

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 611**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)	<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/19</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)		
<b>A61K 35/761</b>	(2015.01)		
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/20</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/21</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 7/01</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2016** **PCT/US2016/057526**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017** **WO17070110**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2016** **E 16858069 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 3365062**

54 Título: **Métodos de tratamiento de tumores sólidos o linfáticos mediante terapia combinada**

30 Prioridad:

**19.10.2015 US 201562243512 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.01.2025**

73 Titular/es:

**CG ONCOLOGY, INC. (100.00%)**  
**400 Spectrum Center Drive, Suite 2040**  
**Irvine, CA 92618, US**

72 Inventor/es:

**YEUNG, ALEX WAH, HIN y**  
**KUAN, ARTHUR**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

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

ES 2 994 611 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de tumores sólidos o linfáticos mediante terapia combinada

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la administración local de una combinación de un agente infeccioso y uno o más inmunomoduladores para inmunoterapia del cáncer.

## 10 Antecedentes de la invención

El sistema inmunológico humano, tanto innato como adaptativo, es un sistema extremadamente complejo que aún no se ha utilizado con éxito para combatir el cáncer. Una explicación es que, dado que los cánceres generalmente se desarrollan en la última etapa de la vida, el desarrollo de una respuesta inmunológica para contrarrestar el cáncer no es vital para la teoría de supervivencia del más apto en el proceso evolutivo. Con toda probabilidad, los diferentes aspectos del sistema inmunológico humano no están diseñados específicamente para ese propósito, que significa matar células que se consideran "propias". Incluso después de una extirpación extensa del tumor primario sigue siendo un problema prevenir la formación de metástasis, ya sea por crecimiento de micrometástasis ya presentes en el momento de la cirugía o por la formación de nuevas metástasis por células tumorales o células madre tumorales que no se han eliminado completamente o que se han vuelto a unir después de la cirugía. Esencialmente, para etapas posteriores del cáncer, la cirugía y/o la radioterapia sólo pueden ocuparse de las lesiones macroscópicas, mientras que en la mayoría de los pacientes sus cánceres reaparecerán y no serán susceptibles a terapias adicionales.

Más recientemente, la FDA ha aprobado dos agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer de próstata y el melanoma. El primer agente, Provenge, utiliza una molécula de fusión GM-CSF con un antígeno prostático para activar las células mononucleares o presentadoras de antígenos de pacientes con cáncer en etapa avanzada *in vitro* y es capaz de prolongar la supervivencia general de estos pacientes. El segundo agente es un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, que demostró producir un efecto potenciador profundo en la generación de linfocitos T efectores. También se ha demostrado que un virus oncolítico CG0070 desencadena una respuesta completa a largo plazo entre pacientes con cáncer de vejiga después de una serie de seis tratamientos intravesicales semanales (véase Burke JM, *et al.* Journal of Urology Dec, 188 (6) 2391-7, 2012).

Los métodos actuales de inmunoterapia contra el cáncer enfrentan varios desafíos fundamentales. Por ejemplo, normalmente, los linfocitos T inmunológicos específicos del tumor en pacientes con cáncer, incluso cuando están presentes, sólo ocurren con baja frecuencia de forma sistémica. La razón probable es que la antigenicidad y la inmunogenicidad específica de los antígenos tumorales de los cánceres comunes son generalmente débiles, así como la presencia de una abrumadora cantidad de actividades supresoras a través de citocinas y células reguladoras, tales como Treg, macrófagos asociados a tumores, etc. Adicionalmente, se ha comprobado que los conceptos más antiguos de utilizar componentes no específicos para potenciar la respuesta inmunitaria contra componentes específicos tienen poco éxito, ya que la capacidad del cuerpo humano para generar respuestas inmunológicas muy específicas contra sus propias células está limitada por la naturaleza. Después de todo, la mayoría de las células cancerosas no son lo suficientemente inmunogénicas como para ser diferentes de las células normales. Esta respuesta inmunológica deriva de componentes inmunológicos no específicos, incluso si se genera, también será de corta duración.

Por al menos las razones tratadas anteriormente, durante décadas se han probado, sin mucho éxito, vacunas terapéuticas contra el cáncer preformuladas e *in vitro* que utilizan antígenos tumorales y adyuvantes disponibles. Existe una clara necesidad de métodos de inmunoterapia contra el cáncer con mayor eficacia.

Ishihara M. *et al.*, (2014) PLOS ONE, 9, p e104669 describe los efectos tumorocidas sistémicos mediados por linfocitos T CD8+ mediante el tratamiento intratumoral del virus del herpes simple oncolítico con el anticuerpo monoclonal agonista para el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides murino.

Bramante S. Faculty of Medicine of the University of Helsinki Academic Dissertation, 2 de octubre de 2015, páginas 1-101 describe el adenovirus oncolítico que codifica GM-CSF en el tratamiento del cáncer.

El documento US 2015/190505 describe una vacuna contra el cáncer que se utilizará para tratar el cáncer de vejiga y que comprende la administración de un virus oncolítico y un anticuerpo anti-CTLA4.

## Breve resumen de la invención

La presente solicitud proporciona, en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de un inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. La administración local de los componentes terapéuticos (por ejemplo, un agente infeccioso, inmunomodulador(es) y células tumorales inactivadas) en el sitio del tumor es un

requisito clave de la presente invención.

Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, la presente invención se basa en parte en un concepto de "en" el sitio del tumor para administrar componentes terapéuticos y provocar una respuesta inmunológica, que puede utilizarse para superar los obstáculos presuntamente insuperables en el tratamiento de tumores linfáticos sólidos o resistentes. De acuerdo con el concepto de "en" el sitio del tumor, los componentes terapéuticos se administran "en" el sitio del tumor, en las cantidades efectivas adecuadas, en el momento adecuado y en las secuencias adecuadas. Las cantidades eficaces, el tiempo y las secuencias de los componentes terapéuticos se pueden ajustar independientemente en función de la condición específica del tumor. Por ejemplo, la administración de una combinación de un agente infeccioso, los inmunomoduladores y las células tumorales opcionalmente inactivadas utilizando el concepto "en" el sitio del tumor pueden dar lugar a la cantidad adecuada de moléculas relacionadas con el sistema inmunológico (como GM-CSF) secretadas por el agente infeccioso, de las propias reacciones corporales del individuo y/o de las células tumorales vivas administradas opcionalmente, lo que conduce a una liberación de antígenos que rompen la tolerancia (TBA), que contribuyen a las confirmaciones de señales inmunológicas (tales como las señales 1, 2, 3 de los linfocitos T CD4 y CD8) y a la generación de células efectoras, también "en" los sitios del tumor. De esta manera, se cree que una respuesta inmunoterapéutica contra el cáncer "completa" y específica, que tiene efectos fuertes y duraderos, ocurre justo "en" el sitio del tumor.

Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, se cree que la liberación de antígenos específicos de tumores o selectivos que rompen la tolerancia (TBA) previamente desconocidos por el proceso infeccioso en tiempo real en los sitios del tumor puede desempeñar un papel crítico en este proceso, ya que estos antígenos sólo pueden liberarse en el momento y lugar exactos de la muerte celular. Los TBA pueden consistir en antígenos derivados de tumores o incluso de estructuras vitales para los tumores (tales como células del estroma), y los TBA pueden no haber sido transcritos previamente por el gen AIRE (genes reguladores autoinmunitarios en el timo). Por añadidura, se cree que la liberación de TBA es un fenómeno transitorio que debe capturarse en el sitio del tumor.

En el marco del concepto de "en" el sitio del tumor, también se cree que el uso de inmunomoduladores, tales como inhibidores de puntos de control inmunitario y agentes inmunoestimulantes, puede ser de inmensa ayuda para proporcionar efectos sinérgicos con el uso de un agente infeccioso y las células tumorales inactivadas directamente "en" los sitios del tumor. Dependiendo de la dosis, la vía de administración y otros factores farmacocinéticos y farmacodinámicos, los inmunomoduladores pueden ejercer diferentes efectos en el organismo y, en particular, en el sistema inmunológico. El concepto de "en" el sitio del tumor en la presente invención requiere que los inmunomoduladores se administren con una dosis y un programa ajustables, en vez de, por ejemplo, expresarse en una dosis fija a partir de un transgén. Por ejemplo, una dosis creciente de administración intravenosa del anticuerpo antagonista anti-CTLA-4 se asocia con un aumento sistémico de células inmunosupresoras, tales como Treg. Los pacientes sólo pueden obtener beneficios en los sitios locales del tumor y en los ganglios linfáticos de drenaje, tal como un aumento de la relación CD8/CD4 y la regulación positiva de IL12 e IFN $\gamma$ , etc., a un nivel sistémico suficientemente alto del anticuerpo anti-CTLA-4, que se asocia con importantes acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunológico y exacerbación de enfermedades autoinmunitarias, incluidos acontecimientos irreversibles y fatales. Por el contrario, en la presente invención, los inmunomoduladores, tales como anticuerpos anti-CTLA-4, se administran "en" los sitios del tumor para que la respuesta inmunoterapéutica específica del cáncer "completa" ocurra justo "en" los sitios del tumor, incluida una mezcla "viva" de muerte de células cancerosas específicas y liberación de TBA (menos muerte celular normal para confundir al sistema), maduración y migración en "tiempo real" de células presentadoras de antígenos y células inmunitarias, confirmación de señales inmunitarias a través de los inmunomoduladores (por ejemplo, factores coestimulantes, antagonistas de moléculas de puntos de control inhibidores y agonistas en la activación, funciones, supervivencia, expansión y memoria de células inmunitarias). Todos los acontecimientos inmunitarios descritos anteriormente ocurren directamente en el sitio del tumor, lo cual contrasta con la visión tradicional del campo que se basa exclusivamente en la respuesta inmunitaria central o sistemática a través de los órganos linfoides secundarios para erradicar las células tumorales.

El concepto de "en" el sitio del tumor está respaldado además por resultados no publicados de nuestros ensayos clínicos anteriores de CG0070, que mostró una liberación constante de IL6 y de ninguna otra citocina durante el curso del tratamiento. Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, se cree que la IL6, en combinación con TGF $\beta$ , desplaza las células Treg y otras células CD4 hacia el compromiso con la vía inmunológica Th17. Si tal cambio ocurre en el momento justo de la muerte de las células cancerosas y la activación de las células presentadoras de antígenos y las células inmunitarias, la vía Th1 se confirmará sobre una base autoinmunitaria, que es necesaria para que los linfocitos T efectoras destruyan las llamadas células cancerosas "propias". De otro modo, las células cancerosas son fácilmente "toleradas" por los linfocitos T efectoras, cuando la vía Th1 sólo se confiere temporalmente sin la liberación de IL6 y el compromiso con la vía Th17. Como la expresión de IL6 y el cambio a la vía Th17 se observaron solo en los sitios del tumor, estos resultados confirman además la importancia de una terapia "en" el sitio del tumor.

Por lo tanto, un aspecto de la presente solicitud proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo (por ejemplo, un individuo humano), que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el

inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. Se describe un método para inhibir la metástasis de un tumor sólido o linfático en un individuo (por ejemplo, un individuo humano), que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores).

5 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso es un virus oncolítico, tales como un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus del herpes simple, virus variolovacunal, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la polio, virus del sarampión, virus del valle de Séneca, virus coxsackie, virus reo, virus de la estomatitis vesicular, maraba y  
10 rhabdovirus, y parvovirus.

En algunas realizaciones, el virus oncolítico es un adenovirus oncolítico. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se replica preferentemente en una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el virus oncolítico comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para  
15 la replicación del virus. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor humano E2F-1. En algunas realizaciones, el promotor E2F-1 comprende la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4.

20 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador se administra directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el inmunomodulador se administra directamente en el tumor.

25 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador se administra al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el inmunomodulador se administra al tejido que tiene el tumor.

30 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso y el inmunomodulador se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra antes de la administración del inmunomodulador. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra después de la administración del inmunomodulador.

35 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso y el inmunomodulador se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador se administran en la misma composición.

40 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el inmunomodulador es un modulador de la molécula del punto de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de al menos dos inmunomoduladores, en donde el método comprende la administración local de un inhibidor de CTLA-4 y un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de CTLA-4, es un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona entre el grupo que consiste en ipilimumab, tremilimumab y un anticuerpo anti-CTLA-4 de cadena única.  
45 En algunas realizaciones, el inhibidor de CTLA-4 es una proteína lipocalina diseñada que reconoce específicamente CTLA-4, tal como una molécula anticálina que se une específicamente a CTLA-4.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además administrar localmente en el sitio del tumor una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina, quimiocina o un PRRago (es decir, agonista del receptor de reconocimiento de patógenos)). En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona entre el grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-12, interferón (tal como interferón de tipo 1, tipo 2 o tipo 3, por ejemplo, interferón  $\gamma$ ), CCL4, CCL19, CCL21, CXCL13, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, RIG-I, MDA5, LGP2 y LT $\alpha\beta$ . En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra por separado del  
55 agente infeccioso. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es expresada por el agente infeccioso, en donde el agente infeccioso comprende un ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona del grupo que consiste en activadores de STING (es decir, estimuladores de genes de interferón) (tales como CDN), PRRago (tal como CpG, Imiquimod, o Poli I:C), estimuladores de TLR (tal como GS-9620, AED-1419, CYT-003-QbG10, AVE-0675 o PF-7909) y estimuladores RLR (es decir, receptores similares a RIG-I) (tales como estimuladores de RIG-I, Mda5 o LGP2).  
60

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso es un virus que comprende un vector viral, y en donde el vector viral comprende el ácido nucleico que  
65 codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina). En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico está unido

operativamente a un promotor viral. En algunas realizaciones, el virus es un adenovirus y el promotor viral es un promotor E3. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un adenovirus serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es CG0070.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además administrar localmente en el sitio del tumor una composición de pretratamiento antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento comprende un agente potenciador de la transducción, tales como N-dodecil- $\beta$ -maltósido (DDM).

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el individuo (por ejemplo, totalmente o solo en el sitio del tumor) está sujeto a una terapia previa antes de la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador. En algunas realizaciones, la terapia previa es radioterapia (por ejemplo, con o sin quimioterapia). En algunas realizaciones, la terapia previa comprende la administración de un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente que aumenta el nivel de citocinas involucradas en una vía inmunogénica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente que causa disfunción o daño a un componente estructural de un tumor. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-VEGF, una hialuronidasa, CCL21 y N-dodecil- $\beta$ -maltósido. En algunas realizaciones, la terapia previa se administra en una dosis insuficiente para erradicar las células tumorales.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son autólogas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son alogénicas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas provienen de una línea de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran como una única composición. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el tumor sólido o linfático es cáncer de vejiga (tal como cáncer de vejiga con invasión muscular o cáncer de vejiga sin invasión muscular). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra por vía intravesical. En algunas realizaciones, el inmunomodulador se administra por vía intravesical.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador se administra semanalmente.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los métodos proporcionados anteriormente, el individuo tiene una expresión alta de uno o más biomarcadores seleccionados entre PD-1, PD-L1 y PD-L2 en el tumor (tal como células tumorales o células inmunitarias derivadas del tumor). En algunas realizaciones, el individuo tiene una expresión alta de uno o más biomarcadores seleccionados entre CD80, CD83, CD86 y antígenos HLA de clase II en células dendríticas maduras derivadas de tumores. En algunas realizaciones, el individuo tiene una expresión alta de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCR7, CCL5, CCL8, SOD2, MT2A, OASL, GBP1, HES4, MTTB, MTIE, MTIG, MTHI, GADD45A, LAMP3 y miR-155.

También se proporciona un agente infeccioso para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de un inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. También se proporciona un inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de dicho inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1.

Estos y otros aspectos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que una, algunas, o todas las propiedades de las diferentes realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de CG0070 y del adenovirus de tipo salvaje (wt) de tipo 5. CG0070 se basa en el adenovirus de serotipo 5, pero el promotor endógeno E1a y la región codificante E3 de 19 kD han sido

reemplazados por el promotor humano E2F-1 y una región codificante de ADNc de GM-CSF humano, respectivamente.

La Figura 2 muestra grupos de animales y esquemas de dosificación en el estudio *in vivo* del ejemplo 9.

5 La Figura 3 es un diagrama de dispersión que muestra la distribución de focos metastásicos enumerados para cada grupo de animales el día 23 en el estudio *in vivo* del ejemplo 9. La línea horizontal corresponde al valor medio. Se realizaron análisis estadísticos de dos colas con  $P = 0,05$ . Los resultados de la prueba se consideran no significativos (ns) con una  $P > 0,05$ , significativos (simbolizado por \*) a  $0,01 < P < 0,05$ , muy significativos (\*\*) a  $0,001 < P < 0,01$  y extremadamente significativos (\*\*\*) a  $P < 0,001$ .

10 La Figura 4 es un gráfico de caja y bigotes que muestra los volúmenes tumorales de cada grupo de animales el día 19 en el estudio *in vivo* del ejemplo 9. La caja representa los percentiles 25 y 75 de las observaciones, la línea representa la mediana de las observaciones y el bigote representa las observaciones extremas.

15 La figura 5 es un diagrama que muestra la pauta posológica del estudio *in vivo* del ejemplo 10.

### Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona combinaciones de un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de un inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. La combinación para su uso, agente infeccioso para su uso e inmunomodulador para su uso, puede comprender además la administración local de células tumorales inactivadas.

25 El agente infeccioso y/o el inmunomodulador y/o las células tumorales inactivadas pueden administrarse directamente en el tumor. Como alternativa, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador y/o las células tumorales inactivadas se administran al tejido que tiene la célula tumoral. Por ejemplo, un tumor ilustrativo adecuado para los métodos descritos en el presente documento es el cáncer de vejiga y el agente infeccioso y/o el inmunomodulador se pueden administrar por vía intravesical.

30 La presente invención proporciona un sistema de vacuna contra el cáncer *in vivo* con agentes vivos y en tiempo real dentro de un cuerpo humano mediante la administración local (por ejemplo, intratumoral) de componentes terapéuticos, incluyendo un agente infeccioso, uno o más agentes de inmunomodulación y células cancerosas vivas. Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, se cree que tal sistema infeccioso *in vivo*, en el sitio y en tiempo real da lugar a una liberación de antígenos que rompen la tolerancia ("TBA") previamente desconocidos, que puede ser esencialmente un fenómeno transitorio. Así pues, cuando están presentes los tres componentes descritos en el presente documento (agente infeccioso, inmunomodulador(es) y células cancerosas vivas presentes en el sitio del tumor o administradas en el sitio del tumor), se puede lograr una inmunoterapia adaptativa efectiva contra tumores sólidos y linfáticos.

40 Un requisito para los métodos descritos en el presente documento es administrar localmente el agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y, opcionalmente, las células tumorales inactivadas en el sitio del tumor. El efecto directo de la administración local es importante porque, si los componentes no se proporcionan directamente a las células tumorales (por ejemplo, cuando se administran por vía sistémica), habría cambios farmacocinéticos y farmacodinámicos en estos componentes por, o sobre, el cuerpo humano. Estos cambios inclinarían el delicado equilibrio entre la supresión tumoral y la activación en una dirección equivocada de la complicada y delicada respuesta inmunológica necesaria para el éxito.

50 Por tanto, se cree que la combinación descrita en el presente documento permitiría la plena explotación de las reacciones oncolíticas e inmunogénicas en el individuo y aumentaría el potencial terapéutico de la inmunoterapia contra el cáncer. Un experto habitual en la materia debe entender que los métodos de terapia combinada descritos en el presente documento requieren que un agente o composición se administre junto con otro agente. La dosificación, la pauta posológica, las vías de administración y la secuencia de administración de cada agente en la terapia combinada proporcionada en el presente documento (tal como el agente infeccioso, cada inmunomodulador y las células tumorales inactivadas) se pueden optimizar de forma independiente para proporcionar resultados terapéuticos óptimos. Los métodos también pueden combinarse además con el pretratamiento, tal como radiación local o administración local de citocinas, quimiocinas u otros agentes terapéuticos beneficiosos, para aumentar las posibilidades de éxito de la terapia.

60 En un aspecto, se proporciona una combinación de un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, se proporciona dicha combinación para su uso en donde el método comprende además el método c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, se

proporciona dicha combinación para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1.

5

## Definiciones

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo resultados clínicos. A efectos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitaciones, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas que resultan de la enfermedad, disminuir el alcance de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (por ejemplo, prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recidiva de la enfermedad, reduciendo la tasa de recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar el avance de la enfermedad, mejorar el cuadro clínico, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de una o más de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retrasar el avance de la enfermedad, aumentar la calidad de vida y/o prolongar la supervivencia. También está abarcada por "tratamiento" una reducción de las consecuencias patológicas del cáncer. Los métodos de la invención contemplan uno cualquiera o más de estos aspectos de tratamiento.

10

15

20

"Entorno adyuvante" se refiere a un entorno clínico en el que un individuo ha tenido antecedentes de cáncer, y en general (pero no necesariamente) ha respondido a la terapia, que incluye, pero sin limitación, cirugía (por ejemplo, resección quirúrgica), radioterapia y quimioterapia. El tratamiento o la administración en el "entorno adyuvante" se refiere a un modo de tratamiento posterior.

25

"Entorno neoadyuvante" se refiere a un entorno clínico en que el método se realiza antes de la terapia primaria/definitiva. En el presente documento, la expresión entorno neoadyuvante también se refiere a cualquier modalidad de terapia de "preparación del sitio del tumor" que se utiliza junto con, de una manera secuencial, los componentes terapéuticos (por ejemplo, agente infeccioso e inmunomodulador(es); o agente infeccioso, inmunomodulador(es) y células tumorales inactivadas) como se describe en la presente invención.

30

"Agente infeccioso" como se utiliza en el presente documento puede referirse a un virus, incluyendo un virus no oncolítico o un virus oncolítico, incluyendo, pero sin limitaciones, adenovirus, virus del herpes simple, virus variolovacunal, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la polio, virus del sarampión, virus del valle de Séneca, virus coxsackie, virus reo, virus de la estomatitis vesicular, maraba y rabdovirus, y parvovirus. Por añadidura, el agente infeccioso también puede ser una bacteria, tal como el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), complejo de pared celular-ADN micobacteriano ("MCNA") o *Listeria monocytogenes*.

35

La expresión "cantidad eficaz" usada en el presente documento se refiere a una cantidad de un compuesto o composición suficiente para tratar un trastorno, afección o enfermedad especificado, tal como mejorar, condición o enfermedad como mejorar, paliar, aliviar y/o retrasar uno o más de sus síntomas. En referencia al cáncer, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para hacer que un tumor se contraiga y/o disminuya la velocidad de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada en cáncer. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo del cáncer. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la recurrencia. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para reducir la tasa de recurrencia en el individuo. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es una cantidad suficiente para inhibir la metástasis tumoral en el individuo. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. La cantidad eficaz del fármaco o composición puede: (i) reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retrasar, ralentizar hasta cierto punto y, preferentemente, detener la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento del tumor; (vi) prevenir la aparición y/o recurrencia del tumor; (vii) retrasar la aparición y/o recurrencia del tumor; (viii) reducir la tasa de recurrencia del tumor y/o (ix) aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Como se entiende en la técnica, una "cantidad eficaz" puede estar en una o más dosis, es decir, puede requerirse una dosis única o múltiples dosis para conseguir el criterio de valoración de tratamiento deseado.

40

45

50

55

"Junto con" o "en combinación con" se refieren a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento, tal como la administración de un agente infeccioso descrito en el presente documento además de la administración del otro agente (tal como un inmunomodulador y/o células tumorales inactivadas) al mismo individuo con el mismo plan de tratamiento. Así pues, "junto con" o "en combinación con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

60

La expresión "administración simultánea", como se usa en el presente documento, significa que una primera terapia y una segunda terapia en una terapia combinada se administran al mismo tiempo. Cuando la primera y la segunda terapia se administran simultáneamente, la primera y la segunda terapia pueden estar contenidas en la misma

65

composición (por ejemplo, una composición que comprende tanto una primera como una segunda terapia) o en composiciones separadas (por ejemplo, una primera terapia está contenida en una composición y una segunda terapia está contenida en otra composición).

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "administración secuencial" o "en secuencia" significa que la primera terapia y la segunda terapia en una terapia combinada se administran con una separación de tiempo, por ejemplo, de más de aproximadamente 1 minuto, tal como más de aproximadamente cualquiera de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 o más minutos. En algunos casos, la expresión "administración secuencial" significa que la primera terapia y la segunda terapia en una terapia combinada se administran con una separación temporal de no más de
- 10 aproximadamente 1 día, tal como más de aproximadamente cualquiera de 1 día a 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas o más semanas. Cualquiera de la primera terapia o la segunda terapia puede administrarse en primer lugar.

- 15 La expresión "administrado inmediatamente antes de" significa que la primera terapia se administra no más de aproximadamente 15 minutos, tal como no más de aproximadamente cualquiera de 10, 5 o 1 minutos antes de la administración de la segunda terapia. La expresión "administrado inmediatamente después de" significa que la primera terapia se administra no más de aproximadamente 15 minutos, tal como no más de aproximadamente cualquiera de 15, 10 o 1 minutos después de la administración de la segunda terapia.

- 20 Como se usa en el presente documento, "específico", "especificidad" o "selectivo" o "selectividad" como se usa cuando se describe un compuesto como inhibidor, significa que el compuesto interactúa, preferentemente, con (por ejemplo, se une, modula e inhibe) un objetivo particular (por ejemplo, una proteína y una enzima) más que uno que no es el objetivo.

- 25 Los términos "transducción" y "transfección" tal como se utilizan en el presente documento incluyen todos los métodos conocidos en la técnica que utilizan un agente infeccioso (tal como un virus) u otros medios para introducir ADN en células para la expresión de una proteína o molécula de interés. Además de un virus o un agente similar a un virus, existen métodos de transfección basados en química, tales como los que utilizan fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas o polímeros catiónicos (por ejemplo, DEAE-dextrano o polietilenimina); métodos no químicos, tal como
- 30 electroporación, compresión celular, sonoporación, transfección óptica, impalefección, fusión de protoplastos, liberación de plásmidos o transposones; métodos basados en partículas, tales como el uso de una pistola genética, magnetofección o transfección asistida por imanes, bombardeo de partículas; y métodos híbridos, tales como nucleofección.

- 35 La expresión "preparación del sitio del tumor" como se utiliza en el presente documento, describe una modalidad de tratamiento única o una combinación de más de una modalidad de tratamiento que se utilizará junto con los componentes terapéuticos (por ejemplo, agente infeccioso e inmunomodulador(es); o agente infeccioso, inmunomodulador(es) y células tumorales inactivadas) de manera secuencial, y en el que la modalidad o modalidades de tratamiento se aplican directa o indirectamente (por ejemplo, a través de una terapia intravenosa) en el sitio del
- 40 tumor (tales como células cancerosas o el tejido que contiene las células cancerosas). Las modalidades de tratamiento ilustrativas para las preparaciones del sitio del tumor incluyen, pero sin limitaciones, administración de moléculas relacionadas con el sistema inmunológico, irradiación y administración de agentes terapéuticos. Todas las preparaciones del sitio del tumor descritas en el presente documento pueden incluir la administración de una sola molécula o agente o una combinación de más de una molécula y/o agente.

- 45 Se entiende que las realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen realizaciones "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en".

- 50 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

- Como se usa en el presente documento, la referencia a "no" un valor o parámetro generalmente significa y describe "distinto de" un valor o parámetro. Por ejemplo, el método no se usa para tratar el cáncer de tipo X significa que el
- 55 método se usa para tratar el cáncer de tipos distintos del X.

El término "aproximadamente X-Y" utilizado en el presente documento tiene el mismo significado que "aproximadamente X a aproximadamente Y".

- 60 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/a", "o", y "el" o "la", incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

#### Usos médicos para el tratamiento de un tumor sólido o linfático

- 65 La presente invención proporciona, en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como cáncer de vejiga) en un individuo (tal como un ser



humano), que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus, tales como un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus del herpes simple, virus variolovacunal, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la polio, virus del sarampión, virus del valle de Séneca, virus coxsackie, virus reo, virus de la estomatitis vesicular, maraba y rabdovirus, y parvovirus. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el agente infeccioso es sólo una parte o partes del agente infeccioso de tipo salvaje que puede causar infección, inflamación o efectos similares a una infección. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el agente infeccioso como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el agente infeccioso como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del agente infeccioso y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por vía de administración distinta a la administración local.

Los virus ilustrativas que son adecuados para su uso como agente infeccioso en la presente invención incluyen, pero sin limitaciones, adenovirus, por ejemplo, H101 (ONCOCRINE®), CG- TG-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) y CG0070; virus del herpes simple, por ejemplo, Talimogene laherparapvec (T-VEC) y HSV-1716 (SEPREHVIR®); virus reo, por ejemplo, REOLYSINA®; virus variolovacunal, por ejemplo, JX-594; virus del valle de Séneca, por ejemplo, NTX-010 y SVV-001; virus de la enfermedad de Newcastle, por ejemplo, NDV-NS1 y GL-ONC1; virus de la polio, por ejemplo, PVS-RIPO; virus del sarampión, por ejemplo, MV-NIS; virus coxsackie, por ejemplo, Cavatak™; virus de la estomatitis vesicular, maraba y rabdovirus; parvovirus y virus de las paperas. En algunas realizaciones, el virus es un virus oncolítico. En algunas realizaciones, el virus es competente para replicarse. En algunas realizaciones, el virus se replica preferentemente en una célula tumoral.

En algunas realizaciones, el virus oncolítico es un virus oncolítico de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el virus oncolítico está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se atenúa (por ejemplo mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el virus oncolítico es competente para replicarse. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se replica preferentemente en una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el virus oncolítico como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el virus oncolítico como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el virus oncolítico como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el virus oncolítico como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de

inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por vía de administración distinta a la administración local.

5 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la administración local en el sitio del tumor de una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina, quimiocina o PRRago (es decir, agonista del receptor de reconocimiento de patógenos). En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona entre el grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-12, interferón (tal como interferón de tipo 1, tipo 2 o tipo 3, por ejemplo, interferón  $\gamma$ ), CCL4, CCL19, CCL21, CXCL13, TLR1, TLR2, 10 TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, RIG-I, MDA5, LGP2 y LT $\alpha\beta$ . En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en activadores de STING (es decir, estimuladores de genes de interferón) (tales como CDN, es decir, dinucleótidos cíclicos), PRRago (tal como CpG, Imiquimod, o Poli I:C), estimuladores del TLR (tal como GS-9620, AED-1419, CYT-003-QbG10, AVE-0675 o PF-7909) y estimuladores del RLR (tal como RIG-I, Mda5, o estimuladores de LGP2). En algunas realizaciones, la 15 molécula relacionada con el sistema inmunológico induce células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y/o linfocitos T auxiliares foliculares. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra por separado del agente infeccioso (por ejemplo, en una composición separada o como una entidad separada en la misma composición). En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra al sitio del tumor mediante transducción. Los métodos de transducción ilustrativos conocidos en la técnica incluyen, pero sin 20 limitaciones, el uso de fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas, polímeros catiónicos, electroporación, compresión celular, sonoporación, transfección óptica, fusión de protoplastos, impalefección, administración hidrodinámica, pistola génica, magnetofección, transfección y nucleofección viral. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es expresada por el agente infeccioso. Por ejemplo, el agente infeccioso puede comprender un ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico, y el ácido nucleico puede estar en el 25 vector viral o en un vector separado. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus que comprende un vector viral, y en donde el vector viral comprende el ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunitario está unido operativamente a un promotor viral, tal como un promotor E1 o un promotor E3.

30 La presente invención se basa en parte en resultados no publicados de nuestros ensayos clínicos realizados entre 2005 y 2008. Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, se cree que el agente infeccioso viral, CG0070, que está diseñado específicamente para replicarse solo en células cancerosas, proporciona la "cantidad adecuada" de GM-CSF en los sitios del tumor y en "tiempo real" durante la muerte de las células cancerosas. Se cree que esta administración de GM-CSF "en" el sitio del tumor por parte del agente infeccioso durante la muerte de las células 35 cancerosas es vital para que las células presentadoras de antígenos maduren y crucen los antígenos establecidos presentes, neoantígenos y antígenos que rompen la tolerancia (TBA) de esta mezcla de muerte celular a los linfocitos T activados. En este escenario terapéutico se necesita la cantidad adecuada de GM-CSF en el sitio del tumor, porque una dosis alta de GM-CSF dejaría al sistema inmunológico sin foco y desencadenaría un aumento instantáneo de los supresores locales y sistémicos; mientras que una dosis baja de GM-CSF no sería suficiente para la activación del 40 proceso inflamatorio y las células inmunitarias relacionadas. Se cree que un delicado equilibrio en el sitio del tumor que implica la cantidad correcta de GM-CSF y la mezcla de células cancerosas "vivas" en el sitio provoca una respuesta inmunológica adaptativa que es específica para las células cancerosas. Por lo tanto, un agente infeccioso que es específico del cáncer y oncolítico, y en combinación con la cantidad adecuada de GM-CSF u otras moléculas apropiadas relacionadas con el sistema inmunológico, ya sea expresadas por el agente infeccioso o secretadas por 45 las defensas del cuerpo en respuesta a cualquier agente infeccioso durante la muerte celular, infección o inflamación, administrado "en" los sitios del tumor, se cree que es una opción ideal para una inmunoterapia eficaz contra el cáncer.

En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico mejora la respuesta inmunitaria en el individuo. Las moléculas relacionadas con el sistema inmunológico pueden incluir, pero sin limitaciones, una citocina, 50 una quimiocina, factor de crecimiento de células madre, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina, trombopoyetina, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF), TNF- $\beta$ , factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, interferón-lambda, factor de crecimiento de células madre denominado "factor S1", hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humano de N-metionilo, hormona 55 del crecimiento bovino, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorrelaxina, hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, sustancia inhibidora mulleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, NGF-beta, factor de crecimiento de plaquetas, TGF-alfa, TGF- $\beta$ , factor de crecimiento 60 insulinoide I, factor de crecimiento insulinoide II, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, linfoxina, talidomida, lenalidomida o pomalidomida.

La molécula relacionada con el sistema inmunológico puede ser de una cualquiera de las modalidades moleculares 65 conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, aptámero, ARNm, ARNip, microARN, ARNhc, péptido, anticuerpo, anticlina, ácido nucleico esférico, TALEN, nucleasas con dedos de cinc, CRISPR/Cas9 y moléculas

pequeñas.

Las moléculas relacionadas con el sistema inmunológico se pueden utilizar solas o en combinación. Por ejemplo, se puede utilizar cualquier número (tal como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de moléculas relacionadas con el sistema inmunológico de forma simultánea o secuencial.

Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina) unida operativamente a un promotor viral; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es GM-CSF. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el virus oncolítico como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el virus oncolítico como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un adenovirus de serotipo 5. En algunas realizaciones, el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano. En algunas realizaciones, se inserta una señal de poliadenilación (PA) en el extremo 5' del promotor E2F-1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el GM-CSF humano está unido operativamente al promotor E3. En algunas realizaciones, la estructura principal del vector del adenovirus de serotipo 5 comprende además E2, E4, regiones proteicas tardías o repeticiones terminales invertidas (ITR) idénticas al genoma del adenovirus de serotipo 5 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso tiene la estructura genómica como se muestra en la Figura 1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se está replicando condicionalmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se replica preferentemente en las células cancerosas. En algunas realizaciones, las células cancerosas son células cancerosas defectuosas en la ruta Rb. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es CG0070.

Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina, por ejemplo, GM-CSF); y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el adenovirus y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el adenovirus y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el adenovirus como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el adenovirus como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el adenovirus se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del adenovirus y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de CG0070; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz

de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el CG0070 y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el CG0070 y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el CG0070 como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el CG0070 como el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el CG0070 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de CG0070 y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) analizados anteriormente se administran secuencialmente, es decir, la administración del agente infeccioso se realiza antes o después de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra antes de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso no se administra más de aproximadamente cualquiera de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas o 24 horas antes de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra aproximadamente días o semanas (tal como aproximadamente cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más) antes de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra después de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso no se administra más de aproximadamente cualquiera de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas o 24 horas después de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra aproximadamente días o semanas (tal como aproximadamente cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más) después de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran uno inmediatamente después del otro (por ejemplo, en un plazo de 5 minutos o menos entre las dos administraciones). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra inmediatamente antes de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra inmediatamente después de la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores).

En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran simultáneamente mediante composiciones separadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran como una única composición. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se mezclan antes de (por ejemplo, inmediatamente antes de, por ejemplo, en un plazo de menos de aproximadamente 10, 5 o 1 minutos antes) de la administración de la composición. En algunas realizaciones, la composición que comprende el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) está preparada previamente y se almacena durante al menos aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas o más antes de la administración.

Los inmunomoduladores analizados en el presente documento incluyen inhibidores de puntos de control inmunitario. El inmunomodulador puede ser una cualquiera de las modalidades moleculares conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, aptámero, ARNm, ARNip, microARN, ARNhc, péptido, anticuerpo, anticalina, ácido nucleico esférico, TALEN, nucleasas con dedos de cinc, CRISPR/Cas9 y moléculas pequeñas.

En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un ligando natural o diseñado de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitario, incluyendo, por ejemplo, ligandos de CTLA-4 (por ejemplo, B7.1, B7.2) y ligandos de PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo que se dirige a una proteína inhibidora de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab, Tremelimumab, KAHK-102) y anti-PD-L1 (por ejemplo, KY-1003 (EP20120194977)). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de

dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de un único inmunomodulador. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario.

En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de al menos dos inmunomoduladores (tal como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más). En algunas realizaciones, se administran simultáneamente todos o parte de los al menos dos inmunomoduladores, tal como en una única composición. En algunas realizaciones, la totalidad o parte de los al menos dos inmunomoduladores se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende un inhibidor de puntos de control inmunitario y un agente inmunoestimulante. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende dos o más (tales como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) inhibidores de puntos de control. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende dos o más (tales como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) agentes inmunoestimulantes. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende cualquier número (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de inhibidores de puntos de control inmunitario y cualquier número (tal como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) de agentes inmunoestimulantes. Un método puede comprender: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso (tal como un virus, por ejemplo un virus oncolítico); y b) administrar localmente al individuo una cantidad eficaz de un primer inmunomodulador (tal como un inhibidor de puntos de control inmunitario); y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un segundo inmunomodulador (tal como un agente inmunoestimulante). Un método puede comprender la administración de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab, o una proteína lipocalina diseñada, por ejemplo, una anticalina que reconoce específicamente CTLA-4) y un agonista de CD40 (tal como un anticuerpo anti-CD40 agonista, por ejemplo, APX005M). Un método puede comprender la administración de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab, o una proteína lipocalina diseñada, por ejemplo, una anticalina que reconoce específicamente CTLA-4) y un agonista 4-1BB (tal como un anticuerpo anti-4-1BB agonista, por ejemplo, PF-05082566). En algunas realizaciones, el método comprende la administración de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo anti-CTLA-4) y un inhibidor de PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1).

En algunas realizaciones, un inhibidor adicional de puntos de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4. En algunas realizaciones, el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo anti-CTLA-4. En la presente invención se pueden utilizar cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, ipilimumab, Tremelimumab y KHR-102. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es YERVOY® (Ipilimumab). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo anti-CTLA-4 de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de CTLA-4 es una proteína lipocalina diseñada que reconoce específicamente CTLA-4 (como una molécula anticalina que se une específicamente a CTLA-4). En algunas realizaciones, el inhibidor de CTLA-4 es un ligando natural o diseñado de CTLA-4, tales como B7.1 o B7.2.

En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un antagonista de PD-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En la presente invención se puede utilizar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, BMS-936559 y atezolizumab, lambrolizumab, MK-3475, AMP-224, AMP-514, STI-A1110 y TSR-042. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo anti-PD-1 de - longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante o derivado del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un ligando natural o diseñado de PD-1, tales como PD-L1 o PD-L2. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un inhibidor de la interacción entre PD-1 y su ligando, por ejemplo, un inhibidor de la interacción PD-1/PD-L1 o un inhibidor de la interacción PD-1/PD-L2. En la invención, el inhibidor de PD-1 es un inhibidor de PD-L1 (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-L1). Cualquiera de los inhibidores de la interacción entre PD-1 y su ligando puede utilizarse en la presente invención, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º US7709214, US7432059, US7722868, US8217149, US8383796 y US9102725. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es una proteína de fusión Fc que comprende un ligando de PD-1, tal como una fusión Fc de PD-L2 (por ejemplo, AMP-224).

Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e

inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo (tal como un ser humano), que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es un inhibidor de la interacción entre PD-1 y su ligando, tal como un inhibidor de la interacción PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración local de un segundo inmunomodulador, tal como un agente inmunoestimulante (por ejemplo, un activador de CD40 o un activador de 4-1BB). En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inhibidor de PD-L1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inhibidor de PD-L1 se administran al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el agente infeccioso como el inhibidor de PD-L1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el agente infeccioso como el inhibidor de PD-L1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inhibidor de PD-L1 se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra antes (tal, inmediatamente antes) de la administración del inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra después (por ejemplo inmediatamente después) de la administración del inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inhibidor de PD-L1 se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico); y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-L1.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina) unida operativamente a un promotor viral; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es GM-CSF.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina, por ejemplo, GM-CSF); y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de CG0070; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 es un inhibidor de la interacción entre PD-1 y su ligando, tal como un inhibidor de la interacción PD-1/PD-L1. En algunas realizaciones, el CG0070 y/o el inhibidor de PD-L1 se administran directamente en el tumor. En algunas

realizaciones, el virus oncolítico y/o el inhibidor de PD-L1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el CG0070 como el inhibidor de PD-L1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el CG0070 como el inhibidor de PD-L1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el CG007 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el CG0070 y el inhibidor de PD-L1 se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el CG0070 se administra antes (por ejemplo, inmediatamente antes) de la administración del inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el CG0070 se administra después (por ejemplo inmediatamente después) de la administración del inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el CG0070 y el inhibidor de PD-L1 se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del CG0070 y/o del inhibidor de PD-L1 mediante una vía de administración distinta a la administración local.

El inhibidor de puntos de control inmunitario es un inhibidor del ligando PD-1 PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos incluyen, pero sin limitaciones, KY-1003, MCLA-145, RG7446 (también conocido como atezolizumab), BMS935559 (también conocido como MDX-1105), MPDL3280A, MEDI4736, avelumab (también conocido como MSB0010718C) y STI-A1010. En algunas realizaciones, el anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anti-PD-L1 es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante o derivado del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un inhibidor (por ejemplo, péptido, proteína o molécula pequeña) tanto de PD-L1 como de PD-L2. Los inhibidores ilustrativos tanto de PD-L1 como de PD-L2 incluyen, pero sin limitaciones, AUR-012 y AMP-224. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y el inhibidor de PD-L2 pueden usarse indistintamente en cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo (tal como un ser humano), que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, KY-1003, MCLA-145, RG7446, BMS935559, MPDL3280A, MEDI4736, avelumab o STI-A1010. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un inhibidor (por ejemplo, péptido, proteína o molécula pequeña) tanto de PD-L1 como de PD-L2, tales como AUR-012 y AMP-224. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración local de un segundo inmunomodulador, tal como un agente inmunoestimulante (por ejemplo, un activador de CD40 o un activador de 4-1BB). En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inhibidor del ligando de PD-1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inhibidor del ligando de PD-1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el agente infeccioso como el inhibidor del ligando de PD-1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el agente infeccioso como el inhibidor del ligando de PD-1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra antes (por ejemplo, inmediatamente antes) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra después (por ejemplo inmediatamente después) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del agente infeccioso y/o del inhibidor del ligando de PD-1 mediante una vía de administración distinta a la administración local.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico); y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2).

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus; y b) administrar localmente en el sitio del



tumor una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que

consiste en E1A, E1B y E4.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina) unida operativamente a un promotor viral; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es GM-CSF.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina, por ejemplo, GM-CSF); y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1, o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático (tal como la inhibición de la metástasis tumoral) en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de CG0070; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, KY-1003, MCLA-145, RG7446, BMS935559, MPDL3280A, MEDI4736, avelumab o STI-A1010. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 es un inhibidor (por ejemplo, péptido, proteína o molécula pequeña) tanto de PD-L1 como de PD-L2, tales como AUR-012 y AMP-224. En algunas realizaciones, el CG0070 y/o el inhibidor del ligando de PD-1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y/o el inhibidor del ligando de PD-1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, tanto el CG0070 como el inhibidor del ligando de PD-1 se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, tanto el CG0070 como el inhibidor del ligando de PD-1 se administran en el tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el CG007 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el CG0070 y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el CG0070 se administra antes (por ejemplo, inmediatamente antes) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el CG0070 se administra después (por ejemplo inmediatamente después) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el CG0070 y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de CG0070 y/o del inhibidor del ligando de PD-1 mediante una vía de administración distinta a la administración local.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además una etapa de administración local en el sitio del tumor de una composición de pretratamiento antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento comprende un agente potenciador de la transducción, tales como N-dodecil- $\beta$ -maltósido (DDM). DDM es un tensioactivo no iónico compuesto por una maltosa derivatizada con una sola cadena de doce carbonos y actúa como un detergente suave y agente solubilizante. Se ha utilizado como aditivo alimentario y se sabe que mejora la permeación de la superficie mucosa en roedores, probablemente debido a su efecto sobre los GAG asociados a la membrana y las uniones estrechas.

La composición de pretratamiento se puede administrar directamente en el tumor o en un tejido que tenga el tumor. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento comprende una solución del agente potenciador de la transducción (tal como DDM). La concentración adecuada de la composición de pretratamiento (tal como la solución DDM) incluye, pero sin limitaciones, aproximadamente uno cualquiera de 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, o 5 % del agente potenciador de la transducción (tal como DDM). En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento comprende cualquiera de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,05 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,1 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el



0,5 %, de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 4 %, de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 5 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 1 % o aproximadamente el 5 % o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 5 % del agente potenciador de la transducción (tal como DDM).

En algunas realizaciones, el pretratamiento (tal como DDM) se administra inmediatamente (por ejemplo, no más de 5 minutos) antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, el pretratamiento (tal como DDM) se administra no más de cualquiera de aproximadamente 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 90 minutos, 2 horas, 3 horas o 4 horas antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, el pretratamiento (tal como DDM) se administra no más de aproximadamente 2 horas antes de la administración del agente infeccioso.

Las dosis adecuadas para la composición de pretratamiento (tal como DDM) incluyen, pero sin limitaciones, cualquiera de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg, de 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg, de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg, de 1 mg/kg a 2 mg/kg, de 2 mg/kg a 5 mg/kg, de 5 mg/kg a 10 mg/kg, de 10 mg/kg a 25 mg/kg, de 25 mg/kg a 50 mg/kg, de 50 mg/kg a 100 mg/kg, de 100 mg/kg a 150 mg/kg, de 150 mg/kg a 200 mg/kg, de 200 mg/kg a 250 mg/kg, 250 mg/kg a 500 mg/kg o de 0,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis adecuada para la composición de pretratamiento es aproximadamente una cualquiera de 0,1 g, 0,2 g, 0,5 g, 0,75 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, 5 g o 10 g del agente potenciador de la transducción (tal como DDM).

En algunas realizaciones, el individuo (por ejemplo, totalmente o solo en el sitio del tumor) está sujeto a una terapia previa antes de la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador (incluyendo una combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, la terapia previa es la preparación del sitio del tumor utilizando una o más modalidades de tratamiento (tal como 1, 2, 3, 4, 5 o más), incluyendo, pero sin limitaciones, radioterapia, administración de una o más moléculas relacionadas con el sistema inmunológico, administración de otros agentes terapéuticos y combinación de los mismos. Se cree que añadir otras preparaciones previas al tratamiento puede aumentar las posibilidades de éxito de los métodos descritos anteriormente. Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, por ejemplo, la radiación local, con o sin efectos de linfodepleción o quimioterapia, puede aumentar la posibilidad de un proceso infeccioso y puede agotar los Treg más sensibles en los sitios del tumor, reviviendo así los linfocitos T de memoria agotados o telorizados. De manera similar, las preparaciones del sitio del tumor antes o concomitantemente con la administración de la combinación de la invención "en" el sitio del tumor pueden implicar citocinas, quimiocinas, moléculas pequeñas y otros inmunomoduladores beneficiosos bien conocidos, tales como agonistas de IL2, IL12, OX40, CD40 y 4-1BB. Estas modalidades de preparación en el sitio del tumor se pueden administrar junto con o en secuencia según las necesidades.

En algunas realizaciones, la terapia previa es radioterapia (por ejemplo, con o sin quimioterapia). En algunas realizaciones, la radioterapia se realiza en combinación con quimioterapia. En algunas realizaciones, la terapia previa es radioterapia en todo el cuerpo. En algunas realizaciones, la terapia previa es radioterapia dirigida únicamente a los sitios del tumor. En algunas realizaciones, la terapia previa es la radioterapia dirigida a los tejidos que tienen el tumor. En algunas realizaciones, la terapia previa es la radioterapia dirigida únicamente al sitio del tumor seleccionado para la administración local del agente infeccioso y el inmunomodulador. En algunas realizaciones, la terapia previa es la radioterapia dirigida únicamente a un tejido que tiene el tumor seleccionado para la administración local del agente infeccioso y el inmunomodulador. En algunas realizaciones, la dosis de la radioterapia es insuficiente para erradicar las células tumorales. Por ejemplo, una dosis adecuada de radioterapia es aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy, 45 Gy, 50 Gy, 55 Gy, 60 Gy, 65 Gy, 70 Gy, 75 Gy, 80 Gy, 90 Gy o 100 Gy. En algunas realizaciones, la dosis de la radioterapia no es más que aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy, 45 Gy, 50 Gy, 55 Gy, 60 Gy, 65 Gy, 70 Gy, 75 Gy, 80 Gy, 90 Gy o 100 Gy. En algunas realizaciones, la dosis de la radioterapia es una cualquiera de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 5 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 10 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 15 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 25 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 30 Gy a aproximadamente 35 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 30 Gy a aproximadamente 40 Gy, de aproximadamente 40 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 50 Gy a aproximadamente 60 Gy, de aproximadamente 60 Gy a aproximadamente 70 Gy, de aproximadamente 70 Gy a aproximadamente 80 Gy, de aproximadamente 80 Gy a aproximadamente 100 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 40 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 25 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 30 Gy a aproximadamente 60 Gy, de aproximadamente 60 Gy a aproximadamente 80 Gy o de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 60 Gy. La dosis adecuada de la radioterapia también puede depender del tipo, estadio y localización del tumor.

En algunas realizaciones, la radioterapia se administra en más de una fracción, tal como aproximadamente una cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 20 o más fracciones. En algunas realizaciones, las fracciones de

radioterapia se administran a lo largo de aproximadamente una cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas o más. En algunas realizaciones, las fracciones de radioterapia se administran a lo largo de una cualquiera de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 5 semanas, de aproximadamente 5 semanas a aproximadamente 6 semanas, de aproximadamente 6 semanas a aproximadamente 7 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 6 semanas o de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 semanas. En algunas realizaciones, la radioterapia se administra aproximadamente dos fracciones al día. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es de aproximadamente 1,8 Gy a aproximadamente 2 Gy al día, cinco días a la semana, para un adulto, o de aproximadamente 1,5 Gy a aproximadamente 1,8 Gy al día, cinco días a la semana para un niño. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es de aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 1,5 Gy, 2 Gy, 2,5 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy o más. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es una cualquiera de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 1,5 Gy, de aproximadamente 1,5 Gy a aproximadamente 2 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 2,5 Gy, de aproximadamente 2,5 Gy a aproximadamente 5 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 10 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 15 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 10 Gy o de aproximadamente 2 Gy a aproximadamente 20 Gy. En algunas realizaciones, la radioterapia se administra en una sola fracción.

En algunas realizaciones, la radioterapia tiene como objetivo la linfodepleción, ya sea como una fracción de dosis única al día o en múltiples fracciones a lo largo de días o semanas. En algunas realizaciones, de este modo, la radioterapia de linfodepleción se administra como irradiación corporal total. En algunas realizaciones, la linfodepleción se administra únicamente en sitios locales del tumor o en tejidos con el tumor. En algunas realizaciones, la radioterapia de linfodepleción se administra dos fracciones al día. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia de linfodepleción es de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 2 Gy al día, cinco días a la semana, para un adulto, o de aproximadamente 0,5 Gy a aproximadamente 1,8 Gy al día, cinco días a la semana para un niño. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es de aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 1,5 Gy, 2 Gy, 2,5 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy o más. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es una cualquiera de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 1,5 Gy, de aproximadamente 1,5 Gy a aproximadamente 2 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 2,5 Gy, de aproximadamente 2,5 Gy a aproximadamente 5 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 10 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 15 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 10 Gy o de aproximadamente 2 Gy a aproximadamente 20 Gy. En algunas realizaciones, la radioterapia de linfodepleción se administra con o sin el uso de un agente quimioterapéutico, tales como, pero sin limitación, ciclofosfamida y fludarabina.

En la presente invención se puede utilizar cualquiera de los métodos conocidos de radioterapia, incluyendo, pero sin limitaciones, radioterapia de haz externo (EBRT o XRT), teleterapia, braquiritoterapia, radioterapia con fuente sellada, terapia sistémica con radioisótopos (RIT), radioterapia de fuente no sellada, radioterapia intraoperatoria (IORT), radioterapia intraoperatoria dirigida (TARGIT), radioterapia de intensidad modulada (IMRT), terapia de arco modulado volumétrico (VMAT), terapia de partículas y terapia de barrena.

En algunas realizaciones, la terapia previa comprende la administración de un agente terapéutico. En algunas realizaciones, la dosis del agente terapéutico es suficiente para erradicar las células tumorales. En algunas realizaciones, la dosis del agente terapéutico es insuficiente para erradicar las células tumorales. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es uno cualquiera o una combinación de agentes quimioterapéuticos conocidos en la técnica, por ejemplo, ciclofosfamida. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es uno cualquiera de los agentes o una combinación de agentes que se dirigen a una vía de señalización celular conocida en la técnica o la bloquean, por ejemplo, un inhibidor de BRAF. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es una cualquiera o una combinación de terapias celulares conocidas en la técnica, por ejemplo, células TIL, células CAR/T y/o células TCR/T. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente que aumenta el nivel de citocinas involucradas en una vía inmunogénica. Cualquiera de las moléculas relacionadas con el sistema inmunológico descritas en el presente documento puede usarse como agente terapéutico, incluyendo, pero sin limitaciones, citocinas tales como IL6, IL8 e IL18 (estas citocinas pueden tener acciones proinflamatorias y/o antiinflamatorias, o algunas pueden promover la formación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento de tumores), quimiocinas (tales como CCL21 que puede promover la propagación del tumor mediante el aumento de las estructuras linfáticas), factores de crecimiento (tales como FLT3L), proteínas de choque térmico, inhibidores de la cinasa de molécula pequeña (tal como el inhibidor de JAK2), inhibidores de IAP, activadores de STING (tal como CDN), PRRago (tal como CpG ODN (oligodesoxinucleótidos), Imiquimod, o Poli I:C), estimuladores de TLR (tal como GS-9620, AED- 1419, CYT-003-QbG10, AVE-0675 o PF-7909) y estimuladores del RLR (tal como RIG-I, Mda5, o estimuladores de LGP2). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente que causa disfunción o daño a un componente estructural de un tumor. Los agentes ilustrativos incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpo anti-VEGF, una hialuronidasa y n-dodecil- $\beta$ -

maltósido. En algunas realizaciones, el agente terapéutico induce células inmunológicas, tales como células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T (tales como linfocitos T auxiliares foliculares).

Cualquiera del o los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes que se dirigen o bloquean las vías de señalización celular, citocinas, quimiocinas, terapias celulares, etc., puede administrarse directamente o indirectamente (por ejemplo, mediante administración intravenosa) a los sitios del tumor, ya sea individualmente o en combinación.

Las dosis adecuadas para el agente infeccioso dependen de factores tales como la naturaleza del agente infeccioso, el tipo de tumor sólido o linfático a tratar y las vías de administración. Como se usa en el presente documento, "partículas", en relación con un agente infeccioso, significa el número colectivo de unidades físicas singulares del agente infeccioso (tal como un virus o una bacteria). Este número se puede convertir a, o es equivalente a, otro número que significa unidades de título infeccioso, por ejemplo, unidad formadora de placas (UFP) o unidad internacional, mediante ensayos de infectividad como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra en una dosis de aproximadamente una cualquiera de  $1 \times 10^5$  partículas,  $1 \times 10^6$  partículas,  $1 \times 10^7$  partículas,  $1 \times 10^8$  partículas,  $1 \times 10^9$  partículas,  $1 \times 10^{10}$  partículas,  $2 \times 10^{10}$  partículas,  $5 \times 10^{10}$  partículas,  $1 \times 10^{11}$  partículas,  $2 \times 10^{11}$  partículas,  $5 \times 10^{11}$  partículas,  $1 \times 10^{12}$  partículas,  $2 \times 10^{12}$  partículas,  $5 \times 10^{12}$  partículas,  $1 \times 10^{13}$  partículas,  $2 \times 10^{13}$  partículas,  $5 \times 10^{13}$  partículas,  $1 \times 10^{14}$  partículas o  $1 \times 10^{15}$  partículas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra en una dosis de una cualquiera de aproximadamente  $1 \times 10^5$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^6$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^7$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^7$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^8$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^8$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^9$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^9$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  partículas a aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  partículas, de aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  partículas a aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  partículas, de aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  partículas a aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  partículas, de aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  partículas, de aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  partículas o de aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{15}$  partículas.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra diariamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra al menos aproximadamente una cualquiera de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x o 7x (es decir, diariamente) por semana. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente sin interrupción; semanalmente, dos de cada tres semanas; semanalmente tres de cada cuatro semanas; una vez cada dos semanas; una vez cada 3 semanas; una vez cada 4 semanas; una vez cada 6 semanas; una vez cada 8 semanas, mensualmente o cada dos a 12 meses. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son menores de aproximadamente uno cualquiera de 6 meses, 3 meses, 1 mes, 20 días, 15, 12 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son mayores de aproximadamente uno cualquiera de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, no hay interrupción en el programa de administración de dosis. En algunas realizaciones, el intervalo entre cada administración no es mayor de aproximadamente una semana.

La administración del agente infeccioso puede prolongarse durante un periodo de tiempo prolongado, tal como de aproximadamente un mes hasta aproximadamente siete años. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra durante un periodo de al menos aproximadamente uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 u 84 meses. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra durante un periodo de al menos 4 o 6 semanas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente durante cuatro semanas cada 3 meses. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente durante 6 semanas cada 3 meses.

Las dosis adecuadas para el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) dependen de factores tales como la naturaleza del inmunomodulador o la combinación de inmunomoduladores, el tipo de tumor sólido o linfático que se está tratando y las vías de administración. Las dosis ilustrativas del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) incluyen, pero sin limitaciones, aproximadamente uno cualquiera de  $1 \text{ mg/m}^2$ ,  $5 \text{ mg/m}^2$ ,  $10 \text{ mg/m}^2$ ,  $20 \text{ mg/m}^2$ ,  $50 \text{ mg/m}^2$ ,  $100 \text{ mg/m}^2$ ,  $200 \text{ mg/m}^2$ ,  $300 \text{ mg/m}^2$ ,  $400 \text{ mg/m}^2$ ,  $500 \text{ mg/m}^2$ ,  $750 \text{ mg/m}^2$ ,  $1000 \text{ mg/m}^2$  o más. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) está incluida en uno cualquiera de los siguientes intervalos: de aproximadamente 1 a aproximadamente  $5 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 5 a aproximadamente  $10 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 10 a aproximadamente  $20 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 20 a aproximadamente  $50 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 50 a aproximadamente  $100 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente  $100 \text{ mg/m}^2$  a aproximadamente  $200 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 200 a aproximadamente  $300 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 300 a aproximadamente  $400 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 400 a aproximadamente  $500 \text{ mg/m}^2$ , de aproximadamente 500 a aproximadamente  $750 \text{ mg/m}^2$  o de aproximadamente 750 a aproximadamente  $1000 \text{ mg/m}^2$ . En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador es de aproximadamente una cualquiera de  $1 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,  $2 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,  $5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,  $20 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,  $50 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,  $0,1 \text{ mg/kg}$ ,  $0,2 \text{ mg/kg}$ ,  $0,3 \text{ mg/kg}$ ,  $0,4 \text{ mg/kg}$ ,  $0,5 \text{ mg/kg}$ ,  $1 \text{ mg/kg}$ ,  $2 \text{ mg/kg}$ ,  $5 \text{ mg/kg}$ ,  $10 \text{ mg/kg}$ ,  $20 \text{ mg/kg}$ ,  $50 \text{ mg/kg}$ ,  $100 \text{ mg/kg}$  o más. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) es cualquiera de aproximadamente  $1 \text{ } \mu\text{g/kg}$  a aproximadamente  $5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ , de aproximadamente  $5 \text{ } \mu\text{g/kg}$  a aproximadamente  $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ,

de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg, de aproximadamente 50 µg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,2 mg/kg, de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg, de aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) es aproximadamente una cualquiera de 1 µg, 10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg, 1 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 12 mg, 18 mg, 24 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg o 1000 mg. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluyendo la combinación de inmunomoduladores) es una cualquiera de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 10 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg o de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1000 mg. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) administrada por sitio del tumor no es mayor que aproximadamente cualquiera de 10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg, 1 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 12 mg, 18 mg, 24 mg, 50 mg o 100 mg. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) administrada por sitio tumoral es una cualquiera de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, o de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg. En algunas realizaciones, la dosis del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) administrada por sitio del tumor se basa en el tamaño del tumor.

En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra diariamente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra al menos aproximadamente uno cualquiera de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x o 7x (es decir, diariamente) por semana. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente sin interrupción; semanalmente, dos de cada tres semanas; semanalmente tres de cada cuatro semanas; una vez cada dos semanas; una vez cada 3 semanas; una vez cada 4 semanas; una vez cada 6 semanas; una vez cada 8 semanas, mensualmente o cada dos a 12 meses. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son menores de aproximadamente uno cualquiera de 6 meses, 3 meses, 1 mes, 20 días, 15, días, 12 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son mayores de aproximadamente uno cualquiera de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, no hay interrupción en el programa de administración de dosis. En algunas realizaciones, el intervalo entre cada administración no es mayor de aproximadamente una semana. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra con la misma pauta de posológica que el agente infeccioso. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra con una pauta posológica diferente a la del agente infeccioso. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente durante cuatro semanas y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente durante tres de cuatro semanas.

La administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) puede realizarse durante un período prolongado de tiempo, tal como de aproximadamente un mes hasta aproximadamente siete años. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra durante un periodo de al menos aproximadamente uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 u 84 meses. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra durante un período de al menos 3 o 6 semanas. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente durante tres de cuatro semanas cada 3 meses. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente durante 6 semanas cada 3 meses.

Las vías de administración ilustrativos del agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores), la citocina y/o la composición de pretratamiento incluyen, pero sin limitaciones, intratumoral, intravascular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intracraneal, intrapleural, subcutánea y epidérmica, o administrarse en los ganglios linfáticos, espacios corporales, órganos o tejidos que se sabe que contienen dichas células cancerosas vivas (tales como inyecciones intrahepáticas o intrapancreáticas). En algunas

realizaciones, la administración se realiza mediante inyección directa del agente o agentes en el tumor. En algunas realizaciones, la administración se realiza mediante inyección directa del agente o agentes en un sitio cercano a las células tumorales. La vía específica de administración depende de la naturaleza del tumor sólido o linfático y se analiza más adelante en el contexto de los diferentes tipos de tumor sólido o linfático.

En algunas realizaciones, en donde el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluyendo una combinación de inmunomoduladores) se administran por vía intratumoral (por ejemplo, inyección intratumoral), el volumen total administrado no es más que aproximadamente uno cualquiera de 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, 5 ml o 10 ml. En algunas realizaciones, el volumen del agente infeccioso y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) para administración intratumoral (tal como inyección intratumoral) por sitio del tumor depende del tamaño del sitio del tumor. El tamaño del tumor se puede medir como el volumen del tumor o la dimensión más larga del tumor. Por ejemplo, para un tumor cuya dimensión más larga sea mayor de aproximadamente 5 cm, el volumen de administración intratumoral no es más que aproximadamente 2 ml; para un tumor cuya dimensión más larga es de aproximadamente 2 cm a aproximadamente 5 cm, el volumen de administración intratumoral es de aproximadamente 1 ml; para un tumor cuya dimensión más larga es de aproximadamente 0,75 cm a aproximadamente 2 cm, el volumen de administración intratumoral es de aproximadamente 0,5 ml; y para un tumor cuya dimensión más larga sea menor de aproximadamente 0,75 cm, el volumen de administración intratumoral es de aproximadamente 0,1 ml. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran a todos los sitios del tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran a aproximadamente uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más sitios tumorales. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran en el sitio del tumor de mayor tamaño.

En algunas realizaciones, la cantidad del agente infeccioso en combinación con el inmunomodulador es eficaz para inhibir la metástasis tumoral en el individuo. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 % (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera del 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %) de la metástasis es inhibida. En algunas realizaciones, se proporciona un método para inhibir la metástasis al ganglio linfático. En algunas realizaciones, se proporciona un método para inhibir la metástasis en el pulmón. La metástasis se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante análisis de sangre, gammagrafías óseas, radiografías, exploraciones por TC, tomografías PET y biopsias.

En algunas realizaciones, la cantidad del agente infeccioso en combinación con el inmunomodulador es eficaz para prolongar la supervivencia (tal, la supervivencia libre de enfermedad) en el individuo. En algunas realizaciones, la supervivencia se prolonga al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 12 o 24 meses. En algunas realizaciones, se proporciona un método para prolongar la supervivencia de un individuo que tiene un tumor sólido o linfático, que comprende: (a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso (tal como CG0070); (y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores).

En algunas realizaciones, la cantidad del agente infeccioso en combinación con el inmunomodulador es eficaz para provocar la remisión de la enfermedad (parcial o completa) en el individuo. En algunas realizaciones, se proporciona un método para provocar la remisión de la enfermedad (parcial o completa) en un individuo que tiene un tumor sólido o linfático, que comprende: (a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso (tal como CG0070); (y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores).

En algunas realizaciones, la cantidad del agente infeccioso en combinación con el inmunomodulador es eficaz para mejorar la calidad de vida del individuo. En algunas realizaciones, se proporciona un método para mejorar la calidad de vida de un individuo que tiene un tumor sólido o linfático, que comprende: (a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso (tal como CG0070); (y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores).

En algunas realizaciones, la cantidad del agente infeccioso en combinación con el inmunomodulador es eficaz para inhibir el crecimiento o reducir el tamaño del tumor sólido o linfático. En algunas realizaciones, el tamaño del tumor sólido o linfático se reduce al menos en aproximadamente el 10 % (incluido, por ejemplo, al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %). En algunas realizaciones, se proporciona un método para inhibir el crecimiento o reducir el tamaño de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: (a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso (tal como CG0070); (y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores).

Los tumores sólidos o linfáticos analizados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, sacronomasinovioma uterino, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario,

cáncer de próstata, carcinoma escamocelular, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervicouterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer escamocelular de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer colorrectal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de próstata y melanoma. Los métodos son aplicables a tumores sólidos o linfáticos de todos los estadios, incluyendo los estadios, I, II, III y IV, de acuerdo con los grupos de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC). En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es un/a: cáncer en estadio temprano, cáncer no metastásico, cáncer primario, cáncer avanzado, cáncer localmente avanzado, cáncer metastásico, cáncer en remisión, cáncer en un entorno adyuvante o cáncer en un entorno neoadyuvante. En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es resecable localizado, inoperable localizado o inoperable. En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es resecable localizado o resecable limítrofe. En algunas realizaciones, el cáncer ha sido refractario a la terapia previa.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el cáncer de cabeza y cuello es un carcinoma escamocelular de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el cáncer de cabeza y cuello es cáncer hipofaríngeo, cáncer laríngeo, cáncer de labios y de la cavidad bucal, cáncer de cuello escamoso metastásico con cáncer nasofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer de los senos paranasales y de la cavidad nasal o cáncer de las glándulas salivales primario oculto. En algunas realizaciones, el cáncer de escamocelular de cabeza y cuello es un cáncer de cabeza y cuello en estadio temprano, cáncer de cabeza y cuello no metastásico, cáncer de cabeza y cuello avanzado, cáncer de cabeza y cuello localmente avanzado, cáncer de cabeza y cuello metastásico, cáncer de cabeza y cuello en remisión, cáncer de cabeza y cuello en entorno adyuvante o cáncer de cabeza y cuello en entorno neoadyuvante. En algunas realizaciones, el cáncer de cabeza y cuello se encuentra en un entorno neoadyuvante. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido de cabeza y cuello que tiene el tumor de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se realiza mediante inyección directamente en el tumor de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se realiza mediante inyección directamente en sitios metastásicos del tumor de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido de cabeza y cuello cerca del tumor de cabeza y cuello.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama en estadio temprano, cáncer de mama no metastásico, cáncer de mama avanzado, cáncer de mama en estadio IV, cáncer de mama localmente avanzado, cáncer de mama metastásico, cáncer de mama en remisión, cáncer de mama en un entorno adyuvante o cáncer de mama en un entorno neoadyuvante. En algunas realizaciones, el cáncer de mama se encuentra en un entorno neoadyuvante. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en un estadio avanzado. En algunas realizaciones, el cáncer de mama (que puede ser positivo para HER2 o negativo para HER2) incluye, por ejemplo, cáncer de mama avanzado, cáncer de mama en estadio IV, cáncer de mama localmente avanzado y cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intramamaria en el tejido mamario que tiene el tumor de mama. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se realiza mediante inyección intramamaria directamente en el tumor de mama. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en sitios metastásicos del tumor de mama. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intramamaria en el tejido mamario cerca del tumor de mama.

En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma de células renales. En algunas realizaciones, el carcinoma de células renales es un adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el carcinoma de células renales es un carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células renales papilar (también llamado carcinoma de células renales cromófilo), carcinoma de células renales cromóforo, carcinoma de células renales del conducto colector, carcinoma de células renales granulares, carcinoma de células renales granulares mixto, angiomiolipomas renales o carcinoma de células renales fusiformes. En algunas realizaciones, el carcinoma de células renales se encuentra en cualquiera de los estadios I, II, III o IV, de acuerdo con los grupos de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC). En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la

combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrarrenal en el tejido renal que tiene el tumor renal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se realiza mediante inyección intrarrenal directamente en el tumor renal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en sitios metastásicos del tumor renal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrarrenal en el tejido renal cerca del tumor renal.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata es un adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata es un sarcoma, tumor neuroendocrino, cáncer microcítico, cáncer ductal o un linfoma. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata se encuentra en cualquiera de los cuatro estadios, A, B, C o D, según el sistema de estadificación de Jewett. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraprostática en el tejido prostático que tiene el tumor de próstata. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraprostática directamente en el tumor de próstata. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de próstata. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraprostática en el tejido prostático cerca del tumor de próstata.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Los ejemplos de CPNMC incluyen, pero sin limitaciones, carcinoma de células grandes, adenocarcinoma, tumores pulmonares neuroendocrinos y carcinoma escamocelular. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrapulmonar en el tejido de pulmón que tiene el tumor de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón microcítico (CPMC). En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrapulmonar directamente en el tumor de pulmón. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de pulmón. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrapulmonar en el tejido de pulmón cerca del tumor de pulmón.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es melanoma. En algunas realizaciones, el melanoma cutáneo es melanoma de extensión superficial, melanoma sobre lentigo maligno, melanoma nodular, melanoma de mucosas, melanoma polipode, melanoma desmoplásico, melanoma amelanico, melanoma de tejidos blandos o melanoma lentiginoso acral. En algunas realizaciones, el melanoma se encuentra en cualquiera de los estadios I, II, III o IV, de acuerdo con los grupos de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC). En algunas realizaciones, el melanoma es recurrente. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido cutáneo que tiene el tumor de melanoma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el tumor de melanoma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de melanoma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido pulmonar cerca del tumor de melanoma.

En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es cáncer de ovarios. En algunas realizaciones, el cáncer de ovarios es cáncer epitelial de ovarios. En algunas realizaciones, el cáncer de ovarios está en estadio I (por ejemplo, estadio IA, IB, o IC), estadio II (por ejemplo, estadio HA, HB o IIC), estadio III (por ejemplo, estadio IIIA, HIB o HIC) o estadio IV. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraovárica en el tejido ovárico que tiene el tumor de ovarios. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraovárica directamente en el tumor de ovarios. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los



sitios metastásicos del tumor de ovarios. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraovárica en el tejido ovárico cerca del tumor de ovarios.

- 5 En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es cáncer de páncreas. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es una neoplasia serosa quística, neoplasia quística mucinosa, neoplasia mucinosa papilar intraductal, adenocarcinoma pancreático, carcinoma adenoescamoso, carcinoma escamocelular, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma indiferenciado, carcinoma indiferenciado con células gigantes, neoplasia pseudopapilar sólida, cáncer ampular o tumor neuroendocrino pancreático. En algunas
- 10 realizaciones, el cáncer de páncreas es un adenocarcinoma pancreático. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrapancreática en el tejido pancreático que tiene el tumor de páncreas. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrapancreática directamente en el tumor de páncreas. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de páncreas. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrapancreática en el tejido pancreático cerca del tumor de páncreas.
- 20

- En algunas realizaciones, el tumor sólido o linfático es cáncer de endometrio. En algunas realizaciones, el cáncer de endometrio es adenocarcinoma, carcinosarcoma, carcinoma escamocelular, carcinoma indiferenciado, carcinoma de células pequeñas o carcinoma transicional. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del
- 25 inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraendometrial en el tejido de endometrio que tiene el tumor de endometrio. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraendometrial directamente en el tumor de endometrio. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del
- 30 inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de endometrio. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intraendometrial en el tejido de endometrio cerca del tumor de endometrio.
- 35

- En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer colorrectal es adenocarcinoma, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal, leiomioma, melanoma o carcinoma escamocelular. En algunas
- 40 realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido colorrectal que tiene el tumor colorrectal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el tumor colorrectal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor colorrectal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido colorrectal cerca del tumor colorrectal.
- 45

- 50 En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es carcinoma hepatocelular (CHC). En algunas realizaciones, el CHC es CHC en estadio temprano, CHC no metastásico, CHC primario, CHC avanzado, CHC localmente avanzado, CHC metastásico, CHC en remisión o CHC recurrente. En algunas realizaciones, el CHC es localizado operable (es decir, tumores que están confinados a una parte del hígado que permite una extirpación quirúrgica completa), localizado inoperable (es decir, los tumores
- 55 localizados pueden ser inoperables dado que están involucradas estructuras de vasos sanguíneos cruciales o dado que el hígado está afectado), o inoperable (es decir, los tumores involucran a todos los lóbulos del hígado y/o se han extendido para involucrar a otros órganos (por ejemplo, pulmón, ganglios linfáticos, hueso). En algunas realizaciones, el CHC es, de acuerdo con las clasificaciones de TNM, un tumor en estadio I (un único tumor sin invasión vascular), un tumor en estadio II (un único tumor con invasión vascular o tumores múltiples, ninguno mayor de 5 cm), un tumor
- 60 en estadio III (tumores múltiples, cualquiera mayor de 5 cm o tumores en los que está implicada la rama principal de venas portales o hepáticas), un tumor en estadio IV (tumores con invasión directa de órganos adyacentes distintos de la vesícula biliar, o perforación del peritoneo visceral), tumor N1 (metástasis en los ganglios linfáticos regionales) o tumor M1 (metástasis a distancia). En algunas realizaciones, el CHC es, de acuerdo con los criterios de estadificación de la AJCC (American Joint Commission on Cancer), CHC en estadio T1, T2, T3 o T4. En algunas realizaciones, el
- 65 CHC es uno cualquiera de carcinomas de células hepáticas, variantes fibrolaminares de CHC, y colangiocarcinomas hepatocelulares mixtos. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador



(incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrahepática en el tejido hepático que tiene el CHC. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrahepática directamente en el CHC. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del CHC. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrahepática en el tejido cerca del CHC.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es linfoma. En algunas realizaciones, el linfoma es una neoplasia de linfocitos B, una neoplasia de linfocitos T y/o una posible neoplasia de células NK. Los ejemplos de neoplasias de linfocitos B incluyen, pero sin limitaciones, neoplasias de linfocitos B precursores (por ejemplo, leucemia/linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores) y neoplasias de linfocitos B periféricos (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B/leucemia prolinfocítica/linfoma linfocítico pequeño (LNH linfocítico pequeño (LP)), linfoma linfoplasmocitoide/inmunocitoma, linfoma de células del manto, linfoma centrofolicular, linfoma folicular (por ejemplo, grados citológicos: I (célula pequeña), II (células mixtas pequeñas y grandes), III (células grandes) y/o subtipo: difuso y predominantemente de tipo de célula pequeña), linfoma no Hodgkin (LNH) folicular/de bajo grado, LNH de grado intermedio/folicular, linfoma de linfocitos B de la zona marginal (por ejemplo, extranodal (por ejemplo, linfocitos B monocitoides tipo MALT+/-) y/o nodal (por ejemplo, linfocitos B monocitoides +/-)), linfoma de la zona marginal esplénica (por ejemplo, linfocitos vellosos +/-), tricoleucemia, plasmocitoma/mieloma de células plasmáticas (por ejemplo, mieloma y mieloma múltiple), linfoma difuso de linfocitos B grandes (por ejemplo, linfoma primario de linfocitos B mediastínico (tímico)), LNH difuso de grado intermedio, linfoma de Burkitt, Linfoma de linfocitos B de alto grado, similar al Burkitt, LNH inmunoblástico de alto grado, LNH linfoblástico de alto grado, LNH de células no escindidas pequeñas de alto grado, LNH con neoplasia maligna, Linfoma relacionado con el SIDA y macroglobulinemia de Waldenström). Los ejemplos de neoplasias de linfocitos T y/o presuntas células NK incluyen, pero sin limitaciones, neoplasia de linfocitos T precursores (linfoma/leucemia linfoblástica de linfocitos T precursores) y neoplasias de linfocitos T y células NK periféricos (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de linfocitos T/leucemia prolinfocítica y leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) (por ejemplo, tipo de linfocitos T y/o tipo de células NK), linfoma cutáneo de linfocitos T (por ejemplo, micosis fungoide/síndrome de Sézary), linfomas primarios de linfocitos T no especificados (por ejemplo, categorías citológicas (por ejemplo, células de tamaño mediano, células mixtas medianas y grandes), células grandes, célula linfoepitelioide, linfoma de linfocitos T y/o subtipo hepatoesplénico y linfoma de linfocitos T paniculítico subcutáneo), linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T (AILD, por sus siglas en inglés), linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T (por ejemplo, +/-asociado a enteropatía), leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto (LTA), linfoma anaplásico de células grandes (LACG) (por ejemplo, CD30+, tipos de linfocitos T- y nulos), linfoma anaplásico de células grandes y de tipo Hodgkin). En algunas realizaciones, el linfoma es la enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin (LNH). Por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin puede tener predominio linfocítico, esclerosis nodular, con celularidad mixta, depleción de linfocitos y/o rico en linfocitos. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intralinfática en el ganglio linfático que tiene el tumor linfático. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intralinfática directamente en el tumor linfático. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor linfático. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intralinfática en el tejido cerca del tumor linfático.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es mesotelioma. En algunas realizaciones, el mesotelioma es el mesotelioma pleural, mesotelioma peritoneal, mesotelioma pericárdico o mesotelioma que afecta al tejido mesotelial que recubre otros órganos. En algunas realizaciones, el mesotelioma es mesotelioma benigno o mesotelioma maligno. En algunas realizaciones, el mesotelioma es un mesotelioma epitelial, mesotelioma sarcomatoide, mesotelioma bifásico o mesotelioma papilar. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido mesotelial que tiene el mesotelioma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el mesotelioma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del mesotelioma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido mesotelial cerca del mesotelioma.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es tumor cerebral. En algunas realizaciones, el tumor cerebral es un tumor cerebral primario o un tumor cerebral

secundario (o metastásico). En algunas realizaciones, el tumor cerebral es un glioma (tal como astrocitoma, oligodendroglioma o ependimoma), meningioma, schwannoma, craneofaringioma, tumor de células germinales o tumor de la región pineal. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido cerebral que tiene el tumor cerebral. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el tumor cerebral. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor cerebral. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido cerebral cerca del tumor cerebral.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar. En algunas realizaciones, el tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar es carcinoma, adenocarcinoma, colangiocarcinoma, tumor papilar, carcinoma de células pequeñas (neuroendocrino), carcinoma adenoescamoso o rhabdomyosarcoma. En algunas realizaciones, el tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar es carcinoma de vesícula biliar, carcinoma del conducto biliar extrahepático o carcinoma del conducto biliar intrahepático. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluyendo la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido de la vesícula biliar o del conducto biliar que tiene el tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, la administración del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se realiza mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluyendo la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido de la vesícula biliar o del conducto biliar cerca del tumor de la vesícula biliar y del conducto biliar.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es sarcoma de tejidos blandos. En algunas realizaciones, el sarcoma de tejidos blandos es fibrosarcoma del adulto, sarcoma alveolar de las partes blandas, angiosarcoma, sarcoma de células claras, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, sarcoma epiteloide, sarcoma fibromixioide, liposarcoma, mesenquimoma maligno, tumor maligno de la vaina del nervio periférico (TMVNP), neurofibrosarcoma, schwannoma maligno o sarcoma neurogénico), mixofibrosarcoma, sarcoma sinovial, sarcoma pleomórfico indiferenciado, dermatofibrosarcoma protuberans, fibromatosis, hemangioendotelioma, fibrosarcoma infantil, tumor fibroso solitario, elastofibroma, fibroma, histiocitoma fibroso, tumor del glomus, tumor de células granulares, hemangioma, hibernoma, lipoma, leiomioma, leiomioma, lipoblastoma, linfangioma, mixoma, neurofibroma, neuroma, PEComa, rhabdomyoma, schwannoma, tumor de células gigantes tenosinovial, tumor de células fusiformes o afecciones similares a tumores de tejidos blandos. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido que tiene el sarcoma de tejidos blandos. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el sarcoma de tejidos blandos. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del sarcoma de tejidos blandos. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido cerca del sarcoma de tejidos blandos.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es tumor uterino. En algunas realizaciones, el tumor uterino es carcinoma uterino, sarcoma uterino (tal como sarcoma del estroma endometrial, sarcoma indiferenciado o leiomyosarcoma uterino) o carcinosarcoma uterino (como tumor mesodérmico mixto maligno o tumor mülleriano mixto maligno). En algunas realizaciones, el tumor uterino es un tumor fibroide, tal como leiomioma, adenofibroma o adenomioma. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrauterina en el tejido uterino que tiene el tumor uterino. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrauterina directamente en el tumor uterino. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor uterino. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intrauterina en el tejido uterino cerca del tumor uterino.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es tumor de cuello uterino. En algunas realizaciones, el tumor de cuello uterino es un carcinoma escamocelular, adenocarcinoma o carcinoma adenoescamoso. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intracervical en el tejido cervical que tiene el tumor de cuello uterino. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intracervical directamente en el tumor de cuello uterino. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de cuello uterino. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección intracervical en el tejido cervical cerca del tumor de cuello uterino.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es tumor de tiroides. En algunas realizaciones, el tumor de tiroides es un tumor tiroideo diferenciado (tal como carcinoma papilar, carcinoma folicular o carcinoma de células de Hürthle), carcinoma medular de tiroides, carcinoma anaplásico, linfoma de tiroides, sarcoma de tiroides o tumor paratiroideo. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido tiroideo que tiene el tumor de tiroides. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el tumor de tiroides. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del tumor de tiroides. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido tiroideo cerca del tumor de tiroides.

En algunas realizaciones, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el tumor sólido o linfático es carcinoma nasofaríngeo. En algunas realizaciones, el carcinoma nasofaríngeo es carcinoma escamocelular queratinizante, carcinoma diferenciado no queratinizante o carcinoma indiferenciado (por ejemplo, linfioepitelioma), tumor de la cavidad oral y orofaríngeo, tumor de la cavidad nasal y de los senos paranasales o tumor de las glándulas salivales. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido nasofaríngeo que tiene el carcinoma nasofaríngeo. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en el carcinoma nasofaríngeo. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección directamente en los sitios metastásicos del carcinoma nasofaríngeo. En algunas realizaciones, la administración del agente infeccioso, del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o de la composición de pretratamiento se lleva a cabo mediante inyección en el tejido nasofaríngeo cerca del carcinoma nasofaríngeo.

En algunas realizaciones, el individuo es un individuo humano. En algunas realizaciones, se ha identificado que el individuo que está recibiendo tratamiento por un tumor sólido o linfático tiene una o más de las afecciones descritas en el presente documento. La identificación de las afecciones como se describe en el presente documento por un médico experto es una rutina en la técnica (por ejemplo, mediante análisis de sangre, radiografías, ultrasonidos, exploraciones por TC, exploraciones PET, exploraciones PET/TC, exploraciones RMN, exploraciones PET/RMN, exploraciones con radioisótopos de medicina nuclear, endoscopia, biopsia, angiografía, angiografía por TC, etc.) y también puede ser sospechado por el individuo o por otros, por ejemplo, debido al crecimiento del tumor, hemorragia, ulceración, dolor, ganglios linfáticos agrandados, tos, ictericia, hinchamiento, pérdida de peso, caquexia, sudoración, anemia, fenómenos paraneoplásicos, trombosis, etc. En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para uno cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento en función de uno o más de varios factores de riesgo y/o enfoques de diagnóstico apreciados por el experto, incluyendo, pero sin limitaciones, el perfil genético, el historial familiar, el historial médico (por ejemplo, aparición de afecciones relacionadas y antecedentes de infecciones virales), el estilo o los hábitos de vida.

En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para uno cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento en función del nivel de expresión de uno o más biomarcadores, incluyendo, pero sin limitaciones, las moléculas de puntos de control inmunitario, moléculas coestimulantes, citocinas, quimiocinas, otras moléculas relacionadas con el sistema inmunológico y antígenos HLA de clase II. En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para el tratamiento en función del nivel de expresión (por ejemplo, alto nivel de expresión) de una o más moléculas inhibidoras de puntos de control inmunitario, incluyendo, pero sin limitaciones, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, B7-H3, B7-H4, LAG-3, KIR, 2B4 y ligandos de los mismos. En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para los métodos de tratamiento en función del nivel de expresión (por ejemplo, nivel de expresión bajo)

de una o más moléculas estimulantes de puntos de control inmunitario o moléculas coestimulantes, incluyendo, pero sin limitaciones, OX40, 4-1BB, CD40 y ligandos de los mismos. En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para el tratamiento en función del nivel de expresión (por ejemplo, nivel de expresión alto) de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en PD-1, PD-L1 y PD-L2 en el tumor (tal como células tumorales y/o células inmunitarias dentro del tumor). En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para el tratamiento en función del nivel de expresión (por ejemplo, nivel de expresión alto) de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en CD80, CD83, CD86 y antígenos HLA de Clase II en células dendríticas maduras derivadas de tumores. En algunas realizaciones, el individuo es seleccionado para el tratamiento en función del nivel de expresión (por ejemplo, nivel de expresión alto) de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCR7, CCL5, CCL8, SOD2, MT2A, OASL, GBP1, HES4, MTIB, MTIE, MTIG, MTHI, GADD45A, LAMP3 y miR-155.

En algunas realizaciones, el individuo tiene una alta expresión de una o más moléculas inhibidoras de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el individuo tiene una baja expresión de una o más moléculas de puntos de control inmunitario estimulantes y/o moléculas coestimulantes. En algunas realizaciones, el individuo tiene una expresión alta de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en PD-1, PD-L1 y PD-L2 en el tumor (tal como células tumorales y/o células inmunitarias dentro del tumor). En algunas realizaciones, PD-L1 y PD-L2 se pueden utilizar indistintamente como biomarcador para seleccionar pacientes o como ligando para inhibir PD-1. En algunas realizaciones, el individuo tiene una expresión alta de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en CD80, CD83, CD86 y antígenos HLA de Clase II en células dendríticas maduras derivadas de tumores. Los antígenos de HLA de clase II ilustrativos incluyen, pero sin limitaciones, antígenos específicos del tumor y antígenos asociados al tumor expresados en el tumor sólido o linfático, tales como PSA para el tumor de próstata, alfa-fetoproteína para el CHC, CEA para el adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el individuo tiene una expresión alta de uno o más biomarcadores seleccionados entre el grupo que consiste en CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCR7, CCL5, CCL8, SOD2, MT2A, OASL, GBP1, HES4, MTIB, MTIE, MTIG, MTHI, GADD45A, LAMP3 y miR-155. En algunas realizaciones, el método comprende además evaluar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores en el individuo. En algunas realizaciones, el método se ajusta en función del nivel de expresión de uno o más biomarcadores.

El nivel de expresión de un biomarcador se puede medir a nivel de ácido nucleico (por ejemplo, número de copias de genes, nivel de metilación del ADN o remodelación de la cromatina, nivel de ARNm) o nivel de proteína, incluyendo el nivel de modificación postraducciona de la proteína, tal como el nivel de fosforilación de la proteína correspondiente al biomarcador. El nivel de expresión se puede determinar utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos adecuados para determinar el nivel de expresión de ARNm de un biomarcador incluyen, pero sin limitaciones, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), PCR cuantitativa, microarray y secuenciación de ARN. Por ejemplo, los métodos adecuados para determinar el nivel de expresión de proteína de un biomarcador incluyen, pero sin limitaciones, inmunohistoquímica, métodos de Western blot y espectroscopia de masas.

El nivel de expresión del biomarcador se puede determinar utilizando una muestra fresca o archivada del individuo, incluyendo, pero sin limitaciones, el tejido tumoral sólido o linfático, un tejido normal adyacente al tejido tumoral sólido o linfático, un tejido normal distal al tejido tumoral sólido o linfático o linfocitos de sangre periférica. En algunas realizaciones, la muestra es tejido tumoral sólido o linfático. En algunas realizaciones, la muestra es una biopsia que contiene células tumorales, tal como aspiración con aguja fina de células tumorales. En algunas realizaciones, las células biopsiadas se centrifugan hasta formar un pellet, se fijan y se incluyen en parafina antes del análisis. En algunas realizaciones, las células biopsiadas se ultracongelan antes del análisis. En algunas realizaciones, la muestra es un fluido corporal, tal como una muestra de sangre o una muestra de plasma. En algunas realizaciones, la muestra comprende una célula cancerosa metastásica circulante. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene separando las células tumorales circulantes (CTC) de la sangre.

En algunas realizaciones, los niveles de expresión del uno o más biomarcadores en una población celular específica del individuo se determinan utilizando una muestra del individuo. En algunas realizaciones, la muestra comprende células inmunitarias aisladas o derivadas del tumor sólido o linfático. Las células inmunitarias ilustrativas que son relevantes para la determinación de la expresión de biomarcadores incluyen, pero sin limitaciones, células dendríticas (tales como células dendríticas inmaduras o maduras), linfocitos B, linfocitos T (tales como linfocitos Th1, linfocitos Th2 o linfocitos Th17, linfocitos T NK, Los linfocitos Treg, etc.), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, macrófagos, neutrófilos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la muestra comprende linfocitos infiltrados en el tumor. En algunas realizaciones, la muestra comprende células dendríticas maduras derivadas de tumores. La población celular específica se puede aislar de una muestra, tal como una muestra de tumor (por ejemplo, biopsia o resección de tumor) o un fluido corporal (por ejemplo, muestra de sangre), usando métodos conocidos en la técnica, tales como los métodos de citometría de flujo basados en la expresión de moléculas específicas de la superficie celular en la población celular.

El nivel de expresión alto o bajo de un biomarcador se determina en comparación con un nivel de expresión estándar del biomarcador conocido en la técnica (por ejemplo, un nivel normal clínicamente aceptado en una prueba estandarizada), o en comparación con el nivel de expresión del biomarcador en una muestra de control. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del biomarcador en un individuo se compara con el nivel de expresión del

biomarcador en múltiples muestras de control. En algunas realizaciones, se utilizan múltiples muestras de control para generar una estadística que se utiliza para clasificar el nivel del biomarcador en un individuo con tumor sólido o linfático. Las muestras de control pueden obtenerse de las mismas fuentes (por ejemplo, individuos y tejidos) y métodos que las muestras que no son de control. En algunas realizaciones, la muestra de control se obtiene de un individuo diferente (por ejemplo, un individuo que no tiene el tumor sólido o linfático; un individuo que tiene una forma benigna o menos avanzada del tumor sólido o linfático; y/o un individuo que comparte etnia, edad y sexo similares). En algunas realizaciones, la muestra de control es un tejido o célula cultivada que se ha determinado que es un control adecuado. En algunas realizaciones, en donde la muestra es una muestra de tejido tumoral sólido o linfático, la muestra de control puede ser una muestra no cancerosa del mismo individuo. En algunas realizaciones, se utilizan múltiples muestras de control (por ejemplo, de diferentes individuos) para determinar un intervalo de niveles del biomarcador en un tejido, órgano o población de células concretos. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del biomarcador en una muestra del individuo se clasifica como alto, medio o bajo según un sistema de puntuación, tal como un sistema de puntuación basado en inmunohistoquímica. En algunas realizaciones, la expresión alta del biomarcador es al menos aproximadamente una cualquiera de 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o más que el nivel de expresión del biomarcador en una muestra del individuo en comparación con una muestra de control. En algunas realizaciones, la expresión baja del biomarcador no es más que aproximadamente una cualquiera del 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % o menos que el nivel de expresión del biomarcador en una muestra del individuo en comparación con una muestra de control. En algunas realizaciones, se combinan los niveles de expresión de dos o más biomarcadores, por ejemplo, utilizando un modelo estadístico para determinar una puntuación de expresión, para seleccionar o recomendar al individuo para el tratamiento.

#### Usos médicos para el tratamiento del cáncer de vejiga mediante administraciones intravesicales

Un aspecto de la presente solicitud se refiere al tratamiento del cáncer de vejiga. En este contexto, la administración local del agente infeccioso y del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) puede abarcar la administración intravesical de uno o ambos componentes. Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede ser útil para inhibir el crecimiento de un tumor de vejiga, inhibir la metástasis de un tumor de vejiga, prolongar la supervivencia (por ejemplo, la supervivencia libre de enfermedad) de un individuo que tiene cáncer de vejiga, provocar la remisión de la enfermedad en un individuo que tiene cáncer de vejiga y/o mejorar la calidad de vida de un individuo que tiene cáncer de vejiga.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus, tales como un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus del herpes simple, virus variolovacunal, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la polio, virus del sarampión, virus del valle de Senecca, virus coxsackie, virus reo, virus de la estomatitis vesicular, maraba y rabdovirus, y parvovirus. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del agente infeccioso y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por una vía de administración distinta a la administración intravesical.

En algunas realizaciones, el virus oncolítico es un virus oncolítico de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el virus oncolítico está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se atenúa (por ejemplo mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el virus oncolítico es competente para replicarse. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se replica preferentemente en una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el virus oncolítico se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por una vía de administración distinta a la administración intravesical.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por una vía de administración distinta a la administración intravesical.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una citocina unida operativamente a un promotor viral; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la citocina es el promotor E3. En algunas realizaciones, la citocina es GM-CSF. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por una vía de administración distinta a la administración intravesical.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina); y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el adenovirus se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del adenovirus y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por una vía de administración distinta a la administración intravesical.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de CG0070; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos

inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el CG0070 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de CG0070 y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) por una vía de administración distinta a la administración intravesical.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar diversas afecciones de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga de grado bajo. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es un cáncer de vejiga de grado alto. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es invasivo del músculo (por ejemplo, T2, T3 o T4). En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es no invasivo (por ejemplo, Ta, T1 Cis, Cis con Ta y/o T1).

En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es un carcinoma de células transicionales o carcinoma urotelial (tal como carcinoma urotelial metastásico), incluyendo, pero sin limitaciones, tumores papilares y carcinomas planos. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es un carcinoma urotelial metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma urotelial de la vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma urotelial del uréter. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma urotelial de la uretra. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma urotelial de la pelvis renal.

En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma escamocelular. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma no escamocelular. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es carcinoma de células pequeñas.

En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es cáncer de vejiga en estadio temprano, cáncer de vejiga no metastásico, cáncer de vejiga no invasivo, cáncer de vejiga sin invasión muscular, cáncer de vejiga primario, cáncer de vejiga avanzado, cáncer de vejiga localmente avanzado (tal como cáncer de vejiga localmente avanzado irresecable), cáncer de vejiga metastásico o cáncer de vejiga en remisión. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es localizado y resecable, inoperable localizado o inoperable. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es de grado alto, cáncer sin invasión muscular que ha sido refractario a la terapia de infusión en el interior de la vejiga estándar (intravesical).

Los métodos proporcionados en el presente documento se pueden utilizar para tratar a un individuo (por ejemplo, un ser humano) al que se le ha diagnosticado o se sospecha que tiene cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el individuo ha sido sometido a una resección tumoral. En algunas realizaciones, el individuo ha rechazado la cirugía. En algunas realizaciones, el individuo es médicamente inoperable. En algunas realizaciones, el individuo se encuentra en un estadio clínica de cáncer de vejiga Ta, Tis, T1, T2, T3a, T3b o T4. En algunas realizaciones, el individuo se encuentra en un estadio clínico de Tis, CIS, Ta o T1.

En algunas realizaciones, el individuo ha sido tratado previamente por cáncer de vejiga (también conocido como "terapia previa"). En algunas realizaciones, el individuo ha sido tratado previamente con una terapia estándar para el cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, la terapia estándar anterior es el tratamiento con BCG. En algunas realizaciones, la terapia estándar previa es el tratamiento con mitomicina C. En algunas realizaciones, la terapia estándar previa es el tratamiento con interferón (tal como el interferón- $\alpha$ ). En algunas realizaciones, el individuo tiene cáncer de vejiga en remisión, cáncer de vejiga progresivo o cáncer de vejiga recurrente. En algunas realizaciones, el individuo es resistente al tratamiento del cáncer de vejiga con otros agentes (tales como agentes a base de platino, BCG, mitomicina C y/o interferón). En algunas realizaciones, el individuo responde inicialmente al tratamiento del cáncer de vejiga con otros agentes (tales como agentes a base de platino o BCG) pero ha progresado después del tratamiento.

En algunas realizaciones, el individuo tiene cáncer de vejiga recurrente (tal como un cáncer de vejiga en el estadio clínica de Ta, Tis, T1, T2, T3a, T3b o T4) después de una terapia previa (tal como una terapia estándar previa, por ejemplo, tratamiento con BCG). Por ejemplo, el individuo puede responder inicialmente al tratamiento con la terapia previa, pero desarrolla cáncer de vejiga después de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48 o 60 meses tras la interrupción de la terapia previa.

Cualquiera de los inmunomoduladores descritos en el presente documento, incluidos agentes inmunoestimulantes e inhibidores de puntos de control inmunitario, puede utilizarse en la terapia combinada para administración intravesical. El inmunomodulador puede ser una cualquiera de las modalidades moleculares conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, aptámero, ARNm, ARNip, microARN, ARNhc, péptido, anticuerpo, anticlina, ácido nucleico esférico, TALEN, nucleasas con dedos de cinc, CRISPR/Cas9 y moléculas pequeñas.

Un agente inmunoestimulante puede ser un ligando natural o diseñado de una molécula inmunoestimulante, incluyendo, por ejemplo, ligandos de OX40 (por ejemplo, OX40L), ligandos de CD-28 (por ejemplo, CD80, CD86), ligandos de ICOS (por ejemplo, B7RP1), ligandos de 4-1BB (por ejemplo, 4-1BBL, Ultra4- 1BBL), ligandos de CD27 (por ejemplo, CD70), ligandos de CD40 (por ejemplo, CD40L) y ligandos de TCR (por ejemplo, moléculas de MHC de



clase I o clase II, IMCgp100). En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulante es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anti-CD28 (por ejemplo, TGN-1412), anti-0X40 (por ejemplo, MED16469, MEDI-0562), anti-ICOS (por ejemplo, MEDI-570), anti-GITR (por ejemplo, TRX518, INBRX-110, NOV-120301), anti-41-BB (por ejemplo, BMS-663513, PF-05082566), anti-CD27 (por ejemplo, BION-1402, varilumab y hCD27.15), anti-CD40 (por ejemplo, CP870,893, BI-655064, BMS-986090, APX005, APX005M), anti-CD3 (por ejemplo, blinatumomab, muromonab) y anti-WHEM. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo agonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un ligando natural o diseñado de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitario, incluyendo, por ejemplo, ligandos de CTLA-4 (por ejemplo, B7.1, B7.2), ligandos de PD-1 (PD-L1). En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo que se dirige a una proteína inhibidora de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab, tremelimumab, KAHN-102) y anti-PD-L1 (por ejemplo, KY-1003 (EP20120194977)). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de un único inmunomodulador. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un agente inmunoestimulante.

En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de al menos dos inmunomoduladores (tal como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más). En algunas realizaciones, se administran simultáneamente todos o parte de los al menos dos inmunomoduladores, tal como en una única composición. En algunas realizaciones, la totalidad o parte de los al menos dos inmunomoduladores se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de una combinación de inmunomoduladores que comprende un inhibidor de puntos de control inmunitario y un agente inmunoestimulante. En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de una combinación de inmunomoduladores que comprende dos o más (tales como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) inhibidores de puntos de control. En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de una combinación de inmunomoduladores que comprende dos o más (tales como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) agentes inmunoestimulantes. En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de una combinación de inmunomoduladores que comprende cualquier número (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de inhibidores de puntos de control inmunitario y cualquier número (tal como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) de agentes inmunoestimulantes. Por ejemplo, en alguna realización, el método comprende: a) administrar por vía intravesical en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso (tal como un virus, por ejemplo un virus oncolítico); y b) administrar por vía intravesical al individuo una cantidad eficaz de un primer inmunomodulador (tal como un inhibidor de puntos de control inmunitario); y c) administrar por vía intravesical en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un segundo inmunomodulador (tal como un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab, o una proteína lipocalina diseñada, por ejemplo, una anticalina que reconoce específicamente CTLA-4) y un agonista de CD40 (tal como un anticuerpo anti-CD40 agonista, por ejemplo, APX005M). En algunas realizaciones, el método comprende la administración intravesical de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, por ejemplo, ipilimumab, o una proteína lipocalina diseñada, por ejemplo, una anticalina que reconoce específicamente CTLA-4) y un agonista 4-1BB (tal como un anticuerpo anti-4-1BB agonista, por ejemplo, PF-05082566).

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo (tal como un ser humano), que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, KY-1003, MCLA-145, RG7446, BMS935559, MPDL3280A, MEDI4736, avelumab o STI-A1010. En algunas



realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un inhibidor (por ejemplo, péptido, proteína o molécula pequeña) tanto de PD-L1 como de PD-L2, tales como AUR-012 y AMP-224. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración intravesical de un segundo inmunomodulador, tal como un agente inmunoestimulante (por ejemplo, un activador de CD40 o un activador de 4-1BB). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra

5 semanalmente. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra antes (por ejemplo, inmediatamente antes) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra después (por ejemplo inmediatamente después) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el agente

10 infeccioso y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del agente infeccioso y/o del inhibidor del ligando de PD-1 mediante una vía de administración distinta a la administración intravesical. En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 y el inhibidor de PD-L2 pueden usarse indistintamente en cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

15 Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como adenovirus oncolítico); y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2).

20 En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4.

25 En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina) unida operativamente a un promotor viral; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es GM-CSF.

30 En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina, por ejemplo, GM-CSF); y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1.

35 En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un individuo, que comprende: a) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de CG0070; y b) administrar por vía intravesical una cantidad eficaz de un inhibidor del ligando de PD-1 PD-L1 (tal como un anticuerpo anti-PD-L1 o un inhibidor tanto de PD-L1 como de PD-L2). En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, KY-1003, MCLA-145, RG7446, BMS935559, MPDL3280A, MEDI4736, avelumab o STI-A1010. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 es un inhibidor (por ejemplo, péptido, proteína o molécula pequeña) tanto de PD-L1 como de PD-L2, tales como AUR-012 y AMP-224. En algunas realizaciones, el CG007 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inhibidor del ligando de PD-1 se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el CG0070 y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el CG0070 se administra antes (por ejemplo, inmediatamente antes) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el CG0070 se

administra después (por ejemplo inmediatamente después) de la administración del inhibidor del ligando de PD-1. En algunas realizaciones, el CG0070 y el inhibidor del ligando de PD-1 se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de CG0070 y/o del inhibidor del ligando de PD-1 mediante una vía de administración distinta a la administración intravesical.

La administración intravesical del agente infeccioso y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) proporciona una oportunidad única de una exposición intravesical relativamente conveniente pero efectiva del tumor al agente infeccioso y/o al inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores), así como una toxicidad potencialmente reducida para otros tejidos. Las dosis adecuadas y la frecuencia de dosificación de los agentes infecciosos y del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) están dentro de los mismos intervalos que los descritos para la administración local de los agentes infecciosos y del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) respectivamente en la sección anterior.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administran mediante instilación como una solución a través de un catéter. En algunas realizaciones, el volumen total de la solución utilizada para la instalación intravesical es de aproximadamente 1 ml, 10 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 125 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 400 ml o 500 ml. En algunas realizaciones, el volumen total de la solución utilizada para la instalación intravesical es cualquiera de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 75 ml, de aproximadamente 75 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 125 ml, de aproximadamente 125 ml a aproximadamente 150 ml, de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 200 ml a aproximadamente 300 ml, de aproximadamente 300 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 400 ml a aproximadamente 500 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 500 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml, o de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 250 ml.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra a una dosis de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{15}$  partículas (tal como de aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  partículas, por ejemplo aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  partículas). En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra en un volumen de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 ml (tal como aproximadamente 100 ml) mediante instilación.

En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg (tal como, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg). En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra en una dosis no mayor que aproximadamente cualquiera de 500 mg, 400 mg, 300 mg, 200 mg, 100 mg, 80 mg, 60 mg, 40 mg, 20 mg o 10 mg por administración. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se administra en un volumen de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 500 ml (por ejemplo aproximadamente 100 ml) mediante instilación.

La solución del agente infeccioso y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) puede retenerse en la vejiga durante un cierto tiempo antes de orinar, con el fin de lograr una distribución uniforme o una exposición suficiente del agente infeccioso y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) entre las células tumorales de la vejiga. En algunas realizaciones, la solución se retiene en la vejiga del individuo durante al menos aproximadamente cualquiera de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas o más. En algunas realizaciones, la solución se retiene en la vejiga del individuo durante cualquiera de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 45 minutos, de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 50 minutos, de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso (tal como el virus oncolítico, por ejemplo, CG0070) queda retenido en la vejiga del individuo durante aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 50 minutos. En algunas realizaciones, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) se retiene en la vejiga durante aproximadamente 45 minutos a 1 hora. En algunas realizaciones, la eficacia de la administración intravesical del agente infeccioso se mejora aún más mediante un pretratamiento que comprende la administración intravesical de una cantidad eficaz de un agente potenciador de la transducción, tal como DDM.

En algunas realizaciones, la etapa de pretratamiento se lleva a cabo poniendo en contacto la superficie luminal de la vejiga del individuo con la composición de pretratamiento antes de la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). Por ejemplo, la composición de pretratamiento

puede comprender de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 % (tal como del 0,05 a aproximadamente el 0,2 %, por ejemplo, aproximadamente el 0,1 %) del agente potenciador de la transducción (tal como DDM). En algunas realizaciones, el volumen total de la composición de pretratamiento (tal como DDM) es de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 1000 ml (tal como de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 500 ml, o de aproximadamente 500 ml a aproximadamente 1000 ml). En algunas realizaciones, una dosis adecuada para la composición de pretratamiento es aproximadamente una cualquiera de 0,1 g, 0,2 g, 0,5 g, 0,75 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, 5 g o 10 g del agente potenciador de la transducción (tal como DDM). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de pretratamiento es de aproximadamente 1 g de DDM (por ejemplo, 100 ml de solución de DDM al 0,1 %).

En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento (tal como DDM) se administra inmediatamente (por ejemplo, no más de 5 minutos) antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento (tal como DDM) se administra no más de cualquiera de aproximadamente 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 90 minutos, 2 horas, 3 horas o 4 horas antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento (tal como DDM) se administra no más de aproximadamente 2 horas antes de la administración del agente infeccioso. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento (tal como la solución de DDM) se retiene en la vejiga durante al menos aproximadamente uno cualquiera de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos o 20 minutos. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento (tal como la solución de DDM) se retiene en la vejiga durante cualquiera de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 12 minutos a aproximadamente 15 minutos, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, la composición de pretratamiento (tal como la solución de DDM) se retiene en la vejiga durante aproximadamente 12 minutos a aproximadamente 15 minutos.

En algunas realizaciones, la etapa de pretratamiento se lleva a cabo poniendo en contacto la superficie luminal de la vejiga del individuo con la composición de pretratamiento antes de la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores).

En algunas realizaciones, el método comprende además lavar la superficie luminal de la vejiga en contacto con la composición de pretratamiento. En algunas realizaciones, el método comprende además lavar la superficie luminal de la vejiga después de poner en contacto la vejiga con la composición de pretratamiento antes de la administración del agente infeccioso.

En algunas realizaciones, la etapa de pretratamiento comprende una o más etapas de preparación del sitio del tumor como se describe en la sección "Métodos de tratamiento de un tumor sólido o linfático".

En algunas realizaciones, el pretratamiento comprende la administración intravesical de una cantidad eficaz de una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina, una quimiocina o PRRago). En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona entre el grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL12, interferón (tal como interferón de tipo 1, tipo 2 o tipo 3, por ejemplo, interferón- $\gamma$ ), CCL4, CCL19, CCL21, CXCL13, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, RIG-I, MDA5, LGP2, LTA $\beta$ , activadores de STING (tal como CDN), PRRago (tal como CpG, Imiquimod, o Poli I:C), estimuladores de TLR (tal como GS-9620, AED-1419, CYT-003- QbG10, AVE-0675 o PF-7909) y estimuladores del RLR (tal como RIG-I, Mda5, o estimuladores de LGP2). En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra directamente en su formato nativo. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra en un formato que incluiría un excipiente o cualquier compuesto conocido en la técnica que pueda retrasar su metabolismo, liberarse y/o descomponerse dentro del sitio del tumor. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se puede combinar con una o más moléculas relacionadas con el sistema inmunológico adicionales. En algunas realizaciones, las moléculas relacionadas con el sistema inmunológico de dos o más en combinaciones se administran en un formato que incluiría un excipiente o cualquier compuesto conocido en la técnica que pueda afectar a su metabolismo, liberarse y/o descomponerse dentro del sitio del tumor. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico induce células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y/o linfocitos T auxiliares foliculares. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra por separado del agente infeccioso (por ejemplo, en una composición separada o como una entidad separada en la misma composición). En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se administra al sitio del tumor mediante transducción. Los métodos de transducción ilustrativos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitaciones, el uso de fosfato de calcio, dendrímeros, liposomas, polímeros catiónicos, electroporación, compresión celular, sonoporación, transfección óptica, fusión de protoplastos, impalefección, administración hidrodinámica, pistola génica, magnetofección, transfección y nucleofección viral. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es expresada por el agente infeccioso. Por ejemplo, el agente infeccioso puede comprender un ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico, y el ácido nucleico puede estar en el vector viral o en un vector separado. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus que comprende un vector viral, y en donde el vector viral comprende el ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunitario está unido operativamente a un promotor viral, tal como un

promotor E1 o un promotor E3.

En algunas realizaciones, la etapa de pretratamiento comprende administrar una cantidad eficaz de radioterapia a la vejiga del individuo antes de la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, la radioterapia se realiza en combinación con quimioterapia. En algunas realizaciones, la radioterapia se administra sin quimioterapia. En algunas realizaciones, la radioterapia comprende la irradiación de todo el cuerpo. En algunas realizaciones, la radioterapia es la irradiación únicamente a las zonas donde se encuentran los tumores. En algunas realizaciones, la radioterapia es la irradiación de los tejidos que tienen el tumor. En algunas realizaciones, la radioterapia es la irradiación únicamente al sitio del tumor seleccionado para la administración local del agente infeccioso y el inmunomodulador. En algunas realizaciones, la radioterapia es la irradiación únicamente a un tejido que tiene el tumor seleccionado para la administración local del agente infeccioso y el inmunomodulador. En algunas realizaciones, la dosis de la radioterapia es insuficiente para erradicar las células tumorales. Por ejemplo, una dosis adecuada de radioterapia es aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy, 45 Gy, 50 Gy, 55 Gy, 60 Gy, 65 Gy, 70 Gy, 75 Gy, 80 Gy, 90 Gy o 100 Gy. En algunas realizaciones, la dosis de la radioterapia no es más que aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy, 40 Gy, 45 Gy, 50 Gy, 55 Gy, 60 Gy, 65 Gy, 70 Gy, 75 Gy, 80 Gy, 90 Gy o 100 Gy. En algunas realizaciones, la dosis de la radioterapia es una cualquiera de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 5 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 10 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 15 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 25 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 30 Gy a aproximadamente 35 Gy, de aproximadamente 35 Gy a aproximadamente 40 Gy, de aproximadamente 40 Gy a aproximadamente 45 Gy, de aproximadamente 45 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 50 Gy a aproximadamente 60 Gy, de aproximadamente 60 Gy a aproximadamente 70 Gy, de aproximadamente 70 Gy a aproximadamente 80 Gy, de aproximadamente 80 Gy a aproximadamente 100 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 40 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 25 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 30 Gy a aproximadamente 60 Gy, de aproximadamente 60 Gy a aproximadamente 80 Gy o de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 60 Gy. En algunas realizaciones, la radioterapia se administra en más de una fracción, tal como aproximadamente una cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 20 o más fracciones. En algunas realizaciones, las fracciones de radioterapia se administran a lo largo de aproximadamente una cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas o más. En algunas realizaciones, las fracciones de radioterapia se administran a lo largo de una cualquiera de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 5 semanas, de aproximadamente 5 semanas a aproximadamente 6 semanas, de aproximadamente 6 semanas a aproximadamente 7 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 4 semanas, de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 6 semanas o de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 semanas. En algunas realizaciones, la radioterapia se administra aproximadamente dos fracciones al día. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es de aproximadamente 1,8 Gy a aproximadamente 2 Gy al día, cinco días a la semana, para un adulto, o de aproximadamente 1,5 Gy a aproximadamente 1,8 Gy al día, cinco días a la semana para un niño. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es de aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 1,5 Gy, 2 Gy, 2,5 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy o más. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es una cualquiera de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 1,5 Gy, de aproximadamente 1,5 Gy a aproximadamente 2 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 2,5 Gy, de aproximadamente 2,5 Gy a aproximadamente 5 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 10 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 15 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 10 Gy o de aproximadamente 2 Gy a aproximadamente 20 Gy.

En algunas realizaciones, la radioterapia se administra en una sola fracción. En algunas realizaciones, la radioterapia tiene como objetivo la linfodepleción, ya sea como una fracción de dosis única al día o en múltiples fracciones a lo largo de días o semanas. En algunas realizaciones, de este modo, la radioterapia de linfodepleción se administra como irradiación corporal total. En algunas realizaciones, la linfodepleción se administra únicamente en sitios locales del tumor o en tejidos con el tumor. En algunas realizaciones, la radioterapia de linfodepleción se administra dos fracciones al día. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia de linfodepleción es de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 2 Gy al día, cinco días a la semana, para un adulto, o de aproximadamente 0,5 Gy a aproximadamente 1,8 Gy al día, cinco días a la semana para un niño. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es de aproximadamente una cualquiera de 1 Gy, 1,5 Gy, 2 Gy, 2,5 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy o más. En algunas realizaciones, cada fracción de la radioterapia es una cualquiera de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 1,5 Gy, de aproximadamente 1,5 Gy a aproximadamente 2 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 2,5 Gy, de aproximadamente 2,5 Gy a aproximadamente 5 Gy, de aproximadamente 5 Gy a aproximadamente 10 Gy, de aproximadamente 10 Gy a aproximadamente 15 Gy, de aproximadamente 15 Gy a aproximadamente 20 Gy, de aproximadamente 20 Gy a aproximadamente 30 Gy, de aproximadamente 25 Gy a aproximadamente 50 Gy, de aproximadamente 1 Gy a aproximadamente 10 Gy o de aproximadamente 2 Gy a

aproximadamente 20 Gy. En algunas realizaciones, la radioterapia de linfodepleción se administra con o sin el uso de un agente quimioterapéutico, tales como, pero sin limitación, ciclofosfamida y fludarabina.

- En la presente invención se puede utilizar cualquiera de los métodos conocidos de radioterapia, incluyendo, pero sin limitaciones, radioterapia de haz externo (EBRT o XRT), teleterapia, braquiritradioterapia, radioterapia con fuente sellada, terapia sistémica con radioisótopos (RIT), radioterapia de fuente no sellada, radioterapia intraoperatoria (IORT), radioterapia intraoperatoria dirigida (TARGIT), radioterapia de intensidad modulada (IMRT), terapia de arco modulado volumétrico (VMAT), terapia de partículas y terapia de barrena.
- En algunas realizaciones, la etapa de pretratamiento comprende administrar directa o indirectamente (por ejemplo, a través de una vía intravenosa) a la superficie luminal de la vejiga en el individuo una cantidad eficaz de un agente terapéutico antes de la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). En algunas realizaciones, el agente terapéutico es uno cualquiera o una combinación de agentes quimioterapéuticos conocidos en la técnica, por ejemplo, ciclofosfamida. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es uno cualquiera de los agentes o una combinación de agentes que se dirigen a una vía de señalización celular conocida en la técnica o la bloquean, por ejemplo, un inhibidor de BRAF. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es uno cualquiera o una combinación de terapias celulares conocidas en la técnica, por ejemplo, células TIL, células CAR/T y/o células TCR/T. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente que aumenta el nivel de citocinas involucradas en una vía inmunogénica. Cualquiera de las moléculas relacionadas con el sistema inmunológico descritas en el presente documento puede utilizarse como agente terapéutico, incluyendo, pero sin limitaciones, citocinas tales como IL6, IL8 e IL18 (estas citocinas pueden tener acciones proinflamatorias y/o antiinflamatorias, o algunas pueden promover la formación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento de tumores), quimiocinas (tales como CCL21 que puede promover la propagación del tumor mediante el aumento de las estructuras linfáticas), factores de crecimiento (tales como FLT3L), proteínas de choque térmico, inhibidores de quinasas de molécula pequeña (tal como el inhibidor de JAK2) e inhibidores de IAP. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente que causa disfunción o daño a un componente estructural de un tumor. Los agentes ilustrativos incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpo anti-VEGF, una hialuronidasa y n-dodecil- $\beta$ -maltósido. En algunas realizaciones, el agente terapéutico induce células inmunológicas, tales como células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T (tales como linfocitos T auxiliares foliculares).

### Terapia combinada con células tumorales

- Un aspecto de la presente solicitud proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo (tal como un ser humano), que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad efectiva de un inmunomodulador (incluyendo una combinación de inmunomoduladores) en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1; y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. Este método de terapia combinada de al menos tres componentes puede comprender cualquier realización de los métodos descritos anteriormente para la terapia combinada que comprende el agente infeccioso y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores). El presente método de terapia combinada que comprende las células tumorales inactivadas es ventajoso sobre otros métodos de inmunoterapia contra el cáncer que implican componentes similares, porque los parámetros de administración, tales como la dosis, la frecuencia de dosificación y/o la vía de administración, para cada uno de los tres componentes, en concreto, el agente infeccioso (tal como un virus oncolítico, por ejemplo, adenovirus oncolítico), el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y las células tumorales inactivadas se pueden ajustar de forma independiente para optimizar la eficacia y minimizar la toxicidad de la terapia para el individuo. Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede ser útil para inhibir el crecimiento de un tumor sólido o linfático, inhibir la metástasis de un tumor sólido o linfático, prolongar la supervivencia (por ejemplo, la supervivencia sin enfermedad) de un individuo que tiene un tumor sólido o linfático, provocar la remisión de la enfermedad en un individuo que tiene un tumor sólido o linfático y/o mejorar la calidad de vida de un individuo que tiene un tumor sólido o linfático.

- Sin estar sujetos a ninguna teoría o hipótesis, se cree que en esta terapia combinada de tres componentes, una fuente externa de células tumorales inactivadas pero vivas (también denominadas en el presente documento "células cancerosas vivas" o "células tumorales vivas"), ya sean de origen autólogo o alogénico, podría proporcionar una fuente adicional e importante de nuevos antígenos cuando se administra en el sitio del tumor. Fuente externa en este contexto significa que estas células tumorales ya han sido eliminadas previamente, del mismo individuo o de otro individuo. Es posible que las células hayan sido sometidas además a cultivo *in vitro* para la expansión, crioconservación, descongelación y caracterización. Se cree que esta fuente externa de células tumorales inactivadas a veces puede estimular no sólo una respuesta de linfocitos T, sino también puede provocar un linfocito B y, a veces, desencadenar una respuesta masiva de anticuerpos que es sinérgica con el agente infeccioso (tal como virus) y el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) como se ha descrito anteriormente.

- Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus

oncolítico; b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1; y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus, tales como un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus del herpes simple, virus variolovacunal, virus de las paperas, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la polio, virus del sarampión, virus del valle de Séneca, virus coxsackie, virus reo, virus de la estomatitis vesicular, maraba y rabdovirus, y parvovirus. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un modulador de la molécula del punto de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son autólogas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son alogénicas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas provienen de una línea de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se mezclan en el lugar de administración inmediatamente después de la administración. En algunas realizaciones, el agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el agente infeccioso, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del agente infeccioso y/o del inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas por una vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus; b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1; y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un modulador de la molécula de puntos de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son autólogas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son alogénicas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas provienen de una línea de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se mezclan en el lugar de administración inmediatamente después de la administración. En algunas realizaciones, el virus oncolítico, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas por una vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina) unida operativamente a un promotor viral; b) administrar localmente en el sitio

del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1; y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas, en donde las células tumorales inactivadas se inactivan. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un modulador de la molécula del punto de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es GM-CSF. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son autólogas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son alogénicas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas provienen de una línea de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente (por ejemplo en una única composición). En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y las células tumorales inactivadas se mezclan en el lugar de administración inmediatamente después de la administración. En algunas realizaciones, el virus oncolítico, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el virus oncolítico, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del virus oncolítico y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas por una vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina, quimiocina, por ejemplo, GM-CSF); b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1; y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un modulador de la molécula del punto de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son autólogas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son alogénicas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas provienen de una línea de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación. En algunas realizaciones, el adenovirus y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente (por ejemplo, en una única composición). En algunas realizaciones, el adenovirus y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración. En algunas realizaciones, el adenovirus y las células tumorales inactivadas se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el adenovirus y las células tumorales inactivadas se mezclan en el lugar de administración inmediatamente después de la administración. En algunas realizaciones, el adenovirus, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran al tejido que tiene el tumor. En algunas realizaciones, el adenovirus, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración del adenovirus y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas por una vía de administración distinta a la administración local.

En algunas realizaciones, se proporciona en combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, que comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de CG0070; y b) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un inmunomodulador (incluida una combinación de inmunomoduladores), en donde el inmunomodulador es un



inhibidor de PD-L1; y c) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un modulador de la molécula del punto de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el método comprende la administración local de una combinación de inmunomoduladores que comprende uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario y/o uno o más agentes inmunoestimulantes (tales como al menos dos inhibidores de puntos de control inmunitario, al menos dos agentes inmunoestimulantes, o una combinación de al menos un inhibidor de puntos de control inmunitario y al menos un agente inmunoestimulante). En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son autólogas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son alogénicas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas provienen de una línea de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación. En algunas realizaciones, CG0070 y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente (por ejemplo, en una única composición). En algunas realizaciones, CG0070 y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración. En algunas realizaciones, CG0070 y las células tumorales inactivadas se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, CG0070 y las células tumorales inactivadas se mezclan en el sitio de administración inmediatamente después de la administración. En algunas realizaciones, CG0070, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran al tejido que tiene el tumor sólido o linfático. En algunas realizaciones, CG0070, el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas se administran directamente en el tumor. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de CG0070 y/o el inmunomodulador (incluida la combinación de inmunomoduladores) y/o las células tumorales inactivadas por una vía de administración distinta a la administración local.

Las células tumorales inactivadas pueden obtenerse de diversas fuentes, incluyendo, aunque no de forma limitativa, fuente autóloga, fuente alogénica, una línea de células tumorales y combinaciones de las mismas. Normalmente, las células tumorales inactivadas son del mismo tipo o expresan uno o más de los mismos antígenos tumorales que el tumor sólido o linfático que se está tratando. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas consisten en una única población de células tumorales. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas comprenden una pluralidad (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o más) de poblaciones de células tumorales.

En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden de una fuente alogénica. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden de un individuo diferente que tiene un tumor (tal como un tumor sólido o linfático del mismo tipo). En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas y el tumor sólido o linfático del individuo que está siendo tratado expresan al menos un antígeno tumoral común (tal como el antígeno asociado al tumor y/o el antígeno específico del tumor).

En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden de una línea de células tumorales que comparte el mismo origen o perfil genético (tal como el perfil de expresión de antígeno tumoral) o uno similar al del tumor sólido o linfático del individuo. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas y el individuo que tiene un tumor expresan al menos un antígeno tumoral común (tal como un antígeno asociado al tumor y/o un antígeno específico del tumor). Por ejemplo, cuando el tumor sólido o linfático que se está tratando es cáncer de próstata, la línea celular de tumor de próstata puede seleccionarse entre el grupo que consiste en DU145, PC-3 y LnCaP.

En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden del mismo individuo que tiene el tumor sólido o linfático. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden del tejido que tiene el tumor sólido o linfático. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden del tumor sólido o linfático (por ejemplo, de una biopsia tumoral o de un tumor resecado). En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proceden de un sitio metastásico del tumor sólido o linfático del individuo. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas proporcionan uno o más componentes celulares, citocina, quimiocinas y/o antigénicos durante la muerte de las células tumorales inactivadas *in vivo*, en donde el uno o más componentes son muestreados y presentados de forma cruzada por las células presentadoras de antígeno (tales como células dendríticas) del individuo para estimular una respuesta inmunitaria contra el tumor sólido o linfático.

En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas están modificadas, tal como modificadas genéticamente, por ejemplo, a través de la transducción por un agente infeccioso que alberga un vector que codifica un transgén. Las células tumorales inactivadas pueden ser transducidas o transfectadas por el agente infeccioso *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se modifican para expresar o secretar una molécula relacionada con el sistema inmunológico. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es una citocina, una quimiocina u otra molécula relacionada con el sistema inmunológico. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona entre el grupo que consiste en IL-2, IL-12, interferón (tal como interferón de tipo 1, tipo 2 o tipo 3, por ejemplo, interferón  $\gamma$ ), CCL4, CCL19, CCL21, CXCL13, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, RIG-I, MDA5, LGP2 y LT $\alpha$ . En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona entre el grupo que consiste en activadores de STING (tal como CDN), PRRago (tal como CpG, Imiquimod, o Poli I:C), estimuladores de TLR (tal como GS-9620, AED-1419, CYT-003-QbG10, AVE-0675 o PF-7909) y estimuladores del RLR (tal como RIG-I, Mda5, o estimuladores de LGP2).



En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se modifican para expresar o secretar uno o más inmunomoduladores. En algunas realizaciones, los uno o más inmunomoduladores comprenden un agente inmunoestimulante. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulante es un ligando natural o diseñado de una molécula inmunoestimulante, incluyendo, por ejemplo, ligandos de OX40 (por ejemplo, OX40L), ligandos de CD-28 (por ejemplo, CD80, CD86), ligandos de ICOS (por ejemplo, B7RP1), ligandos de 4-1BB (por ejemplo, 4-1BBL, Ultra4-1BBL), ligandos de CD27 (por ejemplo, CD70), ligandos de CD40 (por ejemplo, CD40L) y ligandos de TCR (por ejemplo, moléculas de MHC de clase I o clase II, IMCgp100). En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulante es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anti-CD28 (por ejemplo, TGN-1412), anti-OX40 (por ejemplo, MEDI6469, MEDI-0562), anti-ICOS (por ejemplo, MEDI-570), anti-GITR (e.g., TRX518, INBRX-110, NOV-120301), anti-41-BB (por ejemplo, BMS-663513, PF-05082566), anti-CD27 (por ejemplo, BION-1402, varilumab y hCD27.15), anti-CD40 (por ejemplo, CP870.893, BI-655064, BMS-986090, APX005, APX005M), anti-CD3 (por ejemplo, blinatumomab, muromonab) y anti-WHEM. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo agonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, scFv u otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, los uno o más inmunomoduladores comprenden un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un ligando natural o diseñado de una molécula inhibidora de puntos de control inmunitario, incluyendo, por ejemplo, ligandos de CTLA-4 (por ejemplo, B7.1, B7.2), ligandos de TIM3 (por ejemplo, Galectina-9), ligandos del receptor A2a (por ejemplo, adenosina, regadenosón), ligandos de LAG3 (por ejemplo, moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II), ligandos de BTLA (por ejemplo, HVEM, B7-H4), ligandos de KIR (por ejemplo, moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II), ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1, PD-L2), ligandos de IDO (por ejemplo, NKTR-218, indoximod, NLG919) y ligandos de CD47 (por ejemplo, receptor SIRP-alfa). En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo que se dirige a una proteína inhibidora de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab, tremelimumab, KAHN-102), anti-TIM3 (por ejemplo, F38-2E2, ENUM005), anti-LAG3 (por ejemplo, BMS-986016, IMP701, IMP321, C9B7W), anti-KIR (por ejemplo, Lirilumab e IPH2101), anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab, pidilizumab, pembrolizumab, BMS-936559, atezolizumab, lambrolizumab, MK-3475, AMP-224, AMP-514, STI-A1110, TSR-042), anti-PD-L1 (por ejemplo, KY-1003 (EP20120194977), MCLA-145, RG7446, BMS-936559, MEDI-4736, MSB0010718C, AUR-012, STI-A1010, PCT/US2001/020964, MPDL3280A, AMP-224, dapirolizumab pegol (CDP-7657), MEDI-4920), anti-CD73 (por ejemplo, AR-42 (OSU-HDAC42, HDAC-42, AR42, AR 42, OSU-HDAC 42, OSU-HDAC-42, NSC D736012, HDAC- 42, HDAC 42, HDAC42, NSC D736012, NSC-D736012), MEDI-9447), anti-B7-H3 (por ejemplo, MGA271, DS-5573a, 8H9), anti-CD47 (por ejemplo, CC-90002, TTI-621, VLST-007), anti-BTLA, anti-VISTA, anti A2aR, anti-B7-I, anti B7-H4, anti-CD52 (tal como alemtuzumab), anti IL-10, anti-IL-35 y anti-TGF- $\beta$  (tal como fresolimumab). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, scFv u otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son transducidas y modificadas genéticamente por el agente infeccioso utilizado en la terapia combinada.

Las células tumorales pueden aislarse de un tejido, un tumor resecado o una biopsia de tumor mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, métodos mecánicos, de separación enzimática y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, una mezcla de collagenasa, DNasa e hialuronidasa se puede utilizar para incubar muestras de tumores y obtener células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, se obtienen múltiples lotes de células tumorales autólogas aisladas del tumor sólido o linfático o de sitios metastásicos del individuo durante el transcurso del tratamiento. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se crioconservan antes de la inactivación.

Dado que las células cancerosas, particularmente en sitios metastásicos, son mezclas heterogéneas de diferentes clones de células que experimentan replications rápidas y mutaciones frecuentes, a veces es preferible tener un componente específico que pueda adaptarse a estos cambios mientras o cuando ocurren. Las células tumorales autólogas se pueden preparar a partir de la muestra quirúrgica original, biopsias o de la extirpación de lesiones metastásicas posteriormente. Una de las ventajas de este método es que las células tumorales autólogas se pueden cambiar según la respuesta del paciente y la disponibilidad de muestras tumorales. Por ejemplo, un sistema vacunal *in vivo* con agente infeccioso tumoral (por ejemplo, un virus) vivo generado en la fase del tumor primario puede ser diferente del generado posteriormente, utilizando células tumorales de sitios metastásicos. El objetivo final, en algunas realizaciones, es adaptar la respuesta inmunoterapéutica en función de los tipos tumorales predominantes, una ventaja

que no se puede encontrar en el desarrollo reciente de la terapia dirigida a vías específicas o la terapia dirigida a anticuerpos monoclonales.

5 Las células tumorales inactivadas se inactivan antes de la administración. Normalmente, las células tumorales inactivadas son incompetentes para la proliferación. Las células tumorales se pueden inactivar con cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se inactivan mediante irradiación. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se irradian a una dosis de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 rads/min o de aproximadamente 120 a aproximadamente 140 rads/min antes de la administración al paciente. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se irradian con una dosis total de aproximadamente uno cualquiera de 2.500 rads, 5.000 rads, 10.000 rads, 15.000 rads o 20.000 rads. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se irradian con una dosis total de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 rads. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se irradian con una dosis total suficiente para inhibir sustancialmente el 100 % de las células, de una mayor proliferación. En algunas realizaciones, en donde las células tumorales inactivadas están modificadas genéticamente, la dosis total de irradiación es insuficiente para inhibir la expresión o secreción de la molécula relacionada con el sistema inmunológico, tales como GM-CSF. En algunas realizaciones, la dosis total de irradiación es insuficiente para inhibir la transducción o la modificación genética de las células tumorales inactivadas por el agente infeccioso tras su administración. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se crioconservan antes de la administración.

20 Las células tumorales inactivadas se administran por vía intratumoral, por ejemplo, por inyección intratumoral. La dosis adecuada de células tumorales inactivadas para administración depende del estado (por ejemplo, microambiente, tipo, estadio, etc.) del tumor sólido o linfático y otros factores diagnósticos y de riesgo del individuo. En algunas realizaciones, una dosis adecuada de células tumorales inactivadas es aproximadamente una cualquiera de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ , o  $1 \times 10^8$  células. En algunas realizaciones, una dosis adecuada de células tumorales inactivadas es una cualquiera de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^4$ , de aproximadamente  $1 \times 10^4$  a aproximadamente  $1 \times 10^5$ , de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $2 \times 10^5$ , de aproximadamente  $2 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^5$ , de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a aproximadamente  $10^6$ , de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $2 \times 10^6$ , de aproximadamente  $2 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^6$ , de aproximadamente  $5 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$ , de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$  o de aproximadamente  $5 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células tumorales. En algunas realizaciones, la dosis de células tumorales inactivadas se calcula en células/kg de peso corporal.

35 En algunas realizaciones, la relación relativa entre el agente infeccioso (tal como un virus) y las células tumorales inactivadas se basa en el índice de multiplicidad de infección (MOI) calculado utilizando el número de partículas de agente infeccioso respecto del número de células tumorales inactivadas solas o respecto del número total de células tumorales vivas, incluidas las células tumorales inactivadas, y el número estimado de células tumorales vivas en el sitio de administración. En algunas realizaciones, el MOI es al menos aproximadamente uno cualquiera de 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , o más. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se proporciona en una cantidad proporcional al volumen de los sitios tumorales estimados. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se proporcionan en una cantidad limitada por preparaciones de biopsia tumoral, resección tumoral, cultivo de células tumorales y otros métodos para aislar células tumorales conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se proporciona en la composición en aproximadamente  $1 \times 10^5$  partículas a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  partículas (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  partículas). En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se proporcionan en la composición a aproximadamente  $1 \times 10^3$  células a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células tumorales inactivadas).

50 En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran diariamente. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas son al menos aproximadamente una cualquiera de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x o 7x (es decir, diariamente) por semana. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran semanalmente. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran quincenalmente; semanalmente sin interrupción; semanalmente, dos de cada tres semanas; semanalmente tres de cada cuatro semanas; una vez cada dos semanas; una vez cada 3 semanas; una vez cada 4 semanas; una vez cada 6 semanas; una vez cada 8 semanas, mensualmente o cada dos a 12 meses. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son menores de aproximadamente uno cualquiera de 6 meses, 3 meses, 1 mes, 20 días, 15, días, 12 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son mayores de aproximadamente uno cualquiera de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, no hay interrupción en el programa de administración de dosis. En algunas realizaciones, el intervalo entre cada administración no es mayor de aproximadamente una semana. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran con la misma pauta posológica que el agente infeccioso. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran con una pauta posológica diferente a la del agente infeccioso.

65 La administración de las células tumorales inactivadas puede prolongarse durante un periodo de tiempo prolongado, tal como de aproximadamente un mes hasta aproximadamente siete años. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran durante un periodo de al menos aproximadamente uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 u 84 meses. En algunas realizaciones, las células tumorales

inactivadas se administran durante un período de al menos 3 o 6 semanas. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran semanalmente durante tres de cuatro semanas cada 3 meses. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran semanalmente durante 6 semanas cada 3 meses.

5 En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra semanalmente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador se administra semanalmente. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran semanalmente.

10 En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra diariamente. En algunas realizaciones, el inmunomodulador se administra diariamente. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran diariamente.

15 En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra primero diariamente o semanalmente durante un número de veces (tal como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o más) en un primer ciclo de tratamiento, seguido de un segundo ciclo de tratamiento de administración diaria o semanal durante un número de veces (tal como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o más), y luego seguido de ciclos de tratamiento de mantenimiento cada mes o cada pocos meses (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o más). En algunas realizaciones, el inmunomodulador se administra primero diariamente o semanalmente durante un cierto número de veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o más) en un primer ciclo de tratamiento, seguido de un segundo ciclo de tratamiento de administración diaria o semanal durante un número de veces (tal como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o más), y luego seguido de ciclos de tratamiento de mantenimiento cada mes o cada pocos meses (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o más). En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas se administran primero diariamente o semanalmente durante un número de veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o más) en un primer ciclo de tratamiento, seguido de un segundo ciclo de tratamiento de administración diaria o semanal durante un número de veces (tal como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 o más), y luego seguido de ciclos de tratamiento de mantenimiento cada mes o cada pocos meses (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o más).

20 En algunas realizaciones, el agente infeccioso, el inmunomodulador y las células inactivadas se administran con cualquier combinación de las pautas posológicas descritas anteriormente. Cada ciclo de tratamiento puede comprender la administración a lo largo de días, semanas o meses. El ciclo de tratamiento podrá repetirse durante el tiempo que sea necesario.

30 En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas tratadas anteriormente se administran secuencialmente, es decir, la administración del agente infeccioso se realiza antes o después de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra antes de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso no se administra más de aproximadamente cualquiera de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas o 24 horas antes de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra aproximadamente días o semanas (tal como aproximadamente cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más) antes de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra después de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso no se administra más de aproximadamente cualquiera de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, o 24 horas después de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra aproximadamente días o semanas (tal como aproximadamente cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más) después de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran uno inmediatamente después del otro (es decir, dentro de los 5 minutos o menos entre las dos administraciones). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra inmediatamente antes de la administración de las células tumorales inactivadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se administra inmediatamente después de la administración de las células tumorales inactivadas.

40 En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran de forma simultánea mediante composiciones separadas. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se administran como una única composición. En algunas realizaciones, el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se mezclan antes (tal como, inmediatamente antes de, por ejemplo, en un plazo de menos de aproximadamente 10, 5 o 1 minutos antes) de la administración de la composición. En algunas realizaciones, la composición que comprende el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas se prepara previamente y se almacena durante al menos cualquiera de aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas o más antes de la administración. En algunas realizaciones, las células tumorales inactivadas y el agente infeccioso están completamente separados hasta el momento de la administración al individuo. En algunas realizaciones, no es necesario incubar previamente el agente infeccioso y las células tumorales inactivadas antes de la administración.

65 **Agentes infecciosos**

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento están relacionados con agentes infecciosos que son virus oncolíticos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, adenovirus oncolíticos. El agente infeccioso puede ser un agente infeccioso de origen natural o un agente infeccioso modificado genéticamente, por ejemplo, un agente infeccioso atenuado y/o un agente infeccioso con características favorables adicionales (por ejemplo, replicación preferente en células cancerosas o que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico).

Los virus ilustrativos que son adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, adenovirus, por ejemplo, H101 (ONCOCRINE®), CG-TG-102 (Ad5/3-D24-GM- CSF) y CG0070; virus del herpes simple, por ejemplo, talimogene laherparapvec (T-VEC) y HSV-1716 (SEPREHVIR®); virus reo, por ejemplo, REOLYSINA®; virus variolovacunal, por ejemplo, JX-594; virus del valle de Séneca, por ejemplo, NTX-010 y SVV-001; virus de la enfermedad de Newcastle, por ejemplo, NDV-NS1 y GL-ONC1; virus de la polio, por ejemplo, PVS-RIPO; virus del sarampión, por ejemplo, MV-NIS; virus coxsackie, por ejemplo, Cavatak™; virus de la estomatitis vesicular; maraba y rabdovirus; parvovirus y virus de las paperas.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un agente infeccioso de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el agente infeccioso está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el agente infeccioso se atenúa (por ejemplo, mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el agente infeccioso es sólo una parte o partes del agente infeccioso de tipo salvaje que puede causar infección, inflamación o efectos similares a una infección.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus oncolítico, tal como un adenovirus oncolítico. En algunas realizaciones, el virus oncolítico es un virus oncolítico de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el virus oncolítico está modificado genéticamente. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se atenúa (por ejemplo mediante pases múltiples, inactivación o modificación genética). En algunas realizaciones, el virus oncolítico es competente para replicarse. En algunas realizaciones, el virus oncolítico se replica preferentemente en una célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1, como se muestra más adelante. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4.

SEQ ID NO: 1

```

      gggcccaaaa ttagcaagt accacgtggt tctgaagcca gtggcctaag gaccaccctt    60
gcagaaccgt ggtctccttg tcacagtcta ggcagcctct ggcttagcct ctgtttcttt    120
cataaccttt ctcagcgcct gctctgggcc agaccagtgt tgggaggagt cgctactgag    180
ctcctagatt ggcagggggag gcagatggag aaaaggagtg tgtgtggtca gcattggagc    240
agaggcagca gtgggcaata gaggaagtga gtaaatacctt gggagggctc cctagaagtg    300
atgtgttttc ttttttgtt tttagagacag gatctcgctc tgctgcccag gctggtgtgc    360
agtggcatga tcatagctca ctgcagcctc gacttctcgg gctcaagcaa tctctccacc    420
tcagcctccc aagtagctgg gactacgggc acacgccacc atgcctggct aatTTTTgta    480
TTTTTgtag agatgggtct tcaccatgtt gatcaggctg gtctcgaact cctgggctca    540
tgcgatccac cccgccagct gattacaggg attccgggtg tgagccaccg cgcccagacg    600
ccacttcacg gtattgtaaa cgtctgttac cttctgttc ccctgtctac tggactgtga    660
gctccttagg gccacgaatt gaggatgggg cacagagcaa gctctcaaa cgtttgttga    720
atgagtgagg gaatgaatga gttcaagcag atgctatacg ttggctgttg gagattttgg    780
ctaaaatggg acttgacagga aagcccagc tccccctgc catttcagg caccgctctt    840
cagcttgggc tctgggtgag cgggataggg ctgggtgcag gattaggata atgtcatggg    900
tgaggcaagt tgaggatgga agaggtggct gatggctggg ctgtggaact gatgatcctg    960
aaaagaagag gggacagtct ctggaaatct aagctgaggc tgttgggggc tacaggttga    1020
gggtcacgtg cagaagagag gctctgttct gaacctgcac tatagaaagg tcagtgggat    1080
gcgggagcgt cggggcgggg cggggcctat gttcccgtgt cccacgcct ccagcagggg    1140
acgccccggc tggggcgggg gagtcagacc ggccttgta ccatccggac aaagcctgcg    1200
cgccccgc cccgccattg gccgtaccgc cccgcgccgc cgcccatcc cgcccctgcg    1260
cgccgggtcc ggcgcgttaa agccaatagg aaccgccgc gttgttccg tcacggacgg    1320
ggcagccaat tgtggcggcg ctggcggct cgtggctctt tcgcggcaaa aaggatttgg    1380
cgcgtaaaag tggccgggac ttgcaggca gggcgggccg gggcgggagc gggatcgagc    1440
cctcgccgag gctgcccgc atgggcccgc gccgccgcg ccgcctgtca cccgggccgc    1500
gcgggccgtg agcgtcatg

```

1519

- En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un virus oncolítico (tal como un adenovirus oncolítico) que comprende un vector viral que comprende un promotor específico de células tumorales unido operativamente a un gen viral esencial para la replicación del virus y un ácido nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina) unida operativamente a un promotor viral. En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1, tal como un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el gen viral esencial para la replicación del virus se selecciona del grupo que consiste en E1A, E1B y E4. En algunas realizaciones, el promotor viral unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico es el promotor E3. En algunas realizaciones, la molécula relacionada con el sistema inmunológico es GM-CSF.

- En algunas realizaciones, el agente infeccioso es un adenovirus serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido

nucleico que codifica una molécula relacionada con el sistema inmunológico (tal como una citocina o una quimiocina, por ejemplo, GM-CSF). En algunas realizaciones, el promotor específico del tumor es un promotor E2F-1 humano o un promotor E2F-1 que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO:1.

- 5 En algunas realizaciones, el agente infeccioso es CG0070, un adenovirus de serotipo 5 que tiene un promotor E2F en el gen E1a y una expresión de GM-CSF en el gen E3.

CG0070 es un adenovirus oncolítico de replicación condicional (serotipo 5) diseñado para replicarse preferentemente y destruir células cancerosas defectuosas en la ruta Rb. Este vector está regulado transcripcionalmente por un  
10 promotor (por ejemplo, el promotor E2F-1) que se regula positivamente en las células tumorales que detectan la ruta Rb. En aproximadamente el 85 % de todos los cánceres, uno o más genes de la ruta Rb, tal como el gen Rb supresor de tumores, están mutados. Además de su propagación restringida, CG0070 también codifica la citocina humana GM-CSF, que se expresa selectivamente en las células tumorales infectadas para estimular respuestas inmunitarias contra focos tumorales locales y distantes no infectados (como metástasis).

La estructura genómica del vector adenoviral oncolítico CG0070 se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Los productos del gen adenoviral temprano E1A son esenciales para la expresión eficiente de otras regiones del genoma adenoviral. CG0070 ha sido diseñado para expresar el gen E1A bajo el control del promotor humano E2F-1, que proporciona especificidad tumoral al producto del gen E1A. Para protegerse de la expresión activadora de E1A  
20 mediante lectura transcripcional, se insertó una señal de poliadenilación (PA) en el extremo 5' del promotor E2F-1. CG0070 incluye toda la región E3 de tipo salvaje excepto la región codificante de 19 kD. Una comparación directa de vectores de adenovirus oncolíticos que contienen E3 y vectores con E3 eliminado mostró superioridad de los vectores que contienen E3 en la propagación y eficacia del tumor. En lugar del gen de 19 kD, CG0070 transporta el ADNc del GM-CSF humano bajo el control del promotor endógeno E3 (E3P). Dado que el promotor E3 es a su vez activado por E1A, tanto la replicación viral como la expresión de GM-CSF están en última instancia bajo el control del promotor E2F-1. El resto de la estructura del vector viral, incluyendo las regiones de proteínas tardías E2, E4 y repeticiones  
25 terminales invertidas (ITR), es idéntico al genoma Ad5 de tipo salvaje.

CG0070 se fabrica en células HeLa-S3 y se libera de las células HeLa-S3 infectadas mediante lisis con detergente.  
30 CG0070 se purifica del lisado mediante cromatografía y luego se formula en sacarosa al 5 %, Tris 10 mM, polisorbato-80 al 0,05 %, glicina al 1 %, cloruro de magnesio 1 mM, pH 7,8.

CG0070 se suministra como un líquido congelado, ligeramente opalescente estéril en viales de vidrio tapados. La concentración de partículas por ml (pv/ml) se indica en el Certificado de análisis de cada lote de CG0070.

CG0070 tiene una actividad antitumoral potencial adicional porque transporta el ADNc del GM-CSF humano, una citocina clave para generar inmunidad o resistencia anti-reacción de larga duración. Por lo tanto, CG0070 es un vector oncolítico de replicación selectiva con el potencial de atacar el tumor mediante dos mecanismos: citotoxicidad directa como vector de replicación e inducción de una respuesta inmunitaria del huésped. En las siguientes secciones se  
40 resumen estudios *in vitro* e *in vivo* realizados para caracterizar la selectividad tumoral y la actividad anti-tumoral y la seguridad de CG0070.

### Inmunomoduladores

45 Los métodos de la presente invención en algunas realizaciones comprenden la administración de agentes infecciosos con un inmunomodulador.

"Inmunomodulador" se refiere a un agente que cuando está presente, altera, suprime o estimula el sistema inmunológico del cuerpo. Los inmunomoduladores pueden dirigirse a moléculas específicas, tales como las moléculas de puntos de control o modulan de forma no específica la respuesta inmunitaria. Los inmunomoduladores pueden incluir composiciones o formulaciones que activan el sistema inmunológico (por ejemplo, adyuvantes o activadores) o regulan negativamente el sistema inmunológico. Los adyuvantes pueden incluir composiciones a base de aluminio, así como composiciones que incluyen componentes de la pared celular bacteriana o micobacteriana. Los activadores pueden incluir moléculas que activan las células presentadoras de antígenos para estimular la respuesta inmunitaria celular. Por ejemplo, los activadores pueden ser péptidos inmunoestimulantes. Los activadores pueden incluir, pero sin limitación, agonistas de los receptores tipo toll TLR-2, 3, 4, 6, 7, 8 o 9, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); TNF; CD40L; CD28; ligando de FLT 3; o citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15 o IL-21. Los activadores pueden incluir agonistas de los receptores activadores (incluidos los receptores coestimuladores) en los linfocitos T, tal como un agonista (por ejemplo, anticuerpo agonista) de CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, CD40 o HVEM. Los activadores también pueden incluir compuestos que inhiben la actividad de un inmunosupresor, tal como un inhibidor de los inmunosupresores IL-10, IL-35, TGF- $\beta$ , IDO o ciclofosfamida, o inhiben la actividad de un punto de control inmunitario tal como un antagonista (por ejemplo, anticuerpo antagonista) de CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, B7-1, B7-H3, B7-H4, BTLA, VISTA, KIR, A2aR o TIM3. Los activadores también pueden incluir moléculas coestimulantes tales como CD40, CD80 o CD86. Los inmunomoduladores también pueden incluir  
65 agentes que regulan negativamente el sistema inmunológico, tales como anticuerpos contra IL-12p70, antagonistas de los receptores de tipo Toll TLR-2, 3, 4, 5, 6, 8 o 9, o supresores generales de la función inmunológica, tales como

ciclofosfamida, ciclosporina A o FK506. Estos agentes (por ejemplo, adyuvantes, activadores o reguladores negativos) se pueden combinar para lograr una respuesta inmunitaria óptima.

Los inmunomoduladores de particular interés en la presente invención incluyen agentes inmunoestimulantes e inhibidores de puntos de control inmunitario. Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidores de puntos de control inmunitario", "inhibidores de puntos de control", y similares se refiere a compuestos que inhiben la actividad de los mecanismos de control del sistema inmunológico. Los puntos de control del sistema inmunológico o puntos de control inmunitario, son vías inhibitorias del sistema inmunológico que generalmente actúan para mantener la autotolerancia o modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas para minimizar el daño tisular colateral. Los inhibidores de puntos de control pueden inhibir un punto de control del sistema inmunológico estimulando la actividad de una molécula de puntos de control estimulante o inhibiendo la actividad de una molécula de puntos de control inhibitoria en la vía. Las moléculas de puntos de control estimulante son moléculas, tales como proteínas, que estimulan o regulan positivamente el sistema inmunológico. Las moléculas de puntos de control inhibitorias son moléculas, tales como proteínas, que inhiben o regulan negativamente el sistema inmunológico. Las moléculas de puntos de control del sistema inmunológico incluyen, pero sin limitación, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), ligando 1 de muerte celular programada 1 (PD-L1), ligando 2 de muerte celular programada 1 (PD-L2), gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), B7-1, B7-H3, B7-H4, proteína 3 de la membrana de linfocitos T (TIM3), atenuador de linfocitos B y T (BTLA), supresor de inmunoglobulina de dominio V de la activación de linfocitos T (VISTA), receptor similar a inmunoglobulina de células citotóxicas (KIR) y receptor de adenosina A2A (A2aR). Como tales, los inhibidores de puntos de control incluyen antagonistas de CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, B7-1, B7-H3, B7-H4, BTLA, VISTA, KIR, A2aR o TIM3. Por ejemplo, anticuerpos que se unen a CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, B7-1, B7-H3, B7-H4, BTLA, VISTA, KIR, A2aR o TIM3 y antagonizan su función y son inhibidores de puntos de control. Es más, cualquier molécula (por ejemplo, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, etc.) que inhibe la función inhibitoria de un punto de control del sistema inmunológico es un inhibidor de puntos de control.

El inmunomodulador puede ser una cualquiera de las modalidades moleculares conocidas en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, aptámero, ARNm, ARNip, microARN, ARNhc, péptido, anticuerpo, anticalina, ácido nucleico esférico, TALEN, nucleasas con dedos de cinc, CRISPR/Cas9 y moléculas pequeñas.

En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un ligando natural o diseñado de la molécula inhibitoria de puntos de control inmunitario PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control inmunitario es un anticuerpo que se dirige a una proteína inhibitoria de puntos de control inmunitario. En algunas realizaciones, el inmunomodulador es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anti-PD-L1 (por ejemplo, KY-1003 (documento EP20120194977)). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv y otras subsecuencias de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de dominio único, una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo, o cualquier otra variante funcional o derivado del mismo.

Estos inmunomoduladores se pueden usar individualmente o en combinación. Por ejemplo, cualquier número (tal como cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de inhibidores de puntos de control inmunitario se puede usar de forma simultánea o secuencial o cualquier número (tal como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) de agentes inmunoestimulantes se puede usar de forma simultánea o secuencial. Como alternativa, cualquier número (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de inhibidores de puntos de control inmunitario en combinación con cualquier número (tal como 2, 3, 4, 5, 6 o más) de agentes inmunoestimulantes se puede usar de forma simultánea o secuencial. La administración secuencial de inmunomoduladores puede estar separada por horas, días o semanas. La(s) vía(s) de administración de dos o más inmunomoduladores pueden ser las mismas o diferentes. Por ejemplo, un inmunomodulador puede administrarse por vía intratumoral y un segundo inmunomodulador puede administrarse por vía intravenosa; o se pueden administrar dos inmunomoduladores ambos por vía intratumoral.

A continuación se analizan moléculas de puntos de control inmunitario ilustrativos y sus inmunomoduladores. Se entiende que otras moléculas de puntos de control inmunitario y otros inmunomoduladores adecuados conocidos en la técnica también están dentro del alcance de la presente solicitud.

#### CTLA-4

CTLA-4 es una molécula de puntos de control inmunitario, que se regula positivamente en los linfocitos T activados. Un mAb anti-CTLA-4 puede bloquear la interacción de CTLA-4 con CD80/86 y desactivar el mecanismo de supresión inmunitaria y permitir la estimulación continua de los linfocitos T por parte de las CD. Ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 son Ipilimumab (véanse las Patentes de EE. UU. N.º 6,984,720, 7,452,535, 7,605,238, 8,017,114 y 8,142,778), tremilimumab (véanse las patentes de EE. UU. N.º 6,68,736, 7,109,003, 7,132,281, 7,411,057, 7,807,797, 7,824,679

y 8.143.379) y otros anticuerpos anti-CTLA-4, incluidos anticuerpos de cadena sencilla (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.811.097, 6051.227 y 7.229.628, y la publicación de patente de EE. UU. n.º US20110044953).

Dos mAb IgG dirigidos contra CTLA-4, ipilimumab y tremelimumab, se han probado en ensayos clínicos para diversas indicaciones. El ipilimumab está aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma, por ejemplo, para pacientes con melanoma en estadio avanzado. La información de prescripción completa se describe detalladamente en el prospecto de YERVOY® (Bristol Meyers). YERVOY® (Ipilimumab) viene en viales de un solo uso de 50 mg.

Las anticalinas son proteínas diseñadas que pueden reconocer y unirse a objetivos específicos con alta afinidad. Son miméticos de anticuerpos, pero no están relacionados estructuralmente con los anticuerpos. En su lugar, proceden de lipocalinas humanas, que son una familia de proteínas de unión de origen natural. Se utilizan anticalinas en lugar de anticuerpos monoclonales, pero son aproximadamente ocho veces más pequeñas que los anticuerpos monoclonales, con un tamaño de aproximadamente 180 aminoácidos y una masa de aproximadamente 20 kDa. Las anticalinas se han descrito en la patente de EE. UU. N.º 7.250.297. Se han desarrollado anticalinas que se unen a CTLA-4 con alta afinidad y especificidad, que se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º W02012072806. En la presente solicitud se puede utilizar cualquiera de las anticalinas que se unen a CTLA-4. En algunas realizaciones, la anticalina que se une a CTLA-4 es PRS-010 (Piers AG).

#### PD-1

PD-1 es parte de la familia B7/CD28 de moléculas coestimuladoras que regulan la activación y la tolerancia de los linfocitos T, por lo que los anticuerpos anti-PD-1 antagonistas pueden ser útiles para superar la tolerancia. PD-1 se ha definido como un receptor para B7-4. B7-4 puede inhibir la activación de las células inmunitarias al unirse a un receptor inhibidor en una célula inmunitaria. La activación de la vía de PD-1/PD-L1 da como resultado la inhibición de la función efectora de los linfocitos T, secreción y proliferación de citocinas. (Turnis *et al.*, *Onc Immunology* 1(7): 1172-1174, 2012). Los niveles altos de PD-1 se asocian con linfocitos T agotados o estimulados crónicamente. Es más, el aumento de la expresión de PD-1 se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer.

Agentes para modular negativamente PD-1, B7-4 y la interacción entre B7-4 y la señal inhibidora de PD-1 en una célula inmunitaria que resulta en una mejora de la respuesta inmunitaria. En la presente invención se puede utilizar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. N.º US7101550, US5698520, US6808710, US7029674, US7794710, US7892540, US8008449, US8088905, US8163503, US8168757, US8354509, US8460927, US8609089, US8747833, US8779105, US8900587, US8952136, US8981063, US8993731, US9062112, US9067999, US9073994, US9084776, US9102728 y US7488802; y las publicaciones de patentes de EE. UU. n.º US20020055139, US20140044738. Por ejemplo, nivolumab es un mAb humano contra PD-1 que está aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma irreseccable o metastásico, así como cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas.

#### PD-L1/PD-L2

PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada) también se conoce como grupo de diferenciación 274 (CD274) u homólogo B7 1 (B7-H1). PD-L1 actúa como ligando para PD-1 y desempeña un papel importante en la supresión del sistema inmunológico durante eventos particulares, tales como el embarazo, alogramas de tejidos, enfermedad autoinmunitaria y otras patologías, tales como hepatitis y cáncer. La formación del complejo receptor PD-1/ligando PD-L1 transmite una señal inhibidora que reduce la proliferación de linfocitos T CD8+ en los ganglios linfáticos.

En la presente invención se puede utilizar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 conocidos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º US7943743, US7722868, US8217149, US8383796, US8552154 y US9102725; y las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. números US20140341917 y US20150203580; y la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2001/020964. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 que se encuentran en desarrollo clínico incluyen BMS935559 (también conocido como MDX-1105), MPDL3280A, MEDI4736, avelumab (también conocido como MSB0010718C), KY-1003, MCLA-145, RG7446 (también conocido como atezolizumab) y STI-A1010.

El PD-L2 (ligando 2 de muerte celular programada 1) también se conoce como B7-DC. PD-L2 actúa como ligando para PD-1. En determinadas circunstancias, PD-L2 y su inhibidor se pueden utilizar como sustituto de PD-L1 y su inhibidor respectivamente.

#### **Ejemplos**

Los ejemplos que se analizan a continuación están destinados a ser puramente ilustrativos de la invención y, por tanto, no deben considerarse limitantes de la invención de ninguna manera. Los siguientes ejemplos y descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

**Ejemplo 1: Estudio clínico de fase I/II sobre la administración intravesical de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 en pacientes con cáncer de vejiga con invasión muscular**



Este ejemplo describe un estudio clínico de administración intravesical de CG0070 en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 en pacientes con cáncer de vejiga con invasión muscular (CVIM). En el presente documento se elige como ejemplo el cáncer de vejiga con invasión muscular porque se ha demostrado que CG0070 es activo en el cáncer de vejiga. Además, todos los pacientes con cáncer de vejiga con invasión muscular necesitan una cistectomía, proporcionando así una buena muestra de tumor para preparar las células tumorales necesarias para este sistema de vacuna. Además, el pronóstico de los pacientes con cáncer de vejiga con invasión muscular (T3-4) ha sido malo a pesar del uso de quimioterapia neoadyuvante. La mayoría de estos pacientes tienen más de 60 años y pocos pueden sufrir los graves efectos secundarios de la quimioterapia. Un agente eficaz que pueda minimizar el riesgo de recurrencia de la enfermedad en esta población de pacientes es una necesidad insatisfecha.

Este estudio clínico es de fase I/II es un estudio de seguridad y eficacia intervencionista de aumento de dosis, abierto y de un solo grupo de CG0070 intravesical en combinación con un inhibidor de CTLA-4 como terapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de vejiga con invasión muscular de células transicionales, que han sido seleccionados para cistectomía radical y linfadenectomía pélvica. El objetivo principal de seguridad del estudio es investigar si el bloqueo de CG0070 y CTLA 4 es seguro y tolerable para el tratamiento neoadyuvante de pacientes con CVIM antes de la cistectomía. El objetivo principal de eficacia del estudio es medir los cambios en el nivel de PD-L1 o PD-1 en el tumor después del tratamiento neoadyuvante con CG0070 e inhibidor de CTLA-4. Los objetivos secundarios del estudio incluyen la evaluación de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 2 años, supervivencia libre de progresión (SLP) a 2 años, la supervivencia general (SG), la proporción de respuesta patológica completa en la cistectomía (proporción pO), la proporción de estadificación patológica descendente en la cistectomía y proporción de enfermedad confinada en el órgano en la cistectomía.

En la parte de la Fase I del estudio, cohortes de (por ejemplo, tres a seis) pacientes reciben bloqueo intravesical de CG0070 y CTLA 4 en uno de cuatro niveles de dosis. El primer nivel de dosis consta únicamente en CG0070. Cada paciente recibe 4 instalaciones semanales de CG0070 intravesical (por ejemplo, el día 1 de cada semana) y 3 semanales del inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) en uno de los cuatro niveles de dosis a partir de la segunda semana (por ejemplo, los días 8, 15 y 22) con la administración del inhibidor de CTLA-4 después de CG0070.

La escalada de dosis sigue una secuencia de Fibonacci modificada en la que los incrementos de dosis se hacen más pequeños a medida que la dosis aumenta. Por ejemplo, si ninguno de los tres primeros pacientes de una cohorte experimenta una toxicidad limitante de la dosis, otros tres pacientes serán tratados con el siguiente nivel de dosis más alto. No obstante, si uno de los tres primeros pacientes experimenta una toxicidad limitante de la dosis, se tratará a tres pacientes más con el mismo nivel de dosis. La escalada de dosis continúa hasta que al menos dos pacientes entre una cohorte de tres a seis pacientes experimenten toxicidades limitantes de la dosis (es decir,  $\geq 33\%$  de pacientes con una toxicidad limitante de la dosis en ese nivel de dosis). La dosis recomendada para la siguiente etapa o fase del ensayo se define convencionalmente como el nivel de dosis justo por debajo de este nivel de dosis tóxico. La toxicidad limitante de la dosis (TLD) se define mediante el uso de los Criterios terminológicos comunes para acontecimientos adversos (CTCAE) versión 4. Una TLD se define como un acontecimiento adverso (AA) relacionado con el medicamento de grado  $\geq 3$  desde el día 1 de la semana 1 hasta el día 1 de la semana 4 del tratamiento, incluida cualquier toxicidad de grado 3 o superior que requiera la interrupción del tratamiento del estudio durante más de 3 semanas consecutivas y/o la interrupción permanente del medicamento o medicamentos debido a toxicidades inmunológicas, pero excluyendo los AA de grado 3 de exacerbación tumoral (definidos como dolor local, irritación o erupción localizada en sitios de tumor conocido o sospechado) y acontecimientos inmunomediados de Grado 3 de la piel (erupción, prurito) o sistemas endocrinos (hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipopituitarismo, insuficiencia suprarrenal, hipogonadismo y síndrome de Cushing) que se resuelven a Grado 1 o basal dentro de 3 semanas con o sin la administración de esteroides. La inmunotoxicidad hepática se define como una elevación de grado 3 o superior en la aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa o bilirrubina total. Un aumento significativo del dímero D (un aumento del 20 % con al menos 1  $\mu\text{g/ml}$  respecto al valor basal) en combinación con un cambio  $>$  grado 2 en el INR, PT, PTT, plaquetas o fibrinógeno que duran  $>$  7 días se consideran una TLD. Por añadidura, la trombosis o el sangrado clínicamente significativos relacionados con el tratamiento con CG0070 se consideran una TLD. Se considera que los pacientes con un retraso en el tratamiento que se extiende más allá de los 21 días debido a una toxicidad relacionada con el tratamiento del estudio tienen una TLD relacionada con el tratamiento. Por razones distintas a la toxicidad relacionada con el tratamiento, los pacientes con un retraso en el tratamiento que se extiende más allá de 7 días o que se retiran del estudio antes de que se reemplacen 3 administraciones dentro de la cohorte. La dosis máxima tolerada (DMT) es la dosis inmediatamente anterior a la que da lugar a 2 TLD. Si la DMT no está definida, la dosis más alta administrada sin 2 TLD será la Dosis Máxima Factible (DMF). No se permite la reducción de dosis para los pacientes en este estudio. No obstante, si al menos 2 de cada 6 pacientes en el nivel de dosis 1 experimentan una TLD, se inscribirán tres pacientes en el nivel de dosis 1. Además, si al menos 2 de cada 6 pacientes en el nivel de dosis 1 experimentan una TLD, se inscribirán tres pacientes en el nivel de dosis 2.

Por ejemplo, el nivel de dosis I incluye la administración intravesical de CG0070 solo en una dosis de  $1 \times 10^{12}$  partículas virales (pv) una vez a la semana durante cuatro semanas. El nivel de dosis II incluye: (1) administración intravesical de CG0070 solo en una dosis de  $1 \times 10^{12}$  partículas virales (pv) una vez a la semana durante cuatro semanas; y (2) inmediatamente después de la instalación y drenaje de CG0070, administración intravesical de un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) a una dosis de 0,1 mg/kg pero sin exceder los 20 mg en total por dosis, semanalmente

durante tres semanas, a partir de la semana 2 y finalizando la semana 4. El nivel de dosis III incluye: (1) administración intravesical de CG0070 solo en una dosis de  $1 \times 10^{12}$  partículas virales (pv) una vez a la semana durante cuatro semanas; y (2) inmediatamente después de la instalación y drenaje de CG0070, administración intravesical de un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) a una dosis de 0,2 mg/kg pero sin exceder los 20 mg en total por dosis, semanalmente durante tres semanas, a partir de la semana 2 y finalizando la semana 4. El nivel de dosis IV incluye: (1) administración intravesical de CG0070 solo en una dosis de  $1 \times 10^{12}$  partículas virales (pv) una vez a la semana durante cuatro semanas; y (2) inmediatamente después de la instalación y drenaje de CG0070, administración intravesical de un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) a una dosis de 0,3 mg/kg pero sin exceder los 20 mg en total por dosis, semanalmente durante tres semanas, a partir de la semana 2 y finalizando la semana 4.

En la parte de la Fase II del estudio, a cada paciente se le administra por vía intravesical CG0070 en combinación con el inhibidor de CTLA-4 a un nivel de dosis determinado en la parte de Fase I del estudio durante un ciclo de tratamiento de cuatro semanas. Durante las partes de la fase I y la fase II del estudio, antes de la administración de la terapia intravesical, se evalúa a cada paciente para detectar acontecimientos adversos y se recogen muestras (tal como muestras de sangre y orina) para evaluación de laboratorio. Por ejemplo, antes de la primera administración intravesical de CG0070, se recogen muestras de sangre y orina de cada paciente para evaluar el nivel de GM-CSF, así como los niveles de CG0070 y adenovirus de tipo salvaje. Antes de cada una de las administraciones de las semanas 2, 3 y 4, se recogen muestras de los pacientes para su evaluación en laboratorio en hematología (tal como hemograma completo con fórmula diferencial, bioquímica y coagulación), química sérica (tal como sodio, potasio, cloruro, BUN/creatinina, glucosa, proteína total, albúmina, calcio, bilirrubina total, bilirrubina directa, fosfato alcalino, LDH, AST, ALT y funciones tiroideas) y análisis de orina. Las constantes vitales, incluida la presión arterial, el pulso, las respiraciones y la temperatura se registran antes de cada tratamiento con CG0070 y cada hora durante un total de 2 horas durante el tratamiento para garantizar que el paciente esté clínicamente estable.

CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 se pueden administrar de la siguiente manera. Se aconseja a los pacientes no beber líquidos durante 4 horas antes del tratamiento y deben vaciar la vejiga antes de la administración del tratamiento. El día del estudio, cada paciente recibe un tratamiento previo con un agente potenciador de la transducción (DDM) administrado por vía intravesical a través de un catéter (catéter de Foley Rusch 173430 y catéter de Foley BARD LUBRI-SIL n.º 70516SI). El pretratamiento consiste en un lavado intravesical con 100 ml de solución salina normal, seguido de un lavado intravesical con 75 ml de DDM al 0,1 %. Luego, el paciente recibe instilación intravesical de 100 ml de DDM al 0,1 %, que se retiene en la vejiga durante 12-15 minutos y posteriormente se enjuaga con 100 ml de solución salina. Si un paciente no puede tolerar al menos 5 minutos de pretratamiento con DDM, se debe suspender el tratamiento posterior con CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 para ese tratamiento. Si la infusión intravesical de CG0070 se retrasa más de dos horas después del tratamiento previo con DDM, el paciente no recibirá CG0070 y deberá reprogramarse para el tratamiento con DDM y CG0070 no antes de 2 días después. Si el tratamiento se retrasa más de 2 semanas, los pacientes deben seguir cumpliendo los criterios de elegibilidad antes del nuevo tratamiento. Después del pretratamiento con DDM, cada paciente recibe una única instilación intravesical a través de un catéter (por ejemplo, catéter de Foley Rusch 173430 y catéter de Foley BARD LUBRI-SIL n.º 70516SI) de 100 ml de CG0070 a una concentración de  $1,0 \times 10^{10}$  pv/ml con un tiempo de permanencia de 45 a 50 minutos. El tratamiento debe realizarse al menos 14 días después de cualquier biopsia de vejiga previa. Los pacientes que experimenten sangrado durante la inserción del catéter (cateterismo traumático) no deben ser tratados con CG0070. Mientras CG0070 se mantiene en la vejiga, el paciente debe reposicionarse del lado izquierdo al lado derecho y también debe acostarse boca arriba y sobre el abdomen para maximizar la exposición de la superficie de la vejiga al CG0070. La posición del paciente se cambia cada 10-12 minutos durante un total de 45 a 50 minutos. Luego, el CG0070 se drena a través del catéter hacia una bolsa de eliminación. Una vez que la solución CG0070 se haya drenado de la vejiga, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab, tal como YERVOY®) en la dosis adecuada (por ejemplo, el nivel de dosis I del estudio de fase I no incluye CTLA-4) se diluye en 100 ml de solución salina normal y se instila en la vejiga. Después de la instilación, luego se retira el catéter uretral y se le pide al paciente que lo mantenga así durante otros 45 minutos a 1 hora (o el mayor tiempo posible) antes de vaciarlo mediante la micción.

Después del tratamiento de 6 semanas de la parte de la Fase II del estudio, cada paciente recibe una cistectomía. La cistectomía se realiza de 10 a 14 días (por ejemplo, aproximadamente el día 40) después del último tratamiento intravesical o tan pronto como haya desaparecido cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento y la afección médica sea adecuada para la cirugía. Después de la cistectomía, se obtiene una muestra de tumor del paciente y se evalúa en un laboratorio de anatomopatología y se realiza una evaluación de laboratorio para determinar si el paciente ha respondido al tratamiento. Esta evaluación incluye evaluaciones patológicas e inmunológicas del tumor resecado para: (1) estadio y grado del tumor, si está presente; (2) parámetros inmunológicos del tumor, tales como Treg, CD4, CD8 y otros subconjuntos de linfocitos T; (3) estado de expresión de PD-L1 en el tumor mediante métodos de inmunohistoquímica; (4) afectación de los ganglios linfáticos; (5) comparación de fotografías macroscópicas entre el pre y el postratamiento. Cada paciente se evalúa los meses 3, 6, 12, 18 y 24 (más o menos 2 semanas) a partir de la fecha de la cistectomía para monitorizar la respuesta a largo plazo y la toxicidad de CG0070, recurrencia o progresión de la enfermedad y terapias y respuestas posteriores. Después de 2 años, se contacta a los pacientes una vez al año para evaluar las toxicidades a largo plazo relacionadas con la terapia génica (como nuevas neoplasias malignas, enfermedades autoinmunitarias, trastornos neurológicos y hematológicos, etc.) y la supervivencia durante cinco años después de la primera terapia intravesical con CG0070. Se realiza un seguimiento de los pacientes durante un máximo de 5 años en total después del tratamiento con CG0070, o de acuerdo con las pautas actuales de la FDA y el estándar

de atención actual.

Las medidas de resultados primarios del estudio se determinan de la siguiente manera. Se realiza un seguimiento de los pacientes durante todo el estudio y al finalizarlo para evaluar los AA, AAG y SUSAR para determinar la seguridad y tolerabilidad del tratamiento. Aún más, en la cistectomía, la eficacia del tratamiento se evalúa determinando la tasa de cambio en el estado de PD-L1 y PD-1, que se define como la diferencia en las proporciones de pacientes que son PDL1 o PD1 positivos antes y después de la intervención durante al menos tres o más instilaciones intravesicales completadas.

Las medidas de los resultados secundarios del estudio se determinan de la siguiente manera. En la cistectomía, la proporción de respuesta patológica completa en la cistectomía para cada estadio T (proporción pO) se evalúa determinando la proporción de pacientes con una respuesta tumoral patológica completa en el sitio del tumor primario después de la intervención en la cistectomía, estratificada aún más por estadio T y para todo el grupo de pacientes. También se determinan en el momento de la cistectomía la proporción de estadificación patológica descendente en la cistectomía, definida como la proporción de pacientes con una degradación del estadio o grado del tumor en el sitio del tumor primario después de una intervención en cistectomía; y la proporción de enfermedad confinada en el órgano en la cistectomía, definida como la proporción de pacientes en los que no se encontraron ganglios linfáticos positivos durante la cistectomía. Hasta 2 años después de la cistectomía, se hace un seguimiento de los pacientes para determinar la supervivencia libre de enfermedad a los 2 años, definida como el número de meses desde la fecha de la cistectomía hasta la primera de las dos: la recurrencia de la enfermedad o la muerte (cualquiera que sea la causa); y supervivencia libre de progresión a 2 años para pacientes con enfermedad residual después de una cistectomía, definida como el número de meses desde la fecha de la cistectomía hasta el primero de los casos: progresión de la enfermedad o muerte (cualquiera sea la causa). Hasta cinco años después de la cistectomía, se hace un seguimiento de los pacientes para determinar la supervivencia general, definida como el número de meses desde la fecha de la cistectomía hasta la fecha de muerte (cualquiera que sea la causa).

Aún más, las medidas de resultados exploratorios que se evaluarán durante el curso del estudio incluyen, pero sin limitación, cambios en las funciones inmunitarias dentro del sitio del tumor primario, incluida la evaluación de cambios en Treg (CD4+CD25+Foxp3+), CD4, CD8, CD4RO45 y CD4ICOShigh etc. antes y después de la intervención; cambios macroscópicos en el sitio del tumor primario según fotografías tomadas antes y después de la intervención; recuentos absolutos de linfocitos sistémicos; y patrones de citocinas sistémicas en los pacientes.

Los pacientes deben cumplir todas las siguientes condiciones para ser elegibles para el estudio:

1. 18 años de edad o mayor;
2. Pacientes con cáncer de vejiga de células transicionales (uroteliales) diagnosticado anatomopatológicamente; donde la cistectomía radical con intención curativa está indicada para la enfermedad con invasión muscular (es decir, estadio T2-4a del American Joint Committee on Cancer (AJCC), Nx-1, M0). Los pacientes deben poder entrar en el estudio dentro de las cinco semanas posteriores a su procedimiento de diagnóstico más reciente, que suele ser una biopsia diagnóstica, un procedimiento de resección transuretral de un tumor de vejiga (RTUT) u otra exploración diagnóstica, tal como una procedimientos de TC, RMN y PET;
3. Carcinoma de células transicionales (uroteliales) confirmado histopatológicamente. Son elegibles los tumores uroteliales con histología mixta (pero con <50 % de variante);
4. No es elegible para recibir quimioterapia neoadyuvante debido a una afección médica que puede ser confirmada por el investigador. (Por ejemplo, la insuficiencia renal puede basarse en un aclaramiento de creatinina calculado de aproximadamente <60 ml/min O pérdida auditiva  $\geq 25$  dB por audiometría, promediado en 3 frecuencias de prueba contiguas en al menos 1 oído; u otra disfunción cardíaca significativa, enfermedad vascular o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, etc.), o se niega a recibir quimioterapia neoadyuvante después de un consentimiento informado específico que aborda los mayores riesgos de recurrencia y morbilidad sin quimioterapia neoadyuvante;
5. Tener un estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)  $\leq 2$ ;
6. No estar embarazada ni en período de lactancia;
7. Aceptar estudiar el consentimiento informado y la autorización de HIPAA para la divulgación de información médica personal;
8. Hemograma basal adecuado y función hepática, definida como:
  - a. WB03000 células/mm<sup>3</sup>, ANC>1.000 células/mm<sup>3</sup>, hemoglobina >9 g/dl y recuento de plaquetas >80.000/mm<sup>3</sup>;
  - b. Bilirrubina, AST y ALT menores de 2,5 veces el límite superior de lo normal;
  - c. Coagulación adecuada con PT/INR aceptable, PTT y fibrinógeno (menos de 1,5 del límite superior de lo normal o según especificaciones institucionales);
  - d. Recuento absoluto de linfocitos  $\geq 800/\mu\text{l}$ .

Los pacientes que cumplan alguno de los siguientes criterios quedan excluidos del estudio:

1. Antecedentes de reacción anafiláctica tras la exposición a anticuerpos monoclonales terapéuticos humanos o humanizados, hipersensibilidad al GM-CSF, reacciones alérgicas clínicamente significativas o cualquier

hipersensibilidad conocida o reacción previa a cualquiera de los excipientes de la formulación de los medicamentos del estudio;

2. Infección conocida por VIH, VHB o VHC;

3. Uso previsto de quimioterapia o radioterapia no especificada en el protocolo del estudio durante el estudio;

4. Cualquier afección médica subyacente que, en opinión del investigador, hará que la administración de los medicamentos del estudio sea peligrosa para el paciente, oscurecería la interpretación de los acontecimientos adversos o la resección quirúrgica;

5. Tratamiento sistémico en cualquier ensayo clínico en investigación dentro de los 28 días anteriores al registro;

6. Tratamiento concurrente con otros agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, incluyendo cualquier esteroide sistémico (excepción: se permiten esteroides inhalados o aplicados tópicamente y AINE en dosis estándar agudas y crónicas). El uso de un ciclo corto (es decir,  $\leq 1$  día) de un glucocorticoide es aceptable para prevenir una reacción al contraste intravenoso utilizado para las TC;

7. Terapia inmunosupresora, incluyendo: ciclosporina, globulina antitimocítica o tacrolimus dentro de los 3 meses posteriores a la entrada en el estudio;

8. Antecedentes de cáncer en estadio III o superior, excluyendo cáncer urotelial. Los cánceres de piel de células basales o escamosas deben haber sido tratados adecuadamente y el sujeto debe estar libre de enfermedad en el momento del registro. Los pacientes con antecedentes de cáncer en estadio I o II deben haber recibido un tratamiento adecuado y haber estado libres de enfermedad durante  $\geq 2$  años en el momento del registro

9. Enfermedad autoinmunitaria activa concomitante (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, uveítis);

10. Infección viral o bacteriana progresiva o actual. Todas las infecciones deben resolverse y el paciente debe permanecer afebril durante siete días sin antibióticos antes de ser incluido en el estudio.

#### **Ejemplo 2: Estudio clínico de fase I/II de la administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 para pacientes con tumores sólidos inyectables refractarios**

Este ejemplo describe un estudio clínico de fase I/II de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 o un bloqueador) para pacientes con tumores sólidos inyectables refractarios. Este estudio es un estudio intervencionista, multicéntrico, abierto y de un solo grupo destinado a evaluar la seguridad y eficacia de la terapia combinada que comprende la administración intratumoral de CG0070 y un inhibidor de CTLA-4 en pacientes con tumor sólido, incluyendo lesiones cutáneas o viscerales, tal como cáncer escamocelular de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer colorrectal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de próstata y melanoma. La administración de CG0070 puede incluir un pretratamiento con un transductor, tal como DDM.

El estudio clínico en Fase I se divide en tres etapas. En la etapa 1, a cada sujeto se le administra CG0070 mediante inyecciones intratumorales semanales (por ejemplo, el día 1 de cada semana) durante seis semanas. Cohortes de (por ejemplo, tres a seis) pacientes reciben CG0070 intratumoral (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) en uno de cuatro niveles de dosis. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF determinada en la Etapa 1 se utiliza para el comienzo de la Etapa 2.

En la Etapa 2 de la Fase I, a cada sujeto se le administra un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) mediante inyecciones intratumorales semanales (por ejemplo, el día 1 de cada semana) durante seis semanas. Las cohortes de (por ejemplo, tres a seis pacientes) reciben inhibidor de CTLA-4 intratumoral en uno de tres niveles de dosis. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF determinada en la Etapa 1 se utiliza para el comienzo de la Etapa 3.

En la Etapa 3 de la Fase I, a cada sujeto se le administra una combinación de CG0070 (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) en una dosis determinada en la Etapa 1 del estudio con el inhibidor de CTLA-4 en una dosis determinada en la Etapa 2 del estudio mediante inyecciones intratumorales semanales (por ejemplo, el día 1 de cada semana) durante 6 semanas. Las cohortes de (por ejemplo, tres a seis) pacientes reciben CG0070 intratumoral (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) seguido del inhibidor de CTLA-4 en uno de tres niveles de dosis durante 6 semanas. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1. Una vez alcanzada la DMT o DMF, los pacientes reciben un tratamiento repetido de 6 semanas (una vez a la semana durante seis semanas constituye un ciclo) a los 3 meses después de la primera inyección y tratamientos posteriores cada 3 meses hasta respuesta completa, desaparición de todos los tumores inyectables, progresión confirmada de la enfermedad o intolerancia al tratamiento del estudio, lo que se produzca primero. Los pacientes que se encuentran en la fase de aumento de dosis de la etapa 1 o etapa 2 del estudio pueden inscribirse en el estudio de ciclos repetidos de DMT o DMF después de un período de tres meses desde la última intervención con una evaluación de inscripción exitosa completa.

Hay dos medidas de resultados principales para este estudio: (1) seguridad y tolerabilidad; y (2) eficacia. La seguridad y la tolerabilidad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 3 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa. La etapa 1 determina la seguridad y tolerabilidad de CG0070 (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) según se evalúa mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos refractarios. La etapa 2 determina la seguridad y tolerabilidad del inhibidor de CTLA-4 (tal como el mAAb anti-CTLA-4 o el bloqueador) según se evalúa por la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes

con tumores sólidos refractarios. La etapa 3 determina la seguridad y tolerabilidad de CG0070 (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (tal como el mAb anti-CTLA-4 o el bloqueador) según se evalúa por la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos refractarios. La eficacia se evalúa desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa. La eficacia se evalúa mediante la tasa de respuesta objetiva (TRO) confirmada del tratamiento solo con CG0070 (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) en la Etapa 1, con solo un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador) en la Etapa 2, y con CG0070 (por ejemplo, con pretratamiento con DDM) en combinación con un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador) en la Etapa 3 en pacientes con tumores sólidos refractarios inyectables.

Las medidas de resultados secundarios de este estudio son las siguientes. Los resultados secundarios de seguridad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa. Para las tres etapas, las medidas de resultados secundarios de seguridad incluyen la incidencia de todos los acontecimientos adversos (AA), AA de grado 3 o mayor, acontecimientos que requieren la interrupción del fármaco(s) del estudio, efectos locales sobre el tumor, cambios de laboratorio clínicamente significativos y cambios clínicamente significativos en las constantes vitales. Los resultados secundarios de eficacia se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa. Para las tres etapas, las medidas de resultados secundarios de eficacia incluyen la Mejor tasa de Respuesta General (MRG), Tasa de Control de la Enfermedad (TCE), Tasa de Respuesta Duradera (TRD), Duración de la Respuesta (DdR), Tiempo de respuesta (TdR), Supervivencia libre de progresión (SLP), Tasa de Supervivencia global (SG), Tasa de Supervivencia a 1 año y 2 años.

La elegibilidad de los pacientes de ambos sexos para el estudio se determina según los siguientes criterios de inclusión:

1. Los pacientes deben tener tumores sólidos confirmados histológicamente que no hayan respondido a las terapias estándar (cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia endocrina) y para los que no existen opciones curativas, incluyendo, pero sin limitación: carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma escamocelular de la piel, carcinoma de mama, melanoma maligno, cáncer colorrectal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata;
2. Los pacientes pueden haber recibido cualquier tipo y cantidad de terapias previas contra el cáncer;
3. Los pacientes deben tener lesiones mensurables que sean evaluables mediante el método RECIST;
4. La masa tumoral a tratar debe ser adecuada para las inyecciones (es decir, a más de 2 cm de las principales estructuras vasculares) y la medición mediante RECIST;
5. Los pacientes deben tener  $\geq 18$  años de edad;
6. Los pacientes deben tener una esperanza de vida de  $\geq 12$  semanas;
7. Los pacientes deben tener un estado funcional de 0, 1 o 2 en el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG);
8. Los pacientes deben tener una función hepática adecuada, definida como:

- a. Niveles de bilirrubina total  $\leq 1,5 \times$  límite superior de lo normal (LSN); y
- b. Niveles de AST/ALT  $\leq 2,5 \times$  LSN, o  $\leq 5 \times$  LSN si hay metástasis hepáticas;

9. Los pacientes deben tener una función renal adecuada, definida como creatinina sérica  $\leq 1,5 \times$  LSN o aclaramiento de creatinina (calculado)  $\geq 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> para pacientes con creatinina  $> 1,5 \times$  LSN;

10. Los pacientes deben tener una función adecuada de la médula ósea, definida como:

- a. Recuento absoluto de neutrófilos  $\geq 1.200/\mu\text{l}$ ; y
- d. Recuento de plaquetas  $\geq 80.000/\mu\text{l}$ ;

11. Los pacientes no deben tener diátesis hemorrágica o coagulopatía conocida que puedan hacer que la inyección intratumoral o la biopsia no sean seguras;

12. Los varones y mujeres en edad fértil deben aceptar utilizar un método anticonceptivo adecuado antes de la entrada en el estudio y durante hasta seis meses;

13. Las mujeres en edad fértil deben tener una prueba de embarazo en orina o suero negativa realizada dentro de la semana anterior al inicio del tratamiento; y

14. Los pacientes deben poder comprender y estar dispuestos a firmar un documento de consentimiento informado por escrito.

Quedan excluidos del estudio los siguientes pacientes:

1. Pacientes que reciben quimioterapia, inmunoterapia o radioterapia dentro de las 4 semanas previas a la selección, o acontecimientos adversos  $>$  Grado 1, excepto alopecia, resultantes de agentes administrados más de 4 semanas antes de la selección;
2. Pacientes con antecedentes de sangrado tumoral significativo o trastornos de coagulación o sangrado;
3. Pacientes con tumores diana que podrían invadir potencialmente una o más estructura(s) vascular(es) importantes (por ejemplo, arteria innominada, arteria carótida), según los hallazgos de imagen inequívocos, según

lo determine un radiólogo;

4. Pacientes con anomalías neurológicas preexistentes de grado  $\geq 1$  (CTCAE versión 4.0);

5. Pacientes que han sido hospitalizados por afecciones de emergencia que requieren evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento durante los 30 días previos a la entrada en el estudio. Por añadidura, las afecciones emergentes que requieren evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento deben haberse resuelto o ser médicamente estables y no graves durante los 30 días anteriores a la entrada en el estudio;

6. Pacientes con infección clínicamente evidente con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) o el virus de Epstein-Barr (VEB). A los pacientes se les realiza una prueba de detección del VIH durante la selección previa al tratamiento

7. Pacientes que reciben esteroides o agentes inmunosupresores, por ejemplo, para la artritis reumatoide;

8. Pacientes que estén utilizando simultáneamente otros agentes en investigación;

9. Pacientes con presencia o antecedentes de metástasis del sistema nervioso central;

10. Mujeres embarazadas o en período de lactancia o que deseen quedar embarazadas dentro del período del estudio;

11. Pacientes con enfermedades intercurrentes no controladas, incluidas, aunque no de forma limitativa, infección en curso o activa, insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, angina de pecho inestable, arritmia cardíaca o enfermedad psiquiátrica/situaciones sociales que limitarían el cumplimiento de los requisitos del estudio.

### **Ejemplo 3: Estudio clínico de fase I/II de la administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de CD40 para pacientes con tumores sólidos en estadio avanzado (tal como melanoma)**

Este ejemplo describe un estudio clínico de fase I/II de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 (tal como un anticuerpo monoclonal o bloqueador anti-CTLA-4) y un agonista de CD40 (como un anticuerpo agonista anti-CD40) para pacientes con tumores sólidos o linfáticos. El estudio de fase I es un estudio de aumento de dosis para pacientes con tumores sólidos refractarios. El estudio de fase II es un estudio intervencionista, abierto de un solo grupo destinado a evaluar la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de inyecciones intratumorales repetidas de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista CD40 en pacientes con tumor sólido, tal como melanoma maligno en estadio III/IV, refractario, irreseccable o metastásico. La administración de CG0070 puede incluir un agente potenciador de la transducción, tal como DDM.

El estudio clínico en Fase I se divide en tres etapas. La etapa 1 es un estudio de aumento de dosis para la inyección intratumoral de CG0070 solo. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben una inyección intratumoral semanal de CG0070 (por ejemplo, con DDM) durante cuatro semanas en uno de los siguientes cuatro niveles de dosis:  $5 \times 10^{10}$  pv,  $1 \times 10^{11}$  pv,  $5 \times 10^{11}$  pv o  $1 \times 10^{12}$  pv. Por ejemplo, el virus CG0070 se reconstituye en 0,1 % de DDM en solución salina. El volumen total de cada dosis es de 2 ml. La concentración de la solución de CG0070 es de aproximadamente  $2,5 \times 10^{10}$  pv/ml para la dosis más baja y aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  pv/ml para la dosis más alta. Si el paciente tiene una sola lesión, que debe ser mayor a 2 cm, se inyecta el volumen total de la solución de CG0070 en la lesión. Si hay dos o más lesiones, se sigue el volumen máximo de inyección en función del tamaño de la lesión como se muestra en la Tabla 1. Cualquier volumen restante se inyecta en la lesión más grande, si la lesión más grande mide al menos 2 cm. Si la lesión más grande mide menos de 2 cm, luego el volumen restante se divide entre las dos lesiones más grandes. El número máximo de lesiones inyectadas es 3. La dosis total se administra independientemente del número total y del tamaño de las lesiones. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 1 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 2.

**Tabla 1. Volumen de inyección por lesión según el tamaño del tumor**

Tamaño del tumor (dimensión más larga)	Volumen máximo de inyección
$\geq 5,0$ cm	2,0 ml
$\geq 2,0$ cm a 5,0 cm	1,0 ml
$> 0,5$ cm a 2,0 cm	0,5 ml

La etapa 2 de la Fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación con CG0070 en el nivel de dosis de la etapa 1. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben una inyección intratumoral semanal de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) en uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 se inyecta primero por vía intratumoral según el volumen de inyección por lesión definido en la Etapa 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070, se administra el inhibidor de CTLA-4. El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2 a continuación. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del inhibidor de CTLA-4 se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante del inhibidor de CTLA-4 se administra por vía subcutánea alrededor de la(s) lesión(es) inyectada(s). En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado,

tanto el CG0070 como el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 2 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 3.

**Tabla 2. Volumen de inyección de inmunomodulador por lesión en función del tamaño del tumor**

Nivel de dosis	6,0 mg		12 mg		18 mg	
Tamaño tumoral (dimensión más larga)	Dosis máxima por lesión	Máx Volumen	Dosis máxima por lesión	Máx Volumen	Dosis máxima por lesión	Máx Volumen
≥ 5,0 cm	6,0 mg	1,2 ml	12 mg	2,4 ml	18 mg	3,6 ml
≥ 2,0 cm a 5,0 cm	3,0 mg	0,6 ml	6,0 mg	1,2 ml	9 mg	1,8 ml
> 0,5 cm a 2 cm	1,5 mg	0,3 ml	3,0 mg	0,6 ml	4,5 mg	0,9 ml

La etapa 3 de la fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un agonista de CD40 (tal como un anticuerpo agonista de CD40, por ejemplo, APX005M) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) y CG0070 en el nivel de dosis de la etapa 2. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben una inyección intratumoral semanal de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) en combinación con el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) en uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) al nivel de dosis de la etapa 2 se ajusta a 2 ml y se inyectó por vía intratumoral de acuerdo con el volumen de inyección por lesión, como se define en la Tabla 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070/inhibidor de CTLA-4, se administra el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M). El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante de agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se administra por vía subcutánea alrededor de la o las lesiones inyectadas. En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, CG0070, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como la dosis de estudio, que se utiliza en la Fase II.

Para la Fase II del estudio, la cohorte de pacientes recibe primero una inyección intratumoral una vez a la semana de la combinación de tres componentes de CG0070 (por ejemplo, con DDM), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD-40 (por ejemplo, APX005M) a la dosis de estudio determinada en la Etapa 3 de la Fase I durante cuatro semanas, seguido de inyecciones intratumorales de la combinación de tres componentes una vez cada 2 semanas durante cuatro veces. Posteriormente, se administra una inyección intratumoral mensual de la combinación de tres componentes como tratamiento de mantenimiento hasta obtener una respuesta completa, desaparición de todos los tumores inyectables, progresión confirmada de la enfermedad o intolerancia al tratamiento del estudio, lo que se produzca primero. Los pacientes que se encuentran en la fase de aumento de dosis de la Fase I (por ejemplo, etapa 1, 2 o 3) pueden inscribirse en el estudio de fase II siempre que haya un período de descanso de al menos cuatro semanas desde la última dosis. Para cada administración, primero se inyecta GC0070 en las lesiones, seguido por el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M). El tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP) es el primer tumor que se inyecta y el volumen y la dosis de la inyección se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Los volúmenes restantes de los fármacos se inyectan en el siguiente tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP), y el volumen de inyección y la dosis se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Este procedimiento se repite para los volúmenes restantes adicionales, hasta que se hayan inyectado todos los volúmenes y dosis totales determinados en la fase I. La inyección de CG0070 se omite en un sitio de inyección particular cuando la lesión en ese sitio ya no es viable. No obstante, las inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de CD40 se administran hasta el final del ciclo de tratamiento en los mismos sitios, incluso cuando una lesión desaparece. Cada paciente recibe un mínimo de 8 inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de CD40.

**Tabla 3. Volumen de inyección por lesión según el tamaño del tumor**

Tamaño del tumor (dimensión más larga)	Volumen máximo de inyección
≥ 5,0 cm	2,0 ml
≥ 2,0 cm a 5,0 cm	1,0 ml

(continuación)

Tamaño del tumor (dimensión más larga)	Volumen máximo de inyección
> 0,75 cm a 2,0 cm	0,5 ml
< 0,75 cm	0,1 ml

**Tabla 4. Dosis de agentes (inmunomodulador(es) y/o molécula(s) relacionada(s) con el sistema inmunológico) por lesión según el tamaño del tumor**

Tamaño del tumor (dimensión más larga)	Volumen máximo de inyección
≥ 5,0 cm	Dosis n.º 1 del agente DMT/DMF y dosis n.º 2 del agente DMT/DMF
≥ 2,0 cm a 5,0 cm	1/3 de la dosis del agente DMT/DMF n.º 1 y 1/3 de la dosis del agente DMT/DMF n.º 2
> 0,75 cm a 2,0 cm	1/6 de la dosis del agente DMT/DMF n.º 1 y 1/6 de la dosis del agente DMT/DMF n.º 2
< 0,75 cm	1/10 de la dosis del agente DMT/DMF n.º 1 y 1/10 de la dosis del agente DMT/DMF n.º 2

Hay dos medidas de resultados principales para este estudio: (1) seguridad y tolerabilidad; y (2) eficacia. La seguridad y la tolerabilidad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 3 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La etapa 1 determina la seguridad y tolerabilidad de CG0070 (por ejemplo, con DDM) según se evalúa mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumor sólido refractario. La etapa 2 determina la seguridad y tolerabilidad del inhibidor de CTLA-4 (tal como el mAb anti-CTLA-4 o el bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación con CG0070 según la evaluación de la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos refractarios. La etapa 3 y la fase II determinan la seguridad y tolerabilidad del agonista CD40 (anticuerpo agonista anti-CD40, por ejemplo, APX005M) en combinación con CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 según la evaluación de la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos refractarios. La eficacia se evalúa desde el inicio de cada etapa o la Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La eficacia se evalúa mediante la tasa de respuesta objetiva (TRO) confirmada del tratamiento con CG0070 (por ejemplo, con DDM) solo en la Etapa 1, con la combinación de CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (tal como mAb anti-CTLA-4 o bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en la etapa 2, con la combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de CD40 (tal como el anticuerpo anti-CD40 agonista, por ejemplo, APX005M) en la Etapa 3 y en la Fase II en pacientes con tumores sólidos refractarios inyectables.

Las medidas de resultados secundarios de este estudio son las siguientes. Los resultados secundarios de seguridad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de seguridad incluyen la incidencia de todos los acontecimientos adversos (AA), AA de grado 3 o mayor, acontecimientos que requieren la interrupción del fármaco(s) del estudio, efectos locales sobre el tumor, cambios de laboratorio clínicamente significativos y cambios clínicamente significativos en las constantes vitales. Los resultados secundarios de eficacia se evalúan desde el inicio de cada etapa o Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de eficacia incluyen la Mejor tasa de Respuesta General (MRG), Tasa de Control de la Enfermedad (TCE), Tasa de Respuesta Duradera (TRD), Duración de la Respuesta (DdR), Tiempo de respuesta (TdR), Supervivencia libre de progresión (SLP), Tasa de Supervivencia global (SG), Tasa de Supervivencia a 1 año y 2 años.

La elegibilidad de los pacientes de ambos sexos para el estudio se determina según los siguientes criterios de inclusión:

1. Los pacientes deben tener tumores sólidos confirmados histológicamente que no hayan respondido a las terapias estándar (cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia endocrina) y para los que no existen opciones curativas, incluyendo, pero sin limitación: carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma escamocelular de la piel, carcinoma de mama, melanoma maligno, cáncer colorrectal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata;
2. Los pacientes pueden haber recibido cualquier tipo y cantidad de terapias previas contra el cáncer;
3. Los pacientes deben tener lesiones mensurables que sean evaluables mediante el método RECIST;
4. La masa tumoral a tratar debe ser evaluable mediante una vía cutánea y adecuada para las inyecciones (es decir, a más de 2 cm de las principales estructuras vasculares) y la medición mediante RECIST;
5. Los pacientes deben tener ≥ 18 años de edad;
6. Los pacientes deben tener una esperanza de vida de ≥ 12 semanas;
7. Los pacientes deben tener un estado funcional de 0, 1 o 2 en el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG);
8. Los pacientes deben tener una función hepática adecuada, definida como:



- a. Niveles de bilirrubina total  $\leq 1,5 \times$  límite superior de lo normal (LSN); y
- b. Niveles de AST/ALT  $\leq 2,5 \times$  LSN, o  $\leq 5 \times$  LSN si hay metástasis hepáticas;

9. Los pacientes deben tener una función renal adecuada, definida como creatinina sérica  $\leq 1,5 \times$  LSN o aclaramiento de creatinina (calculado)  $\geq 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> para pacientes con creatinina  $> 1,5 \times$  LSN;

10. Los pacientes deben tener una función adecuada de la médula ósea, definida como:

- a. Recuento absoluto de neutrófilos  $\geq 1.200/\mu\text{l}$ ; y
- d. Recuento de plaquetas  $\geq 80.000/\mu\text{l}$ ;

11. Los pacientes no deben tener diátesis hemorrágica o coagulopatía conocida que puedan hacer que la inyección intratumoral o la biopsia no sean seguras;

12. Los varones y mujeres en edad fértil deben aceptar utilizar un método anticonceptivo adecuado antes de la entrada en el estudio y durante hasta seis meses;

13. Las mujeres en edad fértil deben tener una prueba de embarazo en orina o suero negativa realizada dentro de la semana anterior al inicio del tratamiento; y

14. Los pacientes deben poder comprender y estar dispuestos a firmar un documento de consentimiento informado por escrito.

Quedan excluidos del estudio los siguientes pacientes:

1. Pacientes que reciben quimioterapia, inmunoterapia o radioterapia dentro de las 4 semanas previas a la selección, o acontecimientos adversos  $>$  Grado 1, excepto alopecia, resultantes de agentes administrados más de 4 semanas antes de la selección;

2. Pacientes con antecedentes de sangrado tumoral significativo o trastornos de coagulación o sangrado;

3. Pacientes con tumores diana que podrían invadir potencialmente una o más estructura(s) vascular(es) importantes (por ejemplo, arteria innominada, arteria carótida), según los hallazgos de imagen inequívocos, según lo determine un radiólogo;

4. Pacientes con anomalías neurológicas preexistentes de grado  $\geq 1$  (CTCAE versión 4.0);

5. Pacientes que han sido hospitalizados por afecciones de emergencia que requieren evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento durante los 30 días previos a la entrada en el estudio. Por añadidura, las afecciones emergentes que requieren evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento deben haberse resuelto o ser médicamente estables y no graves durante los 30 días anteriores a la entrada en el estudio;

6. Pacientes con infección clínicamente evidente con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) o el virus de Epstein-Barr (VEB). A los pacientes se les realiza una prueba de detección del VIH durante la selección previa al tratamiento

7. Pacientes que reciben esteroides o agentes inmunosupresores, por ejemplo, para la artritis reumatoide;

8. Pacientes que estén utilizando simultáneamente otros agentes en investigación;

9. Pacientes con presencia o antecedentes de metástasis del sistema nervioso central;

10. Mujeres embarazadas o en período de lactancia o que deseen quedar embarazadas dentro del período del estudio;

11. Pacientes con enfermedades intercurrentes no controladas, incluidas, aunque no de forma limitativa, infección en curso o activa, insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, angina de pecho inestable, arritmia cardíaca o enfermedad psiquiátrica/situaciones sociales que limitarían el cumplimiento de los requisitos del estudio.

#### **Ejemplo 4: Preparación de células tumorales inactivadas.**

Este ejemplo describe un método ilustrativo para preparar células tumorales inactivadas que pueden usarse para administración local en el sitio del tumor (por ejemplo, mediante inyección intratumoral) en combinación con el agente infeccioso y el inmunomodulador.

Las células tumorales pueden provenir de una biopsia o resección tumoral de una fuente autóloga o alogénica. Como alternativa, pueden obtenerse a partir de líneas de células tumorales establecidas o de líneas de células tumorales desarrolladas individualmente, procedentes de una fuente autóloga o alogénica. Las células tumorales se aíslan típicamente mediante centrifugación de densidad en gradiente, adherencia en plástico y tripsinización. Las células tumorales aisladas se expanden a través de muchos pases para proporcionar suficientes células para el tratamiento. En el caso de células tumorales extraídas de líneas celulares, las células se lavan, filtran y analizan posteriormente para su caracterización (por ejemplo, expresión de antígenos tumorales), esterilidad y viabilidad. Las células tumorales se crioconservan en el banco de células o se almacenan como alícuotas listas para su administración.

#### Preparación de células tumorales a partir de una muestra quirúrgica

Para la muestra quirúrgica habitual, se extrae un trozo del tumor para su clasificación patológica y luego la masa principal de células tumorales se coloca en un tubo con HBSS que contiene gentamicina y se almacena a 8 °C. En aproximadamente 8-12 horas, las muestras frescas de tumores se llevan al laboratorio, donde se disocian aún más. Las muestras de tumores se cortan en trozos más pequeños, generalmente en cubos de 1 cm con un bisturí. Luego

se incuban en una solución enzimática a 37 °C. La solución enzimática habitual más eficaz es una mezcla de colagenasa, DNasa y hialuronidasa. Después de la incubación, la suspensión resultante se filtra a través de una malla de nailon con un poro de 40 µm. Estas etapas se repiten hasta que se haya disuelto toda la fracción principal de la muestra del tumor. Luego, la suspensión celular resultante se lava tres veces en HBSS y queda lista para la crioconservación.

#### Crioconservación y descongelación de células tumorales

Las células tumorales aisladas de esta manera se congelan luego en seroalbúmina humana al 10 % y DMSO al 10 % y se almacenan en alícuotas de  $10^7$  células en nitrógeno líquido. La congelación de células se puede realizar en un congelador Kryo 10 serie II (Messer-Griesheim). El día siguiente a la administración planificada, las células se descongelan cuidadosamente en un medio tibio con la adición de 10 % de seroalbúmina humana y luego se lavan tres veces en este medio.

#### Inactivación de células tumorales

La capacidad proliferativa de las células tumorales se inactiva con 200 Gy utilizando una fuente de telecobalto antes de la administración.

#### Preparación de células tumorales inactivadas para inyección en sitios tumorales

Alícuotas de  $10^7$  células tumorales inactivadas se ajustan a un volumen apropiado para inyecciones intratumorales. Por ejemplo, véase el ejemplo 5. Normalmente, las células inactivadas se pueden centrifugar y reconstituir en medio a 37 °C con 10 % de albúmina hasta un volumen de aproximadamente 2 ml.

#### **Ejemplo 5: Estudio clínico de fase I/II de administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4, un agonista de 4-1BB y células tumorales inactivadas en pacientes con carcinoma hepatocelular**

Este ejemplo describe un estudio clínico de Fase I/II, multicéntrico, abierto para evaluar la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de una terapia combinada que incluye CG0070, un inhibidor de CTLA-4, un agonista de 4-1BB y células tumorales inactivadas para el tratamiento de pacientes con tumores hepáticos inyectables refractarios. La combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4, el agonista de 4-1BB y las células tumorales inactivadas se administran por vía intrahepática en tumores hepáticos con progresión conocida en pacientes con carcinoma hepatocelular o pacientes con metástasis hepáticas de adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma colorrectal, cáncer gastroesofágico (adenocarcinoma o carcinoma escamocelular), melanoma, cáncer de pulmón no microcítico o carcinoma de células renales de células claras.

En este estudio, las células tumorales inactivadas proceden de una fuente alogénica. La combinación de CG0070 con las células tumorales inactivadas (en adelante denominada "VC" o "combinación VC") tiene una composición fija, en donde el número de células tumorales inactivadas es aproximadamente al menos 4 logaritmos menor que el número de partículas virales CG0070. Por ejemplo, en combinación con CG0070 a una dosis de  $1 \times 10^{12}$  pv, se inyecta aproximadamente  $1 \times 10^8$  o una cantidad menor de células tumorales inactivadas por paciente en cada administración. El inhibidor de CTLA-4 puede ser una anticlina que reconoce específicamente CTLA-4. La anticlina se puede formular en LPGA. Por ejemplo, se puede utilizar una anticlina específica de CTLA-4 en una formulación LPGA en una proporción en peso de 75:25 (en adelante denominada anticlina/LPGA 75:25). El agonista de 4-1BB puede ser un anticuerpo anti-4-1BB agonista, tal como PF-05082566.

La fase I del estudio clínico se divide en tres etapas. En la etapa 1, a cada paciente se le administra la combinación VC que incluye CG0070 y las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas) mediante inyecciones intratumorales semanales (por ejemplo, el día 1 de cada semana) durante seis semanas. Las cohortes de (por ejemplo, de tres a seis) pacientes reciben la VC intratumoral en uno de cuatro niveles de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben una inyección intratumoral semanal de CG0070 (por ejemplo, con DDM) durante cuatro semanas en uno de los siguientes cuatro niveles de dosis:  $5 \times 10^{10}$  pv de CG0070 y  $5 \times 10^6$  células tumorales inactivadas,  $1 \times 10^{11}$  pv de CG0070 y  $1 \times 10^7$  células tumorales inactivadas,  $5 \times 10^{11}$  pv de CG0070 y  $5 \times 10^7$  células tumorales inactivadas o  $1 \times 10^{12}$  pv de CG0070 y  $1 \times 10^8$  células tumorales inactivadas. Por ejemplo, CG0070 y las células tumorales inactivadas se mezclan inmediatamente antes de la administración en solución salina (por ejemplo, con 0,1 % de DDM) en un volumen total de 2 ml. Si el paciente tiene una sola lesión, que debe ser mayor a 2 cm, se inyecta el volumen total de la solución de VC en la lesión. Si hay dos o más lesiones, se sigue el volumen máximo de inyección en función del tamaño de la lesión como se muestra en la Tabla 1. Cualquier volumen restante se inyecta en la lesión más grande, si la lesión más grande mide al menos 2 cm. Si la lesión más grande mide menos de 2 cm, luego el volumen restante se divide entre las dos lesiones más grandes. El número máximo de lesiones inyectadas es 3. La dosis total se administra independientemente del número total y del tamaño de las lesiones. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 1 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 2.

La etapa 2 de la fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) en combinación con la combinación VC en el nivel de dosis de la etapa 1. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben una inyección intratumoral semanal de una dosis fija de CG0070 y células tumorales inactivadas en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) a uno de los siguientes tres niveles de dosis: 1,2 mg, 2,4 mg o 3,6 mg, durante seis semanas. Para cada administración, la combinación VC se inyecta primero por vía intratumoral según el volumen de inyección por lesión como se define en la Etapa 1. Inmediatamente después de cada inyección de VC, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) se administra en los mismos sitios de inyección con volúmenes de acuerdo con la Tabla 5. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del inhibidor de CTLA-4 se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante del inhibidor de CTLA-4 se administra por vía subcutánea alrededor de la(s) lesión(es) inyectada(s). En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, tanto la combinación de VC como el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 2 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 3.

**Tabla 5. Volumen de inyección de inmunomodulador por lesión en función del tamaño del tumor**

Nivel de dosis	1,2 mg		2,4 mg		3,6 mg	
Tamaño del tumor (dimensión más larga)	Dosis máxima por lesión	Volumen máximo	Dosis máxima por lesión	Volumen máximo	Dosis máxima por lesión	Volumen máximo
≥ 5,0 cm	1,2 mg	1,2 ml	2,4 mg	2,4 ml	3,6 mg	3,6 ml
≥ 2,0 cm a 5,0 cm	0,6 mg	0,6 ml	1,2 mg	1,2 ml	1,8 mg	1,8 ml
> 0,5 cm a 2 cm	0,3 mg	0,3 ml	0,6 mg	0,6 ml	0,9 mg	0,9 ml

La etapa 3 de la Fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un agonista de 4-1BB (tal como un anticuerpo agonista de 4-1BB, por ejemplo, PF-05082566) en combinación con la combinación VC y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) en la etapa 2 de nivel de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben una inyección intratumoral semanal de una dosis fija de la combinación VC y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) en combinación con el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) en uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, la combinación de VC y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) en la Etapa 2 de Nivel de Dosis se ajusta a 2 ml y se inyecta por vía intratumoral de acuerdo con el volumen de inyección por lesión, como se define en la Tabla 1. Inmediatamente después de cada inyección de VC/inhibidor de CTLA-4, se administra el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566). El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante del agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) se administra por vía subcutánea alrededor de la o las lesiones inyectadas. En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, la combinación VC, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) y el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) se pueden administrar en una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como la dosis de estudio, que se utiliza en la Fase II.

Para la Fase II del estudio, la cohorte de pacientes recibe primero una inyección intratumoral una vez a la semana de la combinación de cuatro componentes de CG0070 (por ejemplo, con DDM), las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) y el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) a la dosis de estudio determinada en la Etapa 3 de la Fase I durante cuatro semanas, seguido de inyecciones intratumorales de la combinación de cuatro componentes una vez cada 2 semanas durante cuatro veces. Posteriormente, se administra una inyección intratumoral mensual de la combinación de cuatro componentes como tratamiento de mantenimiento hasta obtener una respuesta completa, desaparición de todos los tumores inyectables, progresión confirmada de la enfermedad o intolerancia al tratamiento del estudio, lo que se produzca primero. Los pacientes que se encuentran en la fase de aumento de dosis de la Fase I (por ejemplo, etapa 1, 2 o 3) pueden inscribirse en el estudio de fase II siempre que haya un período de descanso de al menos cuatro semanas desde la última dosis. Para cada administración, GC0070 y las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales inactivadas alogénicas) se mezclan primero inmediatamente antes de la administración, se inyectan en los sitios de las lesiones, seguido del inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) y el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566). El tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP) es el primer tumor que se inyecta y el volumen y la dosis de la inyección se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Los volúmenes restantes de los fármacos se inyectan en el siguiente tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP), y el volumen de inyección y la dosis se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Este procedimiento se repite para

los volúmenes restantes adicionales, hasta que se hayan inyectado todos los volúmenes y dosis totales determinados en la fase I. La inyección de la combinación VC se omite en un sitio de inyección particular cuando la lesión en ese sitio ya no es viable. No obstante, las inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de 4-1BB se administran hasta el final del ciclo de tratamiento en los mismos sitios, incluso cuando una lesión desaparece. Cada paciente recibe un mínimo de 8 inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de 4-1BB.

Hay dos medidas de resultados principales para este estudio: (1) seguridad y tolerabilidad; y (2) eficacia. La seguridad y la tolerabilidad se evalúan desde el inicio de cada etapa o Fase II hasta 3 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La etapa 1 determina la seguridad y tolerabilidad de la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM) y las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas) según se evalúa mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores hepáticos refractarios. La etapa 2 determina la seguridad y la tolerabilidad de la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM), las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas) y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) según se evaluó mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores hepáticos refractarios. La etapa 3 determina la seguridad y la tolerabilidad de la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM), las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) y el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566), según se evaluó mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores hepáticos refractarios. La fase II determina la seguridad y tolerabilidad de la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM), las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) y el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores hepáticos refractarios. La eficacia se evalúa desde el inicio de cada etapa de la Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa. La eficacia se evalúa mediante la tasa de respuesta objetiva (TRO) confirmada del tratamiento con la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM) y las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas) en la Etapa 1, con la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM), las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas) y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) en la Etapa 2, y con la combinación de CG0070 (por ejemplo, con DDM), las células tumorales inactivadas (por ejemplo, células tumorales alogénicas inactivadas), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, anticalina/LPGA 75:25) y el agonista de 4-1BB (por ejemplo, PF-05082566) en la Etapa 3 y en la Fase II en pacientes con tumores hepáticos refractarios inyectables.

Las medidas de resultados secundarios de este estudio son las siguientes. Los resultados secundarios de seguridad se evalúan desde el inicio de cada etapa o Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la fase II, las medidas de resultados secundarios de seguridad incluyen la incidencia de todos los acontecimientos adversos (AA), AA de grado 3 o mayor, acontecimientos que requieren la interrupción del fármaco(s) del estudio, efectos locales sobre el tumor, cambios de laboratorio clínicamente significativos y cambios clínicamente significativos en las constantes vitales. Los resultados secundarios de eficacia se evalúan desde el inicio de cada etapa o hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de eficacia incluyen la Mejor tasa de Respuesta General (MRG), Tasa de Control de la Enfermedad (TCE), Tasa de Respuesta Duradera (TRD), Duración de la Respuesta (DdR), Tiempo de respuesta (TdR), Supervivencia libre de progresión (SLP), Tasa de Supervivencia global (SG), Tasa de Supervivencia a 1 año y 2 años.

La elegibilidad de los pacientes de ambos sexos para el estudio se determina según los siguientes criterios de inclusión: (1) Los sujetos deben tener adenocarcinoma de mama confirmado histológicamente, adenocarcinoma colorrectal, cáncer gastroesofágico (adenocarcinoma o carcinoma escamocelular), melanoma, cáncer de pulmón no microcítico o carcinoma de células renales de células claras con metástasis hepáticas o carcinoma hepatocelular con progresión conocida de la enfermedad; (2) Los sujetos con carcinoma no hepatocelular deben haber recibido al menos 1 terapia anticancerosa sistémica estándar previa para su enfermedad metastásica; (3) Los sujetos deben tener tumores hepáticos mensurables que sean adecuados para la inyección; (4) El estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group debe ser 0 o 1 y la expectativa de vida debe ser de aproximadamente 5 meses o más. Se requiere funciones hematológica, renal, hepática y de coagulación adecuadas; (5) La puntuación de Child-Pugh debe ser de A a B7.

Quedan excluidos del estudio los siguientes pacientes: (1) Los sujetos no deben ser candidatos para cirugía hepática o terapia locorregional de tumores hepáticos con intención curativa o terapia sistémica anticancerosa planificada; (2) No se debe estimar que los tumores hepáticos invadan aproximadamente más de un tercio del hígado; (7) No deben haberse realizado terapia dirigida al tumor hepático, cirugía hepática, terapia basada en anticuerpos o inmunoterapia < 28 días, quimioterapia < 21 días y terapia de moléculas pequeñas dirigida o terapia hormonal < 14 días antes de la inscripción; (8) Los sujetos no deben tener metástasis en el sistema nervioso central o estar irradiados, metástasis cerebrales estables de adenocarcinoma de mama, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales de células claras o melanoma; (9) Los sujetos no deben tener antecedentes o evidencia de neumonitis autoinmune sintomática, glomerulonefritis, vasculitis u otra enfermedad autoinmune sintomática; (10) Los sujetos no deben tener una enfermedad autoinmune sintomática ni estar inmunodeprimidos; (11) Los sujetos no deben tener antecedentes de trasplante de órganos sólidos; (12) Para el carcinoma no hepatocelular, no debe haber infección aguda o crónica

por el virus de la hepatitis B o por el virus de la hepatitis C; (13) Para el carcinoma hepatocelular, la carga viral del virus de la hepatitis B y del virus de la hepatitis C debe ser indetectable y no deben haber recibido tratamiento reciente con ciertos medicamentos antivirales; (14) No debe haber invasión intravascular macroscópica de tumores en la vena porta principal, vena hepática o vena cava; (15) Los sujetos no deben tener lesiones cutáneas herpéticas activas ni complicaciones previas de infección herpética (por ejemplo, queratitis herpética o encefalitis) y no deben requerir tratamiento con un fármaco antiherpético; (16) Los sujetos no deben requerir tratamiento concomitante con warfarina; (17) Mujeres en edad fértil que no estén dispuestas a utilizar métodos aceptables de anticoncepción efectiva durante el tratamiento del protocolo y hasta 3 meses después de la última dosis de la intervención.

**Ejemplo 6: Estudio clínico de fase I/II de pretratamiento con radiación seguido de administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de CD40 para pacientes con linfoma no Hodgkin refractario, carcinoma nasofaríngeo y melanoma**

Este estudio es un estudio intervencionista, multicéntrico, con un solo grupo y abierto destinado a evaluar la seguridad y la eficacia de la terapia combinada que comprende pretratamiento con radiación seguido de administración intratumoral de CG0070, un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de CD40 en pacientes con tumor sólido o linfático, tal como el linfoma no de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo o melanoma.

El pretratamiento de radiación se realiza de la siguiente manera. Dos días antes de cada administración de la terapia (por ejemplo, CG0070, combinación de CG0070 con el inhibidor de CTLA-4, o combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de CD40), se administra radiación externa de una dosis única de 2 Gy a cada sitio tumoral tratado del paciente diariamente durante 2 días. La dosis máxima de radiación está limitada a un ciclo de radiación (2 Gy durante 2 días) al mes durante un máximo de 4 meses. Después de esta dosis máxima, se detendrá toda radiación. La radiación total recibida no debe exceder los 16 Gy durante el ciclo de tratamiento de 4 meses.

El estudio clínico en Fase I se divide en tres etapas. La etapa 1 es un estudio de aumento de dosis para la inyección intratumoral de CG0070 en combinación con el tratamiento previo con radiación. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben un pretratamiento de radiación semanal seguido de inyección intratumoral de CG0070 (por ejemplo, con DDM) durante cuatro semanas en uno de los siguientes cuatro niveles de dosis:  $5 \times 10^{10}$  pv,  $1 \times 10^{11}$  pv,  $5 \times 10^{11}$  pv o  $1 \times 10^{12}$  pv. Por ejemplo, el virus CG0070 se reconstituye en 0,1 % de DDM en solución salina. El volumen total de cada dosis es de 2 ml. La concentración de la solución de CG0070 es de aproximadamente  $2,5 \times 10^{10}$  pv/ml para la dosis más baja y aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  pv/ml para la dosis más alta. Si el paciente tiene una sola lesión, que debe ser mayor a 2 cm, se inyecta el volumen total de la solución de CG0070 en la lesión. Si hay dos o más lesiones, se sigue el volumen máximo de inyección en función del tamaño de la lesión como se muestra en la Tabla 1. Cualquier volumen restante se inyecta en la lesión más grande, si la lesión más grande mide al menos 2 cm. Si la lesión más grande mide menos de 2 cm, luego el volumen restante se divide entre las dos lesiones más grandes. El número máximo de lesiones inyectadas es 3. La dosis total se administra independientemente del número total y del tamaño de las lesiones. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 1 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 2.

La etapa 2 de la Fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación con CG0070 y el pretratamiento de radiación en la etapa 1 de nivel de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben pretratamiento con radiación semanal seguido de inyección intratumoral de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) a uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 se inyecta primero por vía intratumoral según el volumen de inyección por lesión definido en la Etapa 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070, se administra el inhibidor de CTLA-4. El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del inhibidor de CTLA-4 se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante del inhibidor de CTLA-4 se administra por vía subcutánea alrededor de la(s) lesión(es) inyectada(s). En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, tanto el CG0070 como el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 2 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 3.

La etapa 3 de la fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un agonista de CD40 (tal como un anticuerpo agonista de CD40, por ejemplo, APX005M) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) CG0070 y el pretratamiento con radiación en la etapa 2 de nivel de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben pretratamiento con radiación semanal seguido de inyección intratumoral de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) en combinación con un agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) en uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) al nivel de dosis de la etapa 2 se ajusta a 2 ml y se inyectó por vía intratumoral de

acuerdo con volúmenes de inyección por lesión, como se define en la Tabla 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070/inhibidor de CTLA-4, se administra el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M). El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante de agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se administra por vía subcutánea alrededor de la o las lesiones inyectadas. En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, CG0070, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como la dosis de estudio, que se utiliza en la Fase II.

Para la Fase II del estudio, la cohorte de pacientes recibe primero un pretratamiento con radiación semanal una vez, seguido de inyección intratumoral de la combinación de tres componentes de CG0070 (por ejemplo, con DDM), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD-40 (por ejemplo, APX005M) a la dosis de estudio determinada en la Etapa 3 de la Fase I durante cuatro semanas, seguido de inyecciones intratumorales de la combinación de tres componentes una vez cada 2 semanas durante cuatro veces. Posteriormente, se administra una inyección intratumoral mensual de la combinación de tres componentes como tratamiento de mantenimiento hasta obtener una respuesta completa, desaparición de todos los tumores inyectables, progresión confirmada de la enfermedad o intolerancia al tratamiento del estudio, lo que se produzca primero. Los pacientes que se encuentran en la fase de aumento de dosis de la Fase I (por ejemplo, etapa 1, 2 o 3) pueden inscribirse en el estudio de fase II siempre que haya un período de descanso de al menos cuatro semanas desde la última dosis. Para cada administración, primero se inyecta GC0070 en las lesiones, seguido por el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M). El tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP) es el primer tumor que se inyecta y el volumen y la dosis de la inyección se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Los volúmenes restantes de los fármacos se inyectan en el siguiente tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP), y el volumen de inyección y la dosis se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Este procedimiento se repite para los volúmenes restantes adicionales, hasta que se hayan inyectado todos los volúmenes y dosis totales determinados en la fase I. La inyección de CG0070 se omite en un sitio de inyección particular cuando la lesión en ese sitio ya no es viable. No obstante, las inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de CD40 se administran hasta el final del ciclo de tratamiento en los mismos sitios, incluso cuando una lesión desaparece. Cada paciente recibe un mínimo de 8 inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de CD40.

Hay dos medidas de resultados principales para este estudio: (1) seguridad y tolerabilidad; y (2) eficacia. La seguridad y la tolerabilidad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 3 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La etapa 1 determina la seguridad y tolerabilidad de CG0070 (por ejemplo, con DDM) con pretratamiento con radiación según se evalúa mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. La etapa 2 determina la seguridad y tolerabilidad del inhibidor de CTLA-4 (tal como el mAb anti-CTLA-4 o el bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación con CG0070 con pretratamiento de radiación según lo evaluado por la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. Los estudios de etapa 3 y fase II determinan la seguridad y tolerabilidad del agonista de CD40 (anticuerpo agonista anti-CD40, por ejemplo, APX005M) en combinación con CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 con pretratamiento de radiación según lo evaluado por la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. La eficacia se evalúa desde el inicio de cada etapa o la Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La eficacia se evalúa mediante la tasa de respuesta objetiva (TRO) confirmada del tratamiento con CG0070 (por ejemplo, con DDM) con pretratamiento con radiación en la Etapa 1, con la combinación de CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (tal como mAb anti-CTLA-4 o bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) con pretratamiento con radiación en la etapa 2, con la combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de CD40 (tal como el anticuerpo anti-CD40 agonista, por ejemplo, APX005M) con pretratamiento con radiación en la Etapa 3 y en la Fase II en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios inyectables.

Las medidas de resultados secundarios de este estudio son las siguientes. Los resultados secundarios de seguridad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de seguridad incluyen la incidencia de todos los acontecimientos adversos (AA), AA de grado 3 o mayor, acontecimientos que requieren la interrupción del fármaco(s) del estudio, efectos locales sobre el tumor, cambios de laboratorio clínicamente significativos y cambios clínicamente significativos en las constantes vitales. Los resultados secundarios de eficacia se evalúan desde el inicio de cada etapa o Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de eficacia incluyen la Mejor tasa de Respuesta General (MRG), Tasa de Control de la Enfermedad (TCE), Tasa de Respuesta Duradera (TRD), Duración de la Respuesta (DdR), Tiempo de respuesta (TdR), Supervivencia libre de progresión (SLP), Tasa de Supervivencia global (SG), Tasa de Supervivencia a 1 año y 2 años.

La elegibilidad de los pacientes de ambos sexos para el estudio se determina según los siguientes criterios de

inclusión: (1) Los pacientes deben tener  $\geq 18$  años de edad; (2) Los pacientes deben poder comprender y estar dispuestos a firmar un documento de consentimiento informado por escrito; (3) Los pacientes deben tener neoplasia maligna confirmada histológicamente (es decir, Fase I: melanoma confirmado histológicamente o carcinoma nasofaríngeo metastásico; Fase II: melanoma confirmado histológicamente, linfoma no Hodgkin o carcinoma nasofaríngeo metastásico); (4) Los pacientes deben haber fracasado al menos en una terapia sistémica o ser intolerantes a al menos un tratamiento sistémico previo; (5) Los pacientes deben tener al menos dos lesiones de tamaño evaluable según los criterios modificados de la Organización Mundial de la Salud (mWHO)/Cheson; una de las dos lesiones debe ser susceptible de biopsia (aspiración con aguja gruesa o fina) e inyección intratumoral de hasta 5 ml (diámetro  $\geq 10$  mm); (6) Los pacientes con metástasis cerebrales asintomáticas son elegibles; (los esteroides sistémicos deben evitarse si es posible, o el sujeto debe permanecer estable con la dosis clínicamente efectiva más baja); (7) Los pacientes deben tener un estado funcional de 0, 1 o 2 en el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG); (8) Los pacientes deben tener una expectativa de vida no menor a 16 semanas; (9) Los pacientes deben tener imágenes radiográficas de referencia (de selección/de referencia), (por ejemplo, radiografías de cerebro, pecho, abdomen, pelvis y huesos con pruebas de imagen específicas que determinará el médico encargado del tratamiento) dentro de las 6 semanas posteriores al inicio del estudio; (10) Los pacientes deben tener los siguientes resultados de laboratorio: Glóbulos blancos (WBC)  $\geq 2000/\mu\text{l}$  ( $\sim 2 \times 10^9/\text{l}$ ); Recuento absoluto de neutrófilos  $\geq 1000/\mu\text{l}$  ( $\sim 0,5 \times 10^9/\text{l}$ ); Recuento de plaquetas  $\geq 75 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $\sim 75 \times 10^9/\text{l}$ ); Hemoglobina  $\geq 9$  g/dl (pueden transfundirse); Creatinina  $< 2,0 \times$  el límite superior de la normalidad (LSN); Aspartato aminotransferasa (AST)/alanina aminotransferasa (ALT)  $\leq 2,5 \times$  LSN para sujetos sin metástasis hepática  $\leq 5$  veces para metástasis hepáticas; y Bilirrubina  $\leq 2,0 \times$  LSN (excepto sujetos con síndrome de Gilbert, que deben tener una bilirrubina total inferior a 3,0 mg/dl); (11) Los pacientes no deben tener infección activa o crónica por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B o hepatitis C; (12) Las mujeres en edad fértil (WOCBP) deben utilizar un método anticonceptivo adecuado para evitar el embarazo durante todo el estudio y hasta 26 semanas después de la última dosis del producto en investigación, de tal manera que se minimice el riesgo de embarazo; y (13) Los varones con potencial para tener hijos deben utilizar un método anticonceptivo adecuado para evitar la concepción durante todo el estudio (y hasta 26 semanas después de la última dosis del producto en investigación) de tal manera que se minimice el riesgo de embarazo.

Quedan excluidos del estudio los siguientes pacientes: (1) Pacientes con cualquier otra neoplasia maligna de la cual el paciente haya estado libre de enfermedad durante menos de 5 años, con excepción del cáncer de piel de células basales o escamosas adecuadamente tratado y curado, cáncer de vejiga superficial o carcinoma in situ del cuello uterino; (2) Pacientes con antecedentes de sangrado tumoral significativo o trastornos de coagulación o sangrado; (3) Pacientes con antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, quedan excluidos de este estudio, como lo están los pacientes con antecedentes de enfermedad sintomática (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis sistémica progresiva [esclerodermia], lupus eritematoso sistémico, vasculitis autoinmune [por ejemplo, granulomatosis de Wegener]); neuropatía motora considerada de origen autoinmune (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré y miastenia grave); (4) Pacientes con cualquier afección médica o psiquiátrica subyacente, que en opinión del investigador hará que la administración de los fármacos intervencionistas sea peligrosa u oscurecerá la interpretación de los acontecimientos adversos (AA), tal como una afección asociada con diarrea frecuente; (5) Pacientes con afecciones cardíacas subyacentes que se consideren no elegibles para cirugía según la consulta de cardiología; (6) Pacientes con terapia concomitante con cualquiera de los siguientes: interleucina-2 (IL 2), interferón u otros regímenes de inmunoterapia no incluidos en el estudio; quimioterapia citotóxica; agentes inmunosupresores; otras terapias de investigación; o uso crónico de corticosteroides sistémicos (un historial de AA con IL-2 o interferón previo no impedirá que los sujetos entren en el estudio actual); (7) Pacientes que reciben cualquier agente en investigación; (8) Pacientes que reciben agentes inmunosupresores (a menos que sean necesarios para tratar posibles AA); y (9) Mujeres en edad fértil (WOCBP) que no están dispuestas o no pueden utilizar un método anticonceptivo aceptable para evitar el embarazo durante todo el período del estudio y durante al menos 8 semanas después de suspender el fármaco del estudio; tienen una prueba de embarazo positiva al inicio del estudio o están embarazadas o amamantando.

**Ejemplo 7: Estudio clínico de fase I/II de pretratamiento con CCL21 intratumoral seguido de la administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de CD40 para pacientes con tumores sólidos refractarios**

Este estudio es un estudio intervencionista, multicéntrico, con un solo grupo y abierto destinado a evaluar la seguridad y la eficacia de la terapia combinada que comprende un pretratamiento con CCL21 intratumoral seguido de administración intratumoral de CG0070, un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de CD40 en pacientes con tumores sólidos refractarios.

El pretratamiento intratumoral con CCL21 se realiza de la siguiente manera. Dos días antes de cada administración de la terapia (por ejemplo, CG0070, combinación de CG0070 con el inhibidor de CTLA-4, o combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de CD40) se administra una nanocápsula de CCL21 intratumoral a una dosis de aproximadamente 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en cada sitio tumoral objetivo. La dosis de la nanocápsula intratumoral de CCL21 es de aproximadamente 2 ml para tumores cuya dimensión más larga supere los 5 cm; aproximadamente 1 ml para tumores con una dimensión más larga de 2 cm a 5 cm; y aproximadamente 0,5 ml para tumores con la dimensión más larga de 0,5 cm a 2 cm. La nanocápsula de CCL21 intratumoral se administra semanalmente durante seis semanas en la

Fase I del estudio, o semanalmente durante cuatro semanas en la Fase II del estudio, seguido de una vez cada 2 semanas durante 4 ciclos más. Posteriormente, la nanocápsula de CCL21 se administra por vía intratumoral una vez al mes hasta la progresión de la enfermedad o la aparición de acontecimientos de toxicidad.

5 El estudio clínico en Fase I se divide en tres etapas. La etapa 1 es un estudio de aumento de dosis para la inyección intratumoral de CG0070 en combinación con el pretratamiento con nanocápsulas de CCL21 intratumoral. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben un pretratamiento con nanocápsula de CCL21 intratumoral semanal seguido de inyección intratumoral de CG0070 (por ejemplo, con DDM) durante cuatro semanas en uno de los siguientes cuatro niveles de dosis:  $5 \times 10^{10}$  pv,  $1 \times 10^{11}$  pv,  $5 \times 10^{11}$  pv o  $1 \times 10^{12}$  pv. Por ejemplo, el virus CG0070 se reconstituye en 0,1 % de DDM en solución salina. El volumen total de cada dosis es de 2 ml. La concentración de la solución de CG0070 es de aproximadamente  $2,5 \times 10^{10}$  pv/ml para la dosis más baja y aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  pv/ml para la dosis más alta. Si el paciente tiene una sola lesión, que debe ser mayor a 2 cm, se inyecta el volumen total de la solución de CG0070 en la lesión. Si hay dos o más lesiones, se sigue el volumen máximo de inyección en función del tamaño de la lesión como se muestra en la Tabla 1. Cualquier volumen restante se inyecta en la lesión más grande, si la lesión más grande mide al menos 2 cm. Si la lesión más grande mide menos de 2 cm, luego el volumen restante se divide entre las dos lesiones más grandes. El número máximo de lesiones inyectadas es 3. La dosis total se administra independientemente del número total y del tamaño de las lesiones. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 1 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 2.

La etapa 2 de la Fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación de CG0070 y el pretratamiento con nanocápsulas intratumorales de CCL21 en la etapa 1 de nivel de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben pretratamiento con nanocápsulas de CCL21 intratumoral semanal seguido de inyección intratumoral de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) a uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 se inyecta primero por vía intratumoral según el volumen de inyección por lesión definido en la Etapa 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070, se administra el inhibidor de CTLA-4. El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del inhibidor de CTLA-4 se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante del inhibidor de CTLA-4 se administra por vía subcutánea alrededor de la(s) lesión(es) inyectada(s). En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, tanto el CG0070 como el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 2 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 3.

La etapa 3 de la fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un agonista de CD40 (tal como un anticuerpo agonista de CD40, por ejemplo, APX005M) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) CG0070 y el pretratamiento con nanocápsulas de CCL21 intratumoral en la etapa 2 de nivel de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben pretratamiento con nanocápsulas de CCL21 intratumoral semanal seguido de inyección intratumoral de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) en combinación con el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) en uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) al nivel de dosis de la etapa 2 se ajusta a 2 ml y se inyectó por vía intratumoral de acuerdo con volúmenes de inyección por lesión, como se define en la Tabla 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070/inhibidor de CTLA-4, se administra el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M). El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante de agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se administra por vía subcutánea alrededor de la o las lesiones inyectadas. En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, CG0070, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como la dosis de estudio, que se utiliza en la Fase II.

Para la Fase II del estudio, la cohorte de pacientes recibe primero un pretratamiento con nanocápsulas de CCL21 intratumoral una vez a la semana, seguido de una inyección intratumoral de la combinación de tres componentes de CG0070 (por ejemplo, con DDM), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD-40 (por ejemplo, APX005M) a la dosis de estudio determinada en la Etapa 3 de la Fase I durante cuatro semanas, seguido de inyecciones intratumorales de la combinación de tres componentes una vez cada 2 semanas durante cuatro veces.



Posteriormente, se administra una inyección intratumoral mensual de la combinación de tres componentes como tratamiento de mantenimiento hasta obtener una respuesta completa, desaparición de todos los tumores inyectables, progresión confirmada de la enfermedad o intolerancia al tratamiento del estudio, lo que se produzca primero. Los pacientes que se encuentran en la fase de aumento de dosis de la Fase I (por ejemplo, etapa 1, 2 o 3) pueden inscribirse en el estudio de fase II siempre que haya un período de descanso de al menos cuatro semanas desde la última dosis. Para cada administración, primero se inyecta GC0070 en las lesiones, seguido por el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de CD40 (por ejemplo, APX005M). El tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP) es el primer tumor que se inyecta y el volumen y la dosis de la inyección se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Los volúmenes restantes de los fármacos se inyectan en el siguiente tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP), y el volumen de inyección y la dosis se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Este procedimiento se repite para los volúmenes restantes adicionales, hasta que se hayan inyectado todos los volúmenes y dosis totales determinados en la fase I. La inyección de CG0070 se omite en un sitio de inyección particular cuando la lesión en ese sitio ya no es viable. No obstante, las inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de CD40 se administran hasta el final del ciclo de tratamiento en los mismos sitios, incluso cuando una lesión desaparece. Cada paciente recibe un mínimo de 8 inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de CD40.

Hay dos medidas de resultados principales para este estudio: (1) seguridad y tolerabilidad; y (2) eficacia. La seguridad y la tolerabilidad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 3 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La etapa 1 determina la seguridad y tolerabilidad de CG0070 (por ejemplo, con DDM) con el pretratamiento con CCL21 intratumoral según se evalúa mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. La etapa 2 determina la seguridad y tolerabilidad del inhibidor de CTLA-4 (tal como el mAb anti-CTLA-4 o el bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación con CG0070 con el pretratamiento intratumoral con CCL21 según se evaluó mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. Los estudios de etapa 3 y fase II determinan la seguridad y tolerabilidad del agonista de CD40 (anticuerpo agonista anti-CD40, por ejemplo, APX005M) en combinación con CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 con el pretratamiento intratumoral con CCL21 según se evaluó mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. La eficacia se evalúa desde el inicio de cada etapa o la Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La eficacia se evalúa mediante la tasa de respuesta objetiva (TRO) confirmada del tratamiento con CG0070 (por ejemplo, con DDM) con el pretratamiento intratumoral con CCL21 en la Etapa 1, con la combinación de CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (tal como mAb anti-CTLA-4 o bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) con el pretratamiento intratumoral con CCL21 en la etapa 2, con la combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de CD40 (tal como el anticuerpo anti-CD40 agonista, por ejemplo, APX005M) con el pretratamiento intratumoral con CCL21 en la Etapa 3 y en la Fase II en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios inyectables.

Las medidas de resultados secundarios de este estudio son las siguientes. Los resultados secundarios de seguridad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de seguridad incluyen la incidencia de todos los acontecimientos adversos (AA), AA de grado 3 o mayor, acontecimientos que requieren la interrupción del fármaco(s) del estudio, efectos locales sobre el tumor, cambios de laboratorio clínicamente significativos y cambios clínicamente significativos en las constantes vitales. Los resultados secundarios de eficacia se evalúan desde el inicio de cada etapa o Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de eficacia incluyen la Mejor tasa de Respuesta General (MRG), Tasa de Control de la Enfermedad (TCE), Tasa de Respuesta Duradera (TRD), Duración de la Respuesta (DdR), Tiempo de respuesta (TdR), Supervivencia libre de progresión (SLP), Tasa de Supervivencia global (SG), Tasa de Supervivencia a 1 año y 2 años.

La elegibilidad de los pacientes de ambos sexos para el estudio se determina según los siguientes criterios de inclusión: (1) Los pacientes deben tener tumores sólidos confirmados histológicamente que no hayan respondido a las terapias estándar (cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia endocrina) y para los que no existen opciones curativas, incluyendo, pero sin limitación: carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma escamocelular de la piel, carcinoma de mama, melanoma maligno, cáncer colorrectal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata; (2) Los pacientes pueden haber recibido cualquier tipo y cantidad de terapias previas contra el cáncer; (3) Los pacientes deben tener lesiones mensurables que sean evaluables mediante el método RECIST; (4) La masa tumoral a tratar debe ser adecuada para las inyecciones (es decir, a más de 2 cm de las principales estructuras vasculares) y la medición mediante RECIST; (5) Los pacientes deben tener  $\geq 18$  años de edad; (6) Los pacientes deben tener una expectativa de vida de  $\geq 12$  semanas; (7) Los pacientes deben tener un estado funcional de 0, 1 o 2 en el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG); (8) Los pacientes deben tener una función hepática adecuada, definida como: Niveles de bilirrubina total  $\leq 1,5 \times$  límite superior de lo normal (LSN); y niveles de AST/ALT  $\leq 2,5 \times$  LSN, o  $\leq 5 \times$  LSN si hay metástasis hepáticas; (9) Los pacientes deben tener una función renal adecuada, definida como creatinina sérica  $\leq 1,5 \times$  LSN o aclaramiento de creatinina (calculado)  $\geq 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> para pacientes con creatinina  $> 1,5 \times$  LSN; (10) Los pacientes deben tener una función adecuada de la médula ósea, definida como: Recuento absoluto de neutrófilos  $\geq 1.200/\mu\text{l}$ ; y recuento de plaquetas  $\geq 80.000/\mu\text{l}$ ; (11) Los pacientes no deben tener diátesis hemorrágica o coagulopatía conocida que puedan hacer que la inyección intratumoral o la biopsia no sean seguras; (12) Los varones y mujeres en edad fértil deben aceptar utilizar

un método anticonceptivo adecuado antes de entrar en el estudio y durante hasta seis meses; (13) Las mujeres en edad fértil deben tener una prueba de embarazo en orina o suero negativa realizada dentro de la semana anterior al inicio del tratamiento; y (14) Los pacientes deben poder comprender y estar dispuestos a firmar un documento de consentimiento informado por escrito.

Quedan excluidos del estudio los siguientes pacientes: (1) Pacientes que reciben quimioterapia, inmunoterapia o radioterapia dentro de las 4 semanas previas a la selección, o acontecimientos adversos > Grado 1, excepto alopecia, resultantes de agentes administrados más de 4 semanas antes de la selección; (2) Pacientes con antecedentes de sangrado tumoral significativo o trastornos de coagulación o sangrado; Pacientes con tumores diana que podrían invadir potencialmente una o más estructura(s) vascular(es) importantes (por ejemplo, arteria innominada, arteria carótida), según los hallazgos de imagen inequívocos, según lo determine un radiólogo; (3) Pacientes con anomalías neurológicas preexistentes de grado  $\geq 1$  (CTCAE versión 4.0); (4) Pacientes que hayan sido hospitalizados por afecciones emergentes que requieran evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento durante los 30 días previos a la entrada en el estudio. Por añadidura, las afecciones emergentes que requieren evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento deben haberse resuelto o ser médicamente estables y no graves durante los 30 días anteriores a la entrada en el estudio; (5) Pacientes con infección clínicamente evidente con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) o el virus de Epstein-Barr (VEB). A los pacientes se les realiza una prueba de detección del VIH durante la selección previa al tratamiento; (6) Pacientes que reciben esteroides o agentes inmunosupresores, por ejemplo, para la artritis reumatoide; (7) Pacientes que estén utilizando simultáneamente otros agentes en investigación; (8) Pacientes con presencia o antecedentes de metástasis del sistema nervioso central; (9) Mujeres embarazadas o en período de lactancia o que deseen quedar embarazadas dentro del período del estudio; (10) Pacientes con enfermedades intercurrentes no controladas, incluidas, aunque no de forma limitativa, infección en curso o activa, insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, angina de pecho inestable, arritmia cardíaca o enfermedad psiquiátrica/situaciones sociales que limitarían el cumplimiento de los requisitos del estudio.

#### **Ejemplo 8: Estudio clínico de fase I/II de pretratamiento con CpG intratumoral seguido de la administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de OX40 para pacientes con tumores sólidos refractarios**

Este estudio es un estudio intervencionista, multicéntrico, de un solo grupo y abierto destinado a evaluar la seguridad y eficacia de la terapia combinada que comprende un pretratamiento intratumoral con CpG seguido de la administración intratumoral de CG0070 en combinación con un inhibidor de CTLA-4 y un agonista de OX40 en pacientes con tumores sólidos refractarios.

El pretratamiento con CpG intratumoral se realiza de la siguiente manera. Dos días antes de cada administración de la terapia (por ejemplo, CG0070, combinación de CG0070 con el inhibidor de CTLA-4, o combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de OX40) se administra CpG intratumoral (tal como CpG 7909) a una dosis de aproximadamente 1 mg/ml en cada sitio tumoral objetivo. El volumen de inyección de CpG intratumoral es de aproximadamente 2 ml para tumores cuya dimensión más larga supere los 5 cm; aproximadamente 1 ml para tumores con una dimensión más larga de 2 cm a 5 cm; y aproximadamente 0,5 ml para tumores con la dimensión más larga de 0,5 cm a 2 cm. El CpG intratumoral se administra semanalmente durante seis semanas en la Fase I del estudio, o semanalmente durante cuatro semanas en la Fase II del estudio, seguido de una vez cada 2 semanas durante 4 ciclos más. Posteriormente, el CpG se administra por vía intratumoral una vez al mes hasta la progresión de la enfermedad o la aparición de acontecimientos de toxicidad.

El estudio clínico en Fase I se divide en tres etapas. La etapa 1 es un estudio de aumento de dosis para la inyección intratumoral de CG0070 en combinación con el pretratamiento con CpG intratumoral (por ejemplo CpG 7909). Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben un pretratamiento con CpG intratumoral semanal (por ejemplo, CpG 7909) seguido de inyección intratumoral de CG0070 (por ejemplo, con DDM) durante cuatro semanas en uno de los siguientes cuatro niveles de dosis:  $5 \times 10^{10}$  pv,  $1 \times 10^{11}$  pv,  $5 \times 10^{11}$  pv o  $1 \times 10^{12}$  pv. Por ejemplo, el virus CG0070 se reconstituye en 0,1 % de DDM en solución salina. El volumen total de cada dosis es de 2 ml. La concentración de la solución de CG0070 es de aproximadamente  $2,5 \times 10^{10}$  pv/ml para la dosis más baja y aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  pv/ml para la dosis más alta. Si el paciente tiene una sola lesión, que debe ser mayor a 2 cm, se inyecta el volumen total de la solución de CG0070 en la lesión. Si hay dos o más lesiones, se sigue el volumen máximo de inyección en función del tamaño de la lesión como se muestra en la Tabla 1. Cualquier volumen restante se inyecta en la lesión más grande, si la lesión más grande mide al menos 2 cm. Si la lesión más grande mide menos de 2 cm, luego el volumen restante se divide entre las dos lesiones más grandes. El número máximo de lesiones inyectadas es 3. La dosis total se administra independientemente del número total y del tamaño de las lesiones. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 1 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 2.

La etapa 2 de la Fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o un bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación de CG0070 y el pretratamiento con CpG intratumoral en el nivel de dosis de la etapa 1. Las cohortes (por ejemplo, de tres a seis) de pacientes reciben pretratamiento con CpG (por ejemplo, CpG 7909) intratumoral semanal seguido de inyección intratumoral de una dosis

fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) a uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 se inyecta primero por vía intratumoral según el volumen de inyección por lesión definido en la Etapa 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070, se administra el inhibidor de CTLA-4. El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del inhibidor de CTLA-4 se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante del inhibidor de CTLA-4 se administra por vía subcutánea alrededor de la(s) lesión(es) inyectada(s). En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, tanto el CG0070 como el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como Etapa 2 de nivel de dosis, que se utiliza al comienzo de la Etapa 3.

La etapa 3 de la fase I es una escalada de dosis de inyección intratumoral de un agonista de OX40 (tal como un anticuerpo agonista de OX40, por ejemplo, MEDI-6469) en combinación con el inhibidor de CTLA-4 (tal como un mAb anti-CTLA-4 o bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) CG0070 y el pretratamiento con CpG intratumoral (por ejemplo, CpG 7909) en la etapa 2 de nivel de dosis. Las cohortes (por ejemplo, de tres seis) de pacientes reciben pretratamiento con CpG intratumoral semanal seguido de inyección intratumoral de una dosis fija de CG0070 (por ejemplo, con DDM) y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) en combinación con el agonista de OX40 (por ejemplo, MEDI-6469) en uno de los siguientes tres niveles de dosis: 6 mg, 12 mg o 18 mg, durante seis semanas. Para cada administración, CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) al nivel de dosis de la etapa 2 se ajusta a 2 ml y se inyectó por vía intratumoral de acuerdo con volúmenes de inyección por lesión, como se define en la Tabla 1. Inmediatamente después de cada inyección de CG0070/inhibidor de CTLA-4, se administra el agonista de OX40 (por ejemplo, MEDI-6469). El volumen total en cada nivel de dosis y los volúmenes máximos de inyección basados en el tamaño de las lesiones para más de dos lesiones inyectadas se enumeran en la Tabla 2. El número máximo de lesiones inyectadas es 3 y la dosis total del agonista de OX40 (por ejemplo, MEDI-6469) se administra independientemente del número total y el tamaño de las lesiones. Cualquier volumen restante de agonista de OX40 (por ejemplo, MEDI-6469) se administra por vía subcutánea alrededor de la o las lesiones inyectadas. En caso de que las lesiones se hayan resuelto completamente antes del último tratamiento planificado, CG0070, el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de OX40 (por ejemplo, MEDI-6469) se pueden administrar a una lesión no inyectada previamente. Si todas las lesiones se resuelven antes de finalizar el tratamiento, el agonista de OX40 (por ejemplo, MEDI-6469) solo se puede inyectar en el área subcutánea en la lesión anterior o alrededor de ella. El procedimiento de aumento de dosis es como se describe en el Ejemplo 1 y la DMT/DMF se designa como la dosis de estudio, que se utiliza en la Fase II.

Para la Fase II del estudio, la cohorte de pacientes recibe primero un pretratamiento con CpG intratumoral una vez a la semana, seguido de una inyección intratumoral de la combinación de tres componentes de CG0070 (por ejemplo, con DDM), el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de OX-40 (por ejemplo, MEDI-6469) a la dosis de estudio determinada en la Etapa 3 de la Fase I durante cuatro semanas, seguido de inyecciones intratumorales de la combinación de tres componentes una vez cada 2 semanas durante cuatro veces. Posteriormente, se administra una inyección intratumoral mensual de la combinación de tres componentes como tratamiento de mantenimiento hasta obtener una respuesta completa, desaparición de todos los tumores inyectables, progresión confirmada de la enfermedad o intolerancia al tratamiento del estudio, lo que se produzca primero. Los pacientes que se encuentran en la fase de aumento de dosis de la Fase I (por ejemplo, etapa 1, 2 o 3) pueden inscribirse en el estudio de fase II siempre que haya un período de descanso de al menos cuatro semanas desde la última dosis. Para cada administración, primero se inyecta GC0070 en las lesiones, seguido por el inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab) y el agonista de OX-40 (por ejemplo, MEDI-6469). El tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP) es el primer tumor que se inyecta y el volumen y la dosis de la inyección se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Los volúmenes restantes de los fármacos se inyectan en el siguiente tumor inyectable más grande (según lo determinado por el IP), y el volumen de inyección y la dosis se indican en la Tabla 3 y la Tabla 4. Este procedimiento se repite para los volúmenes restantes adicionales, hasta que se hayan inyectado todos los volúmenes y dosis totales determinados en la fase I. La inyección de CG0070 se omite en un sitio de inyección particular cuando la lesión en ese sitio ya no es viable. No obstante, las inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista de OX-40 (por ejemplo, MEDI-6469) se administran hasta el final del CICLO DE tratamiento en los mismos sitios, incluso cuando una lesión desaparece. Cada paciente recibe un mínimo de 8 inyecciones del inhibidor de CTLA-4 y del agonista DE OX-40 (por ejemplo, MEDI-6469).

Hay dos medidas de resultados principales para este estudio: (1) seguridad y tolerabilidad; y (2) eficacia. La seguridad y la tolerabilidad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 3 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La etapa 1 determina la seguridad y tolerabilidad de CG0070 (por ejemplo, con DDM) con el pretratamiento con CpG intratumoral según se evalúa mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. La etapa 2 determina la seguridad y tolerabilidad del inhibidor de CTLA-4 (tal como el mAb anti-CTLA-4 o el bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) en combinación con CG0070 con el pretratamiento intratumoral con CpG según se evaluó mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. Los estudios de etapa 3 y fase II determinan

la seguridad y tolerabilidad del agonista de OX40 (anticuerpo agonista anti-OX40, por ejemplo, MEDI-6469) en combinación con CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 con el pretratamiento con CpG intratumoral según se evaluó mediante la incidencia de toxicidades limitantes de la dosis (TLD) en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios. La eficacia se evalúa desde el inicio de cada etapa o la Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. La eficacia se evalúa mediante la tasa de respuesta objetiva (TRO) confirmada del tratamiento con CG0070 (por ejemplo, con DDM) con el pretratamiento con CpG intratumoral en la Etapa 1, con la combinación de CG0070 y el inhibidor de CTLA-4 (tal como mAb anti-CTLA-4 o bloqueador, por ejemplo, ipilimumab) con el pretratamiento intratumoral con CpG en la etapa 2, con la combinación de CG0070, el inhibidor de CTLA-4 y el agonista de OX40 (tal como el anticuerpo anti-OX40 agonista, por ejemplo, MEDI-6469) con pretratamiento intratumoral con CpG en la Etapa 3 y en la Fase II en pacientes con tumores sólidos o linfáticos refractarios inyectables.

Las medidas de resultados secundarios de este estudio son las siguientes. Los resultados secundarios de seguridad se evalúan desde el inicio de cada etapa hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de seguridad incluyen la incidencia de todos los acontecimientos adversos (AA), AA de grado 3 o mayor, acontecimientos que requieren la interrupción del fármaco(s) del estudio, efectos locales sobre el tumor, cambios de laboratorio clínicamente significativos y cambios clínicamente significativos en las constantes vitales. Los resultados secundarios de eficacia se evalúan desde el inicio de cada etapa o Fase II hasta 24 meses después de la inscripción del último sujeto en cada etapa o Fase II. Para las tres etapas y la Fase II, las medidas de resultados secundarios de eficacia incluyen la Mejor tasa de Respuesta General (MRG), Tasa de Control de la Enfermedad (TCE), Tasa de Respuesta Duradera (TRD), Duración de la Respuesta (DdR), Tiempo de respuesta (TdR), Supervivencia libre de progresión (SLP), Tasa de Supervivencia global (SG), Tasa de Supervivencia a 1 año y 2 años.

La elegibilidad de los pacientes de ambos sexos para el estudio se determina según los siguientes criterios de inclusión: (1) Los pacientes deben tener tumores sólidos confirmados histológicamente que no hayan respondido a las terapias estándar (cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia endocrina) y para los que no existen opciones curativas, incluyendo, pero sin limitación: carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma escamocelular de la piel, carcinoma de mama, melanoma maligno, cáncer colorrectal, adenocarcinoma pancreático, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata; (2) Los pacientes pueden haber recibido cualquier tipo y cantidad de terapias previas contra el cáncer; (3) Los pacientes deben tener lesiones mensurables que sean evaluables mediante el método RECIST; (4) La masa tumoral a tratar debe ser adecuada para las inyecciones (es decir, a más de 2 cm de las principales estructuras vasculares) y la medición mediante RECIST; (5) Los pacientes deben tener  $\geq 18$  años de edad; (6) Los pacientes deben tener una expectativa de vida de  $\geq 12$  semanas; (7) Los pacientes deben tener un estado funcional de 0, 1 o 2 en el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG); (8) Los pacientes deben tener una función hepática adecuada, definida como: Niveles de bilirrubina total  $\leq 1,5 \times$  límite superior de lo normal (LSN); y niveles de AST/ALT  $\leq 2,5 \times$  LSN, o  $\leq 5 \times$  LSN si hay metástasis hepáticas; (9) Los pacientes deben tener una función renal adecuada, definida como creatinina sérica  $\leq 1,5 \times$  LSN o aclaramiento de creatinina (calculado)  $\geq 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> para pacientes con creatinina  $> 1,5 \times$  LSN; (10) Los pacientes deben tener una función adecuada de la médula ósea, definida como: Recuento absoluto de neutrófilos  $\geq 1.200/\mu\text{l}$ ; y recuento de plaquetas  $\geq 80.000/\mu\text{l}$ ; (11) Los pacientes no deben tener diátesis hemorrágica o coagulopatía conocida que puedan hacer que la inyección intratumoral o la biopsia no sean seguras; (12) Los varones y mujeres en edad fértil deben aceptar utilizar un método anticonceptivo adecuado antes de entrar en el estudio y durante hasta seis meses; (13) Las mujeres en edad fértil deben tener una prueba de embarazo en orina o suero negativa realizada dentro de la semana anterior al inicio del tratamiento; y (14) Los pacientes deben poder comprender y estar dispuestos a firmar un documento de consentimiento informado por escrito.

Quedan excluidos del estudio los siguientes pacientes: (1) Pacientes que reciben quimioterapia, inmunoterapia o radioterapia dentro de las 4 semanas previas a la selección, o acontecimientos adversos  $>$  Grado 1, excepto alopecia, resultantes de agentes administrados más de 4 semanas antes de la selección; (2) Pacientes con antecedentes de sangrado tumoral significativo o trastornos de coagulación o sangrado; Pacientes con tumores diana que podrían invadir potencialmente una o más estructura(s) vascular(es) importantes (por ejemplo, arteria innominada, arteria carótida), según los hallazgos de imagen inequívocos, según lo determine un radiólogo; (3) Pacientes con anomalías neurológicas preexistentes de grado  $\geq 1$  (CTCAE versión 4.0); (4) Pacientes que hayan sido hospitalizados por afecciones emergentes que requieran evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento durante los 30 días previos a la entrada en el estudio. Por añadidura, las afecciones emergentes que requieren evaluación hospitalaria, tratamiento o procedimiento deben haberse resuelto o ser médicamente estables y no graves durante los 30 días anteriores a la entrada en el estudio; (5) Pacientes con infección clínicamente evidente con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) o el virus de Epstein-Barr (VEB). A los pacientes se les realiza una prueba de detección del VIH durante la selección previa al tratamiento; (6) Pacientes que reciben esteroides o agentes inmunosupresores, por ejemplo, para la artritis reumatoide; (7) Pacientes que estén utilizando simultáneamente otros agentes en investigación; (8) Pacientes con presencia o antecedentes de metástasis del sistema nervioso central; (9) Mujeres embarazadas o en período de lactancia o mujeres que deseen quedar embarazadas dentro del período de tiempo del estudio; (10) Pacientes con enfermedades intercurrentes no controladas, incluidas, aunque no de forma limitativa, infección en curso o activa, insuficiencia cardíaca congestiva sintomática, angina de pecho inestable, arritmia cardíaca o enfermedad psiquiátrica/situaciones sociales que limitarían

el cumplimiento de los requisitos del estudio.

**Ejemplo 9: Estudio *in vivo* de la administración intratumoral de Ar20-1004 en combinación con anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo de aloinjerto de ratón con carcinoma de pulmón escamocelular.**

Este ejemplo describe un estudio *in vivo* de la eficacia del adenovirus oncolítico Ar20-1004, administrado solo o en combinación con el anticuerpo anti-CTLA-4 9H10 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 WBP315 en el modelo de aloinjerto de ratón con carcinoma de pulmón escamocelular murino KLN 205. La eficacia se evaluó mediante el seguimiento del crecimiento del tumor y la metástasis. Ar20-1004 es un adenovirus oncolítico de replicación condicional que tiene la misma construcción que CG0070 excepto que expresa GM-CSF de ratón (CG0070 expresa GM-CSF humano). Debido a la presencia del promotor E2F-1 selectivo de tumores, Ar20-1004 se replica selectivamente y destruye selectivamente las células tumorales con defectos en la ruta Rb. El acontecimiento de muerte celular y el GM-CSF expresado pueden estimular respuestas inmunitarias contra metástasis distantes no infectadas. El Ar20-1004 se ha descrito en el documento US2008/0118470.

**Materiales y métodos**

Ar20-1004 ( $1,2 \times 10^{12}$  pv/ml) y anti-PD-L1 (WBP315) (5,6 mg/ml) se prepararon en Cold Genesys Inc. y se almacenaron a -80 °C antes de su uso. Anti-CTLA-4 9H10 e IgG policlonal de hámster, suministrados como soluciones madre de 6,15 mg/ml y 9,55 mg/ml, respectivamente, se adquirieron en BioX Cell (West Lebanon, NH). Todas las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día y se combinaron para un grupo completo de animales antes de la dosificación. Los isotipos anti-PD-L1 (WBP315), anti-CTLA-4 9H10 e IgG de hámster se diluyeron en PBS para obtener soluciones de dosificación de 1 mg/ml.

Se inocularon células tumorales KLN 205 en los flancos derecho e izquierdo de ratones DBA/2 hembra. Los tumores del lado izquierdo se implantaron cuatro días después de los del lado derecho. El tratamiento comenzó el día (D) 1 en ocho grupos de ratones (n = 10) con tumores KLN 205 subcutáneos establecidos, cuando los tumores del flanco derecho alcanzaron un volumen medio del grupo de  $99 - 102 \text{ mm}^3$ . Todos los agentes se administraron por vía intratumoral el D1, D4, D7 y D10 a los tumores del flanco derecho. Se administró Ar20-1004 a  $1 \times 10^{10}$  UFP/animal. Anti-CTLA-4, IgG policlonal de hámster y anti-PD-L1 se administraron cada uno a una dosis de 20 µg/animal. Los animales de control no fueron tratados. Los grupos de animales y las pautas posológicas se resumen en la Figura 2.

Los tumores se midieron en ambos flancos dos veces a la semana. El criterio de valoración del estudio se definió como un volumen tumoral medio de  $1000 \text{ mm}^3$  en el flanco derecho del grupo de control o 35 días, lo que sucediese primero. El estudio finalizó el D23 cuando el grupo de control alcanzó el criterio de valoración del volumen tumoral. El resultado del tratamiento se basó en el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%ICT), definido como la diferencia porcentual entre los volúmenes tumorales medios (VTM) de los ratones tratados y de control en D19 (suma total de los volúmenes tumorales bilaterales). Los resultados se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney y se consideraron estadísticamente significativos con  $P < 0,05$ .

Los resultados también se analizaron contando los focos metastásicos pulmonares el D23, el último día del estudio. Los animales fueron sacrificados al final del estudio utilizando anestesia con isoflurano y se realizaron necropsias para identificar metástasis. Los recuentos totales se obtuvieron sumando el número de focos contados en los lóbulos superior, centro: lóbulos inferior y poscava del pulmón derecho hasta el número de focos contados en el pulmón izquierdo. La inhibición porcentual se definió como la diferencia entre el número de focos metastásicos del grupo de control designado y el número de focos metastásicos del grupo tratado con el fármaco, expresado como porcentaje del número de focos metastásicos del control designado.

% Inhibición =  $[1 - (\text{n.º Focos tratados con fármaco} / \text{n.º Focos control})] \times 100$ .

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y se consideraron estadísticamente significativos con  $P < 0,05$ . La tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones del peso corporal (PC) y la observación frecuente de signos clínicos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento (RT).

**Resultados**

Este estudio caracterizó las respuestas antitumorales inducidas por Ar20-1004 en el modelo de aloinjerto de carcinoma de pulmón escamocelular murino KLN 205. También se evaluaron las respuestas cuando se administró Ar20-1004 en combinación con anti-CTLA-4 y/o anti-PD-L1. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta el D23 y el análisis ICT se realizó el D19. Los focos metastásicos pulmonares se contaron el D23. Todos los tratamientos fueron bien tolerados.

Ar20-1004, anti-CTLA-4 y anti-PD-L1 solos o en combinación no mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral cuando se administraron por vía intratumoral en el modelo de carcinoma de pulmón escamocelular murino KLN 205 en ratones DBA/2 hembra (Figura 4). Las monoterapias con Ar20-1004, antiCTLA-4 y anti-PD-L1 inhibieron

la metástasis en un 71 %, 60 % y 66 %, respectivamente, pero estos resultados no fueron estadísticamente significativos en comparación con el grupo no tratado. De manera similar, Ar20-1004 en combinación con anti-CTLA-4, o la terapia dual de anti-CTLA-4 y antiPD-L1 (sin Ar20-1004) inhibieron la metástasis en un 69 % y un 74 % respectivamente, que no fueron estadísticamente significativos.

Cabe de destacar que la terapia combinada que incluía Ar20-1004 y anti-PD-L1 resultó en una inhibición significativa del 84 % en el recuento de metástasis, y la terapia combinada triple que incluía Ar20-1004, los anticuerpos anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 dieron como resultado una inhibición significativa del 94 % de los focos de metástasis (Figura 3).

#### **Ejemplo 10: Estudio *in vivo* de la administración intratumoral de Ar20-1004 en combinación con anti-CTLA-4 9H10 intratumoral y/o irradiación local en un modelo de ratón singénico 4T1.**

Este ejemplo describe un estudio *in vivo* que evalúa las respuestas inmunes antitumorales inducidas por Ar20-1004 solo o en combinación con bloqueo de CTLA-4 y/o irradiación en el sitio del tumor primario, así como el impacto del tratamiento sobre la metástasis en el modelo de ratón singénico 4T1.

4T1 es una línea celular de cáncer de mama de ratón con la ruta Rb defectuosa. Como etapa preliminar, el efecto antitumoral del Ar20-1004, un derivado del adenovirus humano (Ad5), con secuencia GM-CSF específica de ratón, se evalúa mediante ensayos de viabilidad y toxicidad de células 4T1 (es decir, producción de GM-CSF). Como control positivo, la línea celular humana LNCap clon FGC (ATCC® CRL-1740™) se utiliza en los mismos ensayos *in vitro*. Se infectan pocillos por triplicado de células cancerosas con Ar20-1004 a MOI de 10, 100 y 1000 respectivamente durante 24 horas. La viabilidad celular se evalúa mediante el ensayo MTT a las 24 horas, 72 horas y 120 horas después de la inyección. Los sobrenadantes celulares se recogen a las 24 horas, 72 horas y 120 horas después de la infección, y se analizó la proteína GM-CSF total mediante ELISA.

En el estudio *in vivo*, a ratones BALB/c de 8-12 semanas de edad se les inyectó a cada uno  $10^4$  células tumorales 4T1 ortotópicamente en la 4ª almohadilla de grasa mamaria inguinal. Se realiza una comparación de pares cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de 50 a 100 mm<sup>3</sup>, y los ratones se asignan aleatoriamente a grupos de tratamiento como se muestra en la Tabla 1 para comenzar el tratamiento. El esquema de dosificación es como se muestra en la figura 5. La irradiación se administra a 5 Gy, 1 día antes de administrar la 1ª dosis de Ar20-1004 (régimen de tratamiento 1) y, opcionalmente, anticuerpo anti-CTLA-4 9H10 (BioXell) o IgG2 de hámster sirio control de isotipo (BioXell, régimen de tratamiento 2). Los ratones se tratan 4 veces con un intervalo de 3 días con los regímenes de tratamiento 1 y 2 como se enumeran en la Tabla 6. Cada vez, todos los agentes se combinan en una jeringa para una administración intratumoral de dosis única. El volumen total de la dosis no debe superar los 50 µl/dosis/ratón.

Tabla 6.

Grupo	N	Régimen de tratamiento 1 Ar20-1004 (IT) $1 \times 10^{10}$ UFP/dosis	Régimen de tratamiento 2 Anti-CTLA-4 (IT) o IgG2 de hámster sirio (control de isotipo, IT) 30 µg/dosis/animal	Régimen de tratamiento 3 Irradiación en los sitios del tumor primario
1	Grupo Mirar-Ver	-	-	-
2	10	-	-	-
3	10	solución salina normal	IgG2 de hámster sirio	-
4	10	+	IgG2 de hámster sirio	-
5	10	solución salina normal	Anti-CTLA-4	-
6	10	+	Anti-CTLA-4	-
7	10	-	-	+
8	10	solución salina normal	IgG2 de hámster sirio	+
9	10	+	IgG2 de hámster sirio	+
10	10	solución salina normal	Anti-CTLA-4	+
11	10	+	Anti-CTLA-4	+

El estudio tiene dos criterios de valoración principales: (1) Inhibición del crecimiento tumoral (ICT); y (2) recuento de metástasis. También se examina a los animales para detectar posibles efectos de los tratamientos sobre el comportamiento normal, como la movilidad, estimación visual del consumo de alimentos y agua, aumento/pérdida de peso corporal (los pesos corporales se miden el día de trabajo durante la primera semana y luego dos veces a la semana después de la aleatorización), conjuntivitis/apelmazamiento del pelo y cualquier otra anomalía. Se notifica cualquier reacción adversa o muerte.

Para monitorizar el crecimiento del tumor, los volúmenes de los tumores primarios se miden utilizando un calibrador.

Los animales individuales con una sola observación de > 30 % de pérdida de peso corporal o tres mediciones consecutivas de > 25 % de pérdida de peso corporal se sacrifican. A cualquier grupo con una pérdida de peso corporal media de >20 % o una mortalidad de >10 % se interrumpe la dosificación, pero no se sacrifica a los animales del grupo y se permite la recuperación. Dentro de un grupo con >20 % de pérdida de peso, los individuos que alcanzan el criterio de valoración de pérdida de peso corporal individual son sacrificados. Si la pérdida de peso corporal relacionada con el tratamiento del grupo se recupera dentro del 10 % del peso original, la dosificación puede reanudarse con una dosis más baja o con una pauta posológica menos frecuente.

- 5
- 10
- 15

Para determinar el recuento de metástasis, se sacrifica a 2-3 animales del grupo Mirar Ver cada dos días a partir del día 12. Se extraen los pulmones de cada ratón con un bronquio mínimo y los focos tumorales en la superficie del pulmón se tiñen con tinta china y se recuentan. Cuando se observan 50-100 focos de metástasis por conjunto pulmonar en el grupo Mirar Ver, se alcanza el criterio de valoración del recuento de metástasis y se sacrifican todos los ratones y se recuentan sus focos de metástasis pulmonares. El % de ICT también se calcula en función de las mediciones del volumen del tumor tomadas el último día del estudio, cuando se evalúa a todos los animales para detectar metástasis. También se realiza una necropsia macroscópica en todos los animales en el momento del sacrificio para identificar cualquier metástasis mediante tinción con tinta china en el sitio de la inyección, los ganglios linfáticos regionales, los pulmones, el hígado, los riñones, el bazo y el cerebro.

## REIVINDICACIONES

1. En combinación, un agente infeccioso e inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de un inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1.
2. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente infeccioso se administra: (a) directamente en el tumor; o (b) al tejido que tiene el tumor.
3. La combinación de la reivindicación 1 o 2, en donde el agente infeccioso y el inmunomodulador se administran secuencialmente o simultáneamente.
4. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el método comprende la administración local de al menos dos inmunomoduladores, en donde el método comprende la administración local de un inhibidor de CTLA-4 y un inhibidor de PD-L1.
5. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además administrar localmente en el sitio del tumor una molécula relacionada con el sistema inmunológico, en donde la molécula relacionada con el sistema inmunológico se selecciona entre el grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-12, interferón, CCL4, CCL19, CCL21, CXCL13, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, RIG-1, MDA5, LGP2, LT $\alpha$  $\beta$ , dinucleótidos cíclicos, oligodesoxinucleótidos CpG, imiquimod, poli I:C, GS-9620, AED-1419, CYT-003-QbG10, AVE-0675, y PF-7909.
6. La combinación para el uso de la reivindicación 5, en donde la molécula relacionada con el sistema inmunológico es expresada por el agente infeccioso, en donde el agente infeccioso comprende un ácido nucleico que codifica la molécula relacionada con el sistema inmunológico.
7. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el agente infeccioso es un adenovirus de serotipo 5, en donde el promotor E1a endógeno y la región codificante E3 de 19 kD de un adenovirus nativo se reemplazan por el promotor E2F-1 humano y un ácido nucleico que codifica GM-CSF humano.
8. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el agente infeccioso es CG0070.
9. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8: (a) que comprende además administrar localmente en el sitio del tumor una composición de pretratamiento antes de la administración del agente infeccioso; y/o (b) en donde el individuo está sujeto a una terapia previa anterior a la administración del agente infeccioso y el inmunomodulador.
10. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el tumor sólido o linfático es cáncer de vejiga, opcionalmente en donde el agente infeccioso se administra por vía intravesical.
11. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el método inhibe la metástasis del tumor sólido o linfático en el individuo.
12. Un agente infeccioso para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de dicho agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de un inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1.
13. Un inmunomodulador para su uso en un método de tratamiento de un tumor sólido o linfático en un individuo, en donde dicho método comprende: a) administrar localmente en el sitio del tumor una cantidad eficaz de un agente infeccioso, en donde el agente infeccioso es un virus oncolítico; y b) administrar localmente en el sitio del tumor dicha cantidad eficaz de dicho inmunomodulador, en donde el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1.
14. La combinación para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el agente infeccioso de la reivindicación 12, o el inmunomodulador de la reivindicación 13, en donde el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona entre el grupo que consiste en KY-1003, MCLA-145, RG7446, BMS935559, MPDL3280A, MEDI4736, avelumab y STI-A1010.
15. La combinación para el uso de la reivindicación 4, en donde el inhibidor de CTLA-4 es un anticuerpo anti-CTLA-4, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 se selecciona entre el grupo que consiste en ipilimumab, tremilimumab y un anticuerpo anti-CTLA-4 de cadena única.



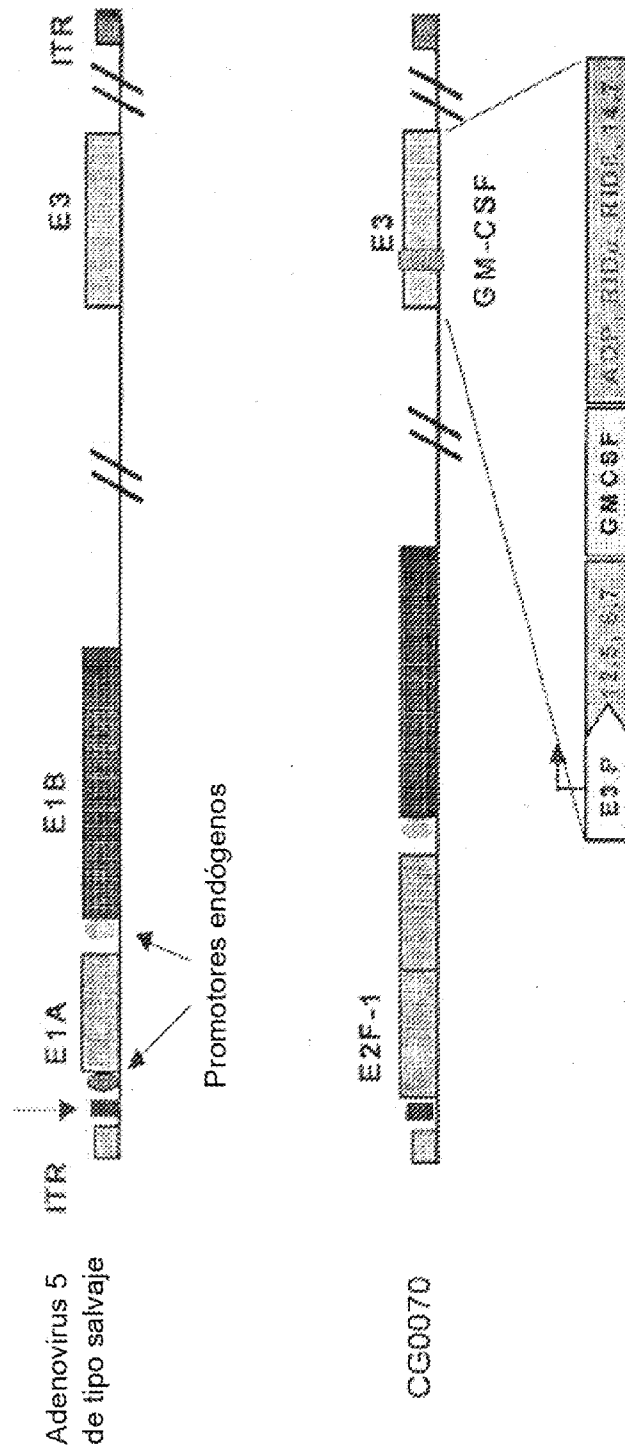


FIG. 1

Resumen de grupos y pauta posológica													
Gr.	N	Régimen 1: Ar20-1004				Régimen 2: anti-CTLA4				Régimen 3: anti-PD-L1			
		Agente	µg/animal	Vía	Pauta	Agente	µg/animal	Vía	Pauta	Agente	µg/animal	Vía	Pauta
1	10	Sin tratamiento	-	-	-	Sin tratamiento	-	-	-	Sin tratamiento	-	-	-
2	10	Solución salina normal	-	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-CTLA4 9H10	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	Solución salina normal	-	IT	Días 1, 4, 7, 10
3	10	Ar20-1004	1E+10	IT	Días 1, 4, 7, 10	IgG policlonal de hamster	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	Solución salina normal	-	IT	Días 1, 4, 7, 10
4	10	Ar20-1004	1E+10	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-CTLA4 9H10	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	Solución salina normal	-	IT	Días 1, 4, 7, 10
5	10	Solución salina normal	-	IT	Días 1, 4, 7, 10	IgG policlonal de hamster	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-PD-L1 (WBP315)	20	IT	Días 1, 4, 7, 10
6	10	Ar20-1004	1E+10	IT	Días 1, 4, 7, 10	Solución salina normal	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-PD-L1 (WBP315)	20	IT	Días 1, 4, 7, 10
7	10	Solución salina normal	-	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-CTLA4 9H10	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-PD-L1 (WBP315)	20	IT	Días 1, 4, 7, 10
8	10	Ar20-1004	1E+10	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-CTLA4 9H10	20	IT	Días 1, 4, 7, 10	anti-PD-L1 (WBP315)	20	IT	Días 1, 4, 7, 10

FIG. 2

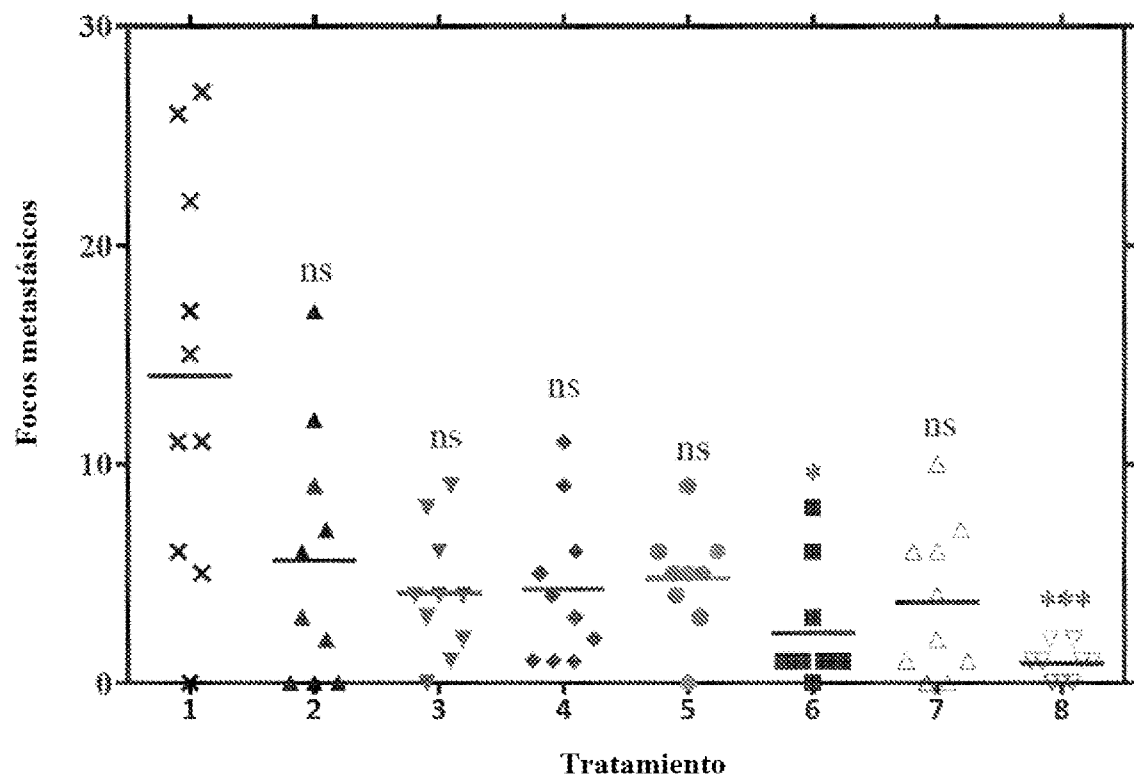


FIG. 3

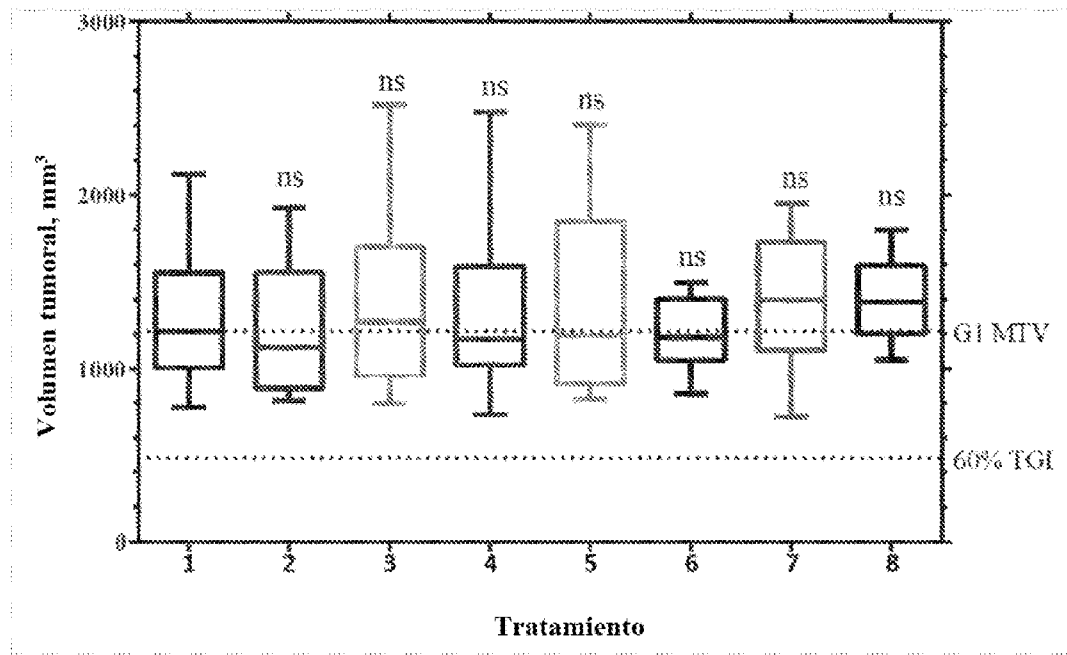


FIG. 4

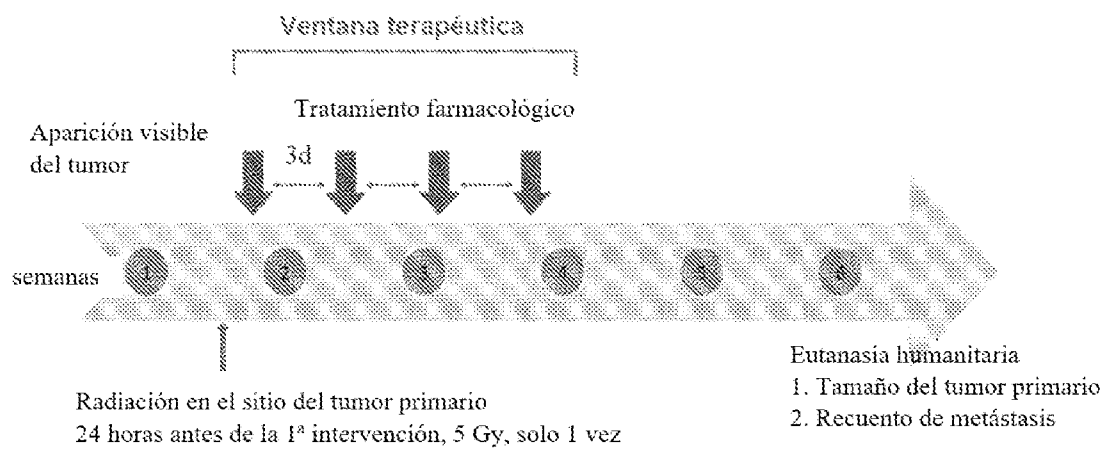


FIG. 5