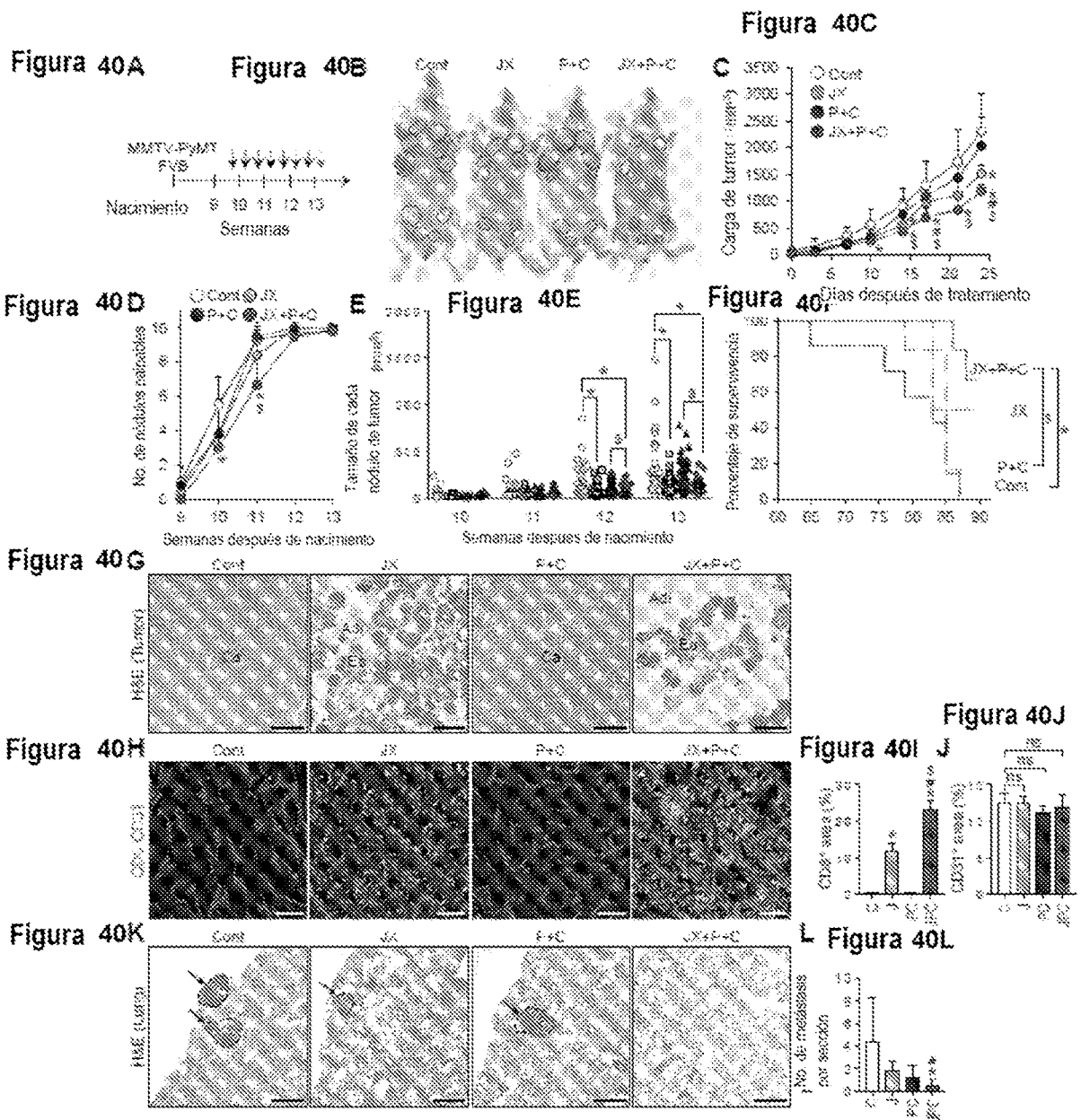


Figura 41

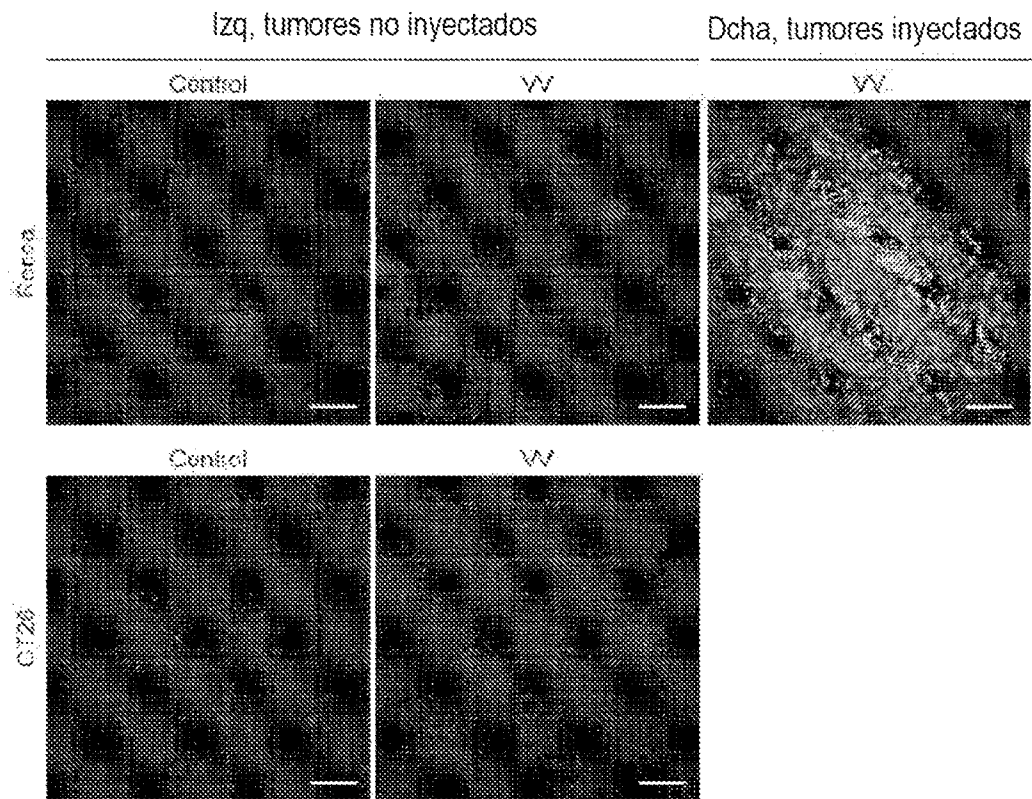


Figura 42A

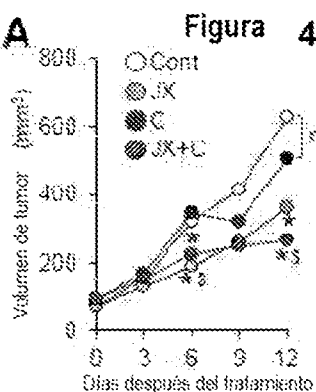


Figura 42B

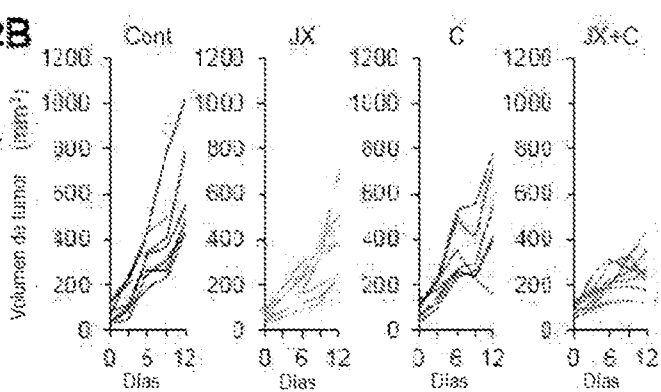


Figura 42C

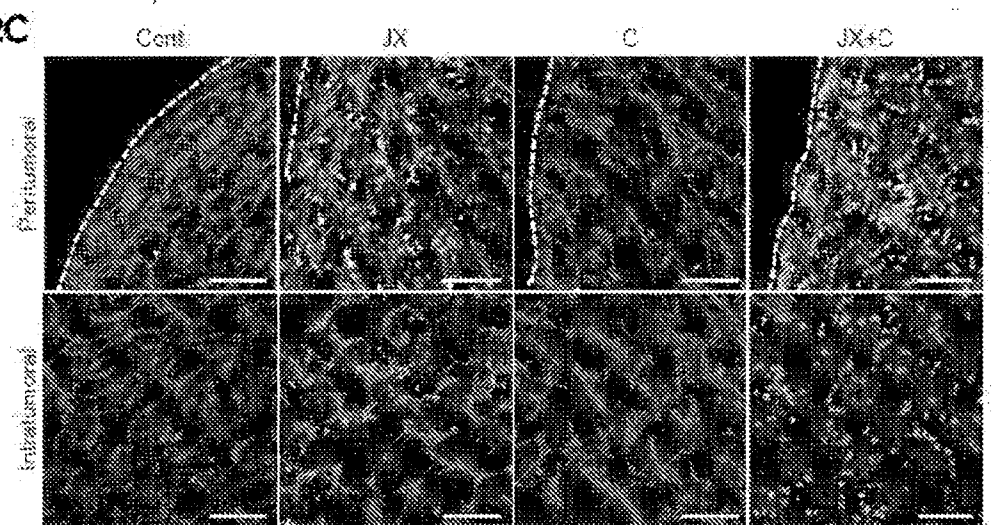


Figura 42D

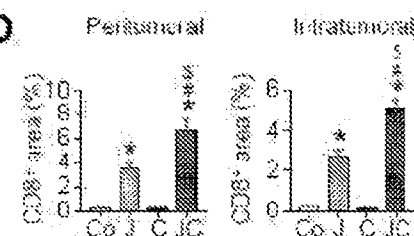


Fig. 42E

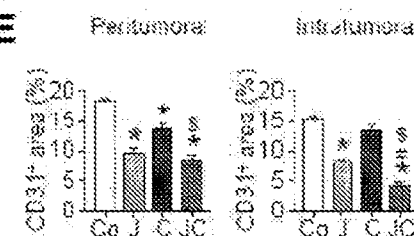


Figura 42F

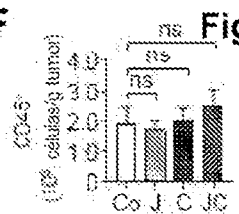


Fig. 42G

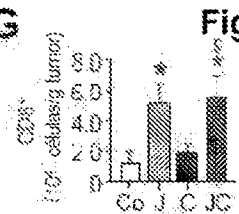


Fig. 42H

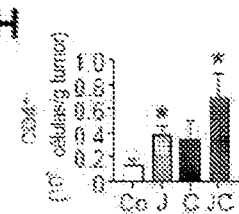


Figura 43A

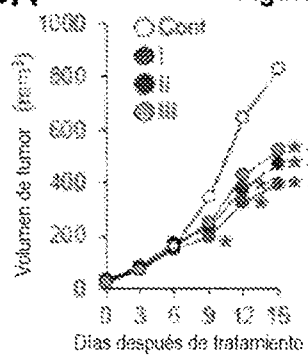


Figura 43B

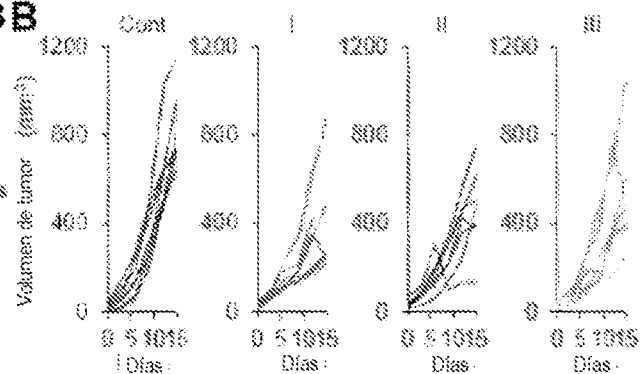


Figura 43C

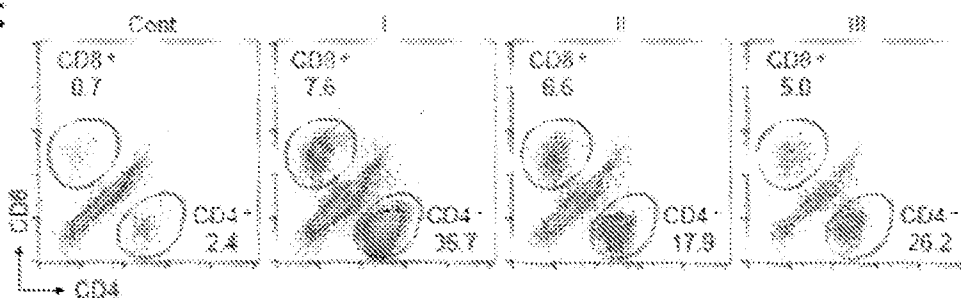


Figura 43D

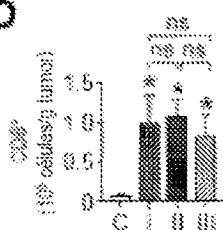


Figura 43E

