(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201792412 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.03.30

(22) Дата подачи заявки
2016.05.03

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
A61K 39/04 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ MYCOBACTERIUM КАК ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **15166206.1; 62/387,407**
(32) **2015.05.04; 2015.12.23**
(33) **EP; US**
(86) **PCT/EP2016/059872**
(87) **WO 2016/177717 2016.11.10**

(71) Заявитель:
ВАКЦИНЕ ПРОЕКТ МЕНЕДЖМЕНТ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Гроде Леандр (DE)

(74) Представитель:
Купцова М.В., Фелицына С.Б. (RU)

(57) Данное изобретение имеет отношение к рекомбинантной клетке Mycobacterium для использования в качестве иммунотерапевтического средства при лечении рака, в частности при лечении солидных опухолей. Конкретнее, изобретение имеет отношение к иммунотерапии карциномы мочевого пузыря.

201792412 A1

201792412 A1

РЕКОМБИНАНТНАЯ MYCOBACTERIUM КАК ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Изобретение имеет отношение к рекомбинантной клетке Mycobacterium для использования в качестве иммунотерапевтического средства при лечении рака, в частности, при лечении солидных опухолей. Конкретнее, изобретение имеет отношение к иммунотерапии карциномы мочевого пузыря.

Уротелиальная карцинома мочевого пузыря является 5-ым по распространенности видом рака. В Соединенных Штатах каждый год диагностируется около 75000 новых случаев рака или 4.5% от всех новых случаев и ожидается приблизительно 15600 случаев со смертельным исходом. В Германии каждый год диагностируется около 16000 новых случаев. Поскольку рецидив карциномы мочевого пузыря возможен с большой вероятностью, пациенты должны находиться под наблюдением в течение длительного периода времени.

Большинство карцином мочевого пузыря начинается в переходных эпителиальных клетках, которые образуют внутреннюю выстилку мочевого пузыря. Так как эти опухоли растут, они могут вторгаться в окружающую соединительную ткань и мышцы. В случае запущенного заболевания опухоли распространяются за пределы мочевого пузыря в близлежащие лимфатические узлы или органы полости таза или метастазируют в более отдаленные органы, такие как легкие, печень и кости.

Общая 5-летняя выживаемость для карциномы мочевого пузыря составляет 77%, причем этот показатель значительно не изменился в течение последних 10 лет. Если принимать во внимание стадию, уровни 5-летней относительной выживаемости для пациентов с опухолями, ограниченными внутренним слоем мочевого пузыря, составляют 96% и 69%, соответственно. Показатель падает до 34% для пациентов, у которых болезнь распространяется локально за пределы мочевого пузыря, и до 6% для пациентов с отдаленными метастазами.

Для пациентов с немышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря лечение в большинстве случаев включает хирургическое удаление опухоли с последующей химиотерапией, обычно митомицином С, внутрь мочевого пузыря (так называемая внутрипузырная химиотерапия). В период восстановления после хирургической операции пациенты с низким риском прогрессирования болезни могут находиться под наблюдением или подвергаться дополнительной внутрипузырной химиотерапии. Пациенты со степенью злокачественности заболевания от умеренной до высокой часто получают внутрипузырную иммунотерапию с использованием ослабленной живой бациллы

Кальмета-Герена (БЦЖ). БЦЖ была первой, одобренной FDA, иммунотерапией, которая помогает снизить риск рецидива карциномы мочевого пузыря путем стимулирования иммунного ответа, нацеленного на бактерии, а также любые клетки карциномы мочевого пузыря. Однако обнаружено, что у некоторых пациентов БЦЖ-терапия является менее эффективной, в частности, после повторного введения.

Стандартное лечение для пациентов с немышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря включает химиотерапию на основе цисплатина с последующим хирургическим удалением мочевого пузыря или лучевую терапию и сопутствующую химиотерапию. Для лечения рецидивирующей карциномы мочевого пузыря могут использоваться режимы комбинированной терапии, включая гемцитабин плюс цисплатин или метотрексат, винбластин, доксорубицин плюс цисплатин.

При лечении карциномы мочевого пузыря рецидив опухоли является основной причиной для беспокойства, даже у пациентов с низкой степенью злокачественности, и требует экстенсивного периода последующих мероприятий. Улучшенные виды лечения, такие как новые иммунотерапевтические средства, могут уменьшить частоту рецидивов и улучшить выживаемость пациентов с карциномой мочевого пузыря.

Рекомбинантный штамм БЦЖ, экспрессирующий домен фаголизосомального истечения, описан в WO 99/101496, содержание которого включается в описание путем отсылки. Домен фаголизосомального истечения дает возможность штамму «покидать» фагосому инфицированных клеток хозяина путем перфорации мембраны фагосомы. Чтобы обеспечить кислую фагосомальную pH для оптимальной активности фаголизосомального истечения, был создан дефицитный по уреазе рекомбинантный штамм. Этот штамм раскрывается в WO 2004/094469, содержание которого включается в описание путем отсылки.

WO 2012/085101, содержание которого включается в описание путем отсылки, раскрывает, что рекомбинантный штамм БЦЖ, экспрессирующий перфорирующий мембрану листериолизин (Hly) *Listeria monocytogenes* и лишенный уреазы C, индуцирует лучшую защиту от аэрогенного заражения *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) по сравнению с исходной БЦЖ в доклинической модели. Кроме того, показано, что оба и рекомбинантный и исходный штамм вызывают выраженные Th1 иммунные ответы, тогда как, помимо этого, только рекомбинантный штамм БЦЖ вызывает выраженный Th17 ответ.

В настоящем исследовании было обнаружено, что рекомбинантный дефицитный по уреазе и листериолизин-экспрессирующий рекомбинантный штамм БЦЖ вызывает бóльший иммунный ответ по сравнению с исходным штаммом БЦЖ на животной модели.

Предметом настоящего изобретения является рекомбинантная клетка Mycobacterium, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид, включающий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального истечения

для использования в качестве иммунотерапевтического средства при лечении солидных опухолей.

Дополнительный аспект настоящего изобретения представляет собой способ иммунотерапевтического лечения солидных опухолей у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту рекомбинантной клетки Mycobacterium, содержащей молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид, включающий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального истечения.

Согласно настоящему изобретению было обнаружено, что внутрипузырная инстилляция рекомбинантной клетки БЦЖ в мочевой пузырь крыс неожиданно приводит к повышенной инфильтрации ткани мочевого пузыря лимфоцитами, в частности, CD4- и CD8-положительными лимфоцитами, что является причиной высокой частоты возникновения очаговой и/или многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации. В отличие от этого, в ткани мочевого пузыря животных, обработанных стандартной БЦЖ, CD4- и CD8-положительные лимфоциты были обнаружены только в виде одноклеточных инфильтратов (диффузная инфильтрация). Кроме того, введение рекомбинантной клетки БЦЖ не повышает сколько-нибудь угрозу безопасности.

В настоящее время проводится фаза I/II клинических испытаний по оценке безопасности и эффективности внутрипузырной инстилляции рекомбинантной БЦЖ у людей с рецидивирующей немышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря после стандартной терапии БЦЖ.

Таким образом, настоящее изобретение также имеет отношение к рекомбинантной клетке Mycobacterium, как описано выше, предназначенной для использования в качестве иммунотерапевтического средства при лечении солидных опухолей с целью получения очаговой и/или многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации, например, CD4 и CD8 Т-клетками в месте введения. Рекомбинантная клетка Mycobacterium настоящего изобретения является, в частности, пригодной для использования в лекарственных препаратах для человека.

Иммунотерапевтическое средство представляет собой живую рекомбинантную

клетку Mycobacterium, содержащую молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный полипептид, включающий (a) домен, способный вызвать иммунный ответ, и (b) домен фаголизосомального истечения. Домен, способный вызвать иммунный ответ, является предпочтительно иммуногенным пептидом или полипептидом из патогена или его иммуногенным фрагментом.

Клетка Mycobacterium предпочтительно является клеткой *M. bovis*, клеткой *M. tuberculosis*, в частности, ослабленной клеткой *M. tuberculosis* или другой Mycobacteria, например, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* или *M. fortuitum*. Более предпочтительно, клетка является ослабленной рекомбинантной клеткой *M. bovis* (БЦЖ), в частности, клеткой *M. bovis* БЦЖ, в частности, рекомбинантной клеткой *M. bovis* БЦЖ из штамма Danish подтип Prague (Brosch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 (2007), 5396-5601). В особенно предпочтительном варианте осуществления клетка Mycobacterium является рекомбинантной дефицитной по уреазе. В особенно предпочтительном варианте осуществления ureC последовательность клетки Mycobacterium является инактивированной (ΔUrec), например, путем конструирования суицидного вектора, содержащего ureC ген, «разорванный» селективным маркерным геном, например, геном гидромицина, трансформирующим клетку-мишень при помощи вектора, и далее скрининга с целью отбора маркер-положительных клеток, имеющих уреаза-отрицательный фенотип. В еще более предпочтительном варианте осуществления селективный маркерный ген, т.е. ген гигромицина, является в результате инактивированным. В этом варианте осуществления клетка является рекомбинантной клеткой Mycobacterium, не имеющей селективного маркера. Наиболее предпочтительно клетка является не имеющим селективного маркера рекомбинантным БЦЖ штаммом Danish подтипа Prague, охарактеризованным как рекомбинантный БЦЖ ΔUrec::Hly+.

Домен, способный вызывать иммунный ответ, предпочтительно выбирают из иммуногенных пептидов или полипептидов из *M. bovis*, *M. tuberculosis* или *M. leprae* или из их иммуногенных фрагментов, имеющих в длину, по меньшей мере, 6, предпочтительно, по меньшей мере, 8 аминокислот, более предпочтительно, по меньшей мере, 9 аминокислот и, например, вплоть до 20 аминокислот. Конкретными примерами подходящих антигенов являются Ag85B (p30) из *M. tuberculosis*, Ag85B (α-антиген) из *M. bovis* БЦЖ, Ag85A из *M. tuberculosis* и ESAT-6 из *M. tuberculosis* и их фрагменты. В других вариантах осуществления домен, способный вызывать иммунный ответ, выбирают из немикобактериальных полипептидов.

Более предпочтительно иммуногенный домен происходит из антигена Ag85B. Наиболее предпочтительно иммуногенный домен содержит последовательность от aa.41

до аа.51 в SEQ ID No.2.

Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит домен фаголизосомального истечения, т.е. полипептидный домен, который обеспечивает выделение гибридного полипептида из фаголизосомы в цитозоль клеток млекопитающих. Предпочтительно, домен фаголизосомального истечения представляет собой домен фаголизосомального истечения Listeria, который описан в США 5,733,151, включенном в этот документ путем отсылки. Более предпочтительно домен фаголизосомального истечения происходит из гена листериолизина (Hly) L.monocytogenes. Наиболее предпочтительно фаголизосомальный домен кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из: (a) нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотиды 211 – 1722, как показано в SEQ ID No.1, (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же самую аминокислотную последовательность как последовательность из (a), и (c) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся при строгих условиях с последовательностью из (a) или (b).

Помимо нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID No.1, настоящее изобретение также включает последовательности нуклеиновых кислот, гибридизирующиеся с ними. В настоящем изобретении термин "гибридизация" используется, как определено в Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104). В соответствии с настоящим изобретением термин "гибридизация" используется, если положительный сигнал гибридизации все еще наблюдался после промывки в течение одного часа 1 X SSC и 0.1% SDS при 55°C, предпочтительно при 62°C и более предпочтительно при 68°C, в частности, в течение 1 часа в 0.2 X SSC и 0.1% SDS при 55°C, предпочтительно при 62°C и более предпочтительно при 68°C. Последовательность, гибридизирующаяся с нуклеотидной последовательностью, соответствующей SEQ ID No.1, при таких условиях отмывки является нуклеотидной последовательностью, кодирующей домен фаголизосомального высвобождения, предпочтительную в рассматриваемом изобретении.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен фаголизосомального высвобождения, как описано выше, может быть непосредственно получена из организма Listeria или из какого-либо рекомбинантного источника, например, рекомбинантной клетки *E.coli*, содержащей соответствующую молекулу нуклеиновой кислоты Listeria или ее вариант, как описано выше.

Предпочтительно, молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид, содержит сигнальный пептид, кодирующий последовательность. Более предпочтительно сигнальная последовательность является сигнальной

последовательностью, активной в Mycobacteria, предпочтительно в *M.bovis*, например, природной сигнальной последовательностью *M.bovis*. Предпочтительным примером подходящей сигнальной последовательности является нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид Ag85B, которая представлена нуклеотидами 1 – 20 в SEQ ID No.1.

Кроме того, предпочтительно, что между иммуногенным доменом и доменом фаголизосомального высвобождения обеспечивался пептидный линкер. Предпочтительно, указанный пептидный линкер имеет в длину от 5 до 50 аминокислот. Более предпочтительно последовательность, кодирующая линкер, представлена нуклеотидами 154 - 210 в SEQ ID No.1 или ей соответствующей последовательностью, полученной вследствие вырожденности генетического кода.

Нуклеиновая кислота может располагаться на рекомбинантном векторе. Предпочтительно рекомбинантный вектор является прокариотическим вектором, т.е. вектором, содержащим элементы для репликации или/и геномной интеграции в прокариотических клетках. Предпочтительно, рекомбинантный вектор несет молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, функционально связанную с последовательностью контроля экспрессии. Последовательность контроля экспрессии является предпочтительно последовательностью контроля экспрессии, активной в Mycobacteria, в частности, в *M.bovis*. Вектор может быть экстрахромосомным вектором или вектором, подходящим для интеграции в хромосому. Примеры таких векторов известны специалистам и представлены, например, в Sambrook *et al.* выше.

Иммунотерапевтическое средство настоящего изобретения пригодно для лечения солидных опухолей, таких как опухоли мочевого пузыря, легких, печени, молочной железы, почки или предстательной железы. В частности, настоящее изобретение пригодно для лечения неинвазивных солидных опухолей. В особенно предпочтительном варианте осуществления солидная опухоль является карциномой мочевого пузыря, например, неинвазивной карциномой мочевого пузыря, например, неинвазивной папиллярной карциномой *in situ* (T_a), неинвазивной карциномой in situ (T_{cis}), опухолью, вторгающейся в субэпителиальную соединительную ткань (T_1), опухолью, вторгающейся в поверхностную мышцу (внутреннее полукольцо) (T_{2a}), опухолью, вторгающейся в глубокую мышцу (наружное полукольцо) (T_{2b}), опухолью, вторгающейся в околопузырную ткань (T_3 включая T_{3a} и T_{3b}), опухолью, вторгающейся в предстательную железу, матку или влагалище (T_{4a}), и опухолью, вторгающейся в стенку таза или брюшную стенку (T_{4b}). В частности, опухоль представляет собой поверхностную опухоль или карциному in situ (T_{cis}), неинвазивную папиллярную карциному (T_a) или опухоль, вторгающуюся в

субэпителиальную соединительную ткань (T_1). Иммунотерапевтическое лечение пригодно для лечения первичных опухолей и/или для лечения рецидивов опухолей.

Иммунотерапевтическое средство предпочтительно вводится локально в место расположения опухоли, т.е. в место первичной опухоли, перед хирургической операцией или после хирургической операции и необязательно после химиотерапии. Для лечения карциномы мочевого пузыря средство предпочтительно вводится путем внутрипузырной инстилляции (введения каплями внутрь мочевого пузыря). В случае других опухолей введение может включать локальное введение инъекцией или, в случае опухолей легких, легочное введение.

Иммунотерапевтическое средство изобретения может вводиться в качестве первой линии иммунотерапии у пациентов, которые ранее не подвергались лечению противоопухолевым иммунотерапевтическим средством, таким как стандартная БЦЖ, или в качестве последующей иммунотерапии у пациентов, которые ранее подвергались лечению противоопухолевым иммунотерапевтическим средством, таким как стандартная БЦЖ. Иммунотерапевтическое средство может вводиться пациентам при наличии вновь диагностированной солидной опухоли, например, карциномы мочевого пузыря, или, в частности, пациентам с рецидивными солидными опухолями, например, карциномой мочевого пузыря.

Иммунотерапевтическое средство вводится субъекту, нуждающемуся в лечении, в эффективной дозе. Доза, предназначающаяся для введения человеку, может составлять примерно от 10^6 до 10^{10} жизнеспособных колониеобразующих единиц (КОЕ), например, примерно от 10^7 до 10^9 или от 10^8 до 10^9 жизнеспособных колониеобразующих единиц. Предпочтительно, иммунотерапевтическое средство вводится несколько раз, например, по меньшей мере, 3 раза или, по меньшей мере, от 5 раз до 30 раз, в частности, около 15 раз, заранее определенное число раз за время лечения.

Иммунотерапевтическое средство обычно предоставляется в виде фармацевтического препарата, содержащего рекомбинантную микобактериальную клетку в твердой форме, например, в виде лиофилизированного или крио-законсервированного препарата, который может быть восстановлен при помощи подходящего жидкого носителя перед использованием. Альтернативно, препарат может предоставляться в жидкой форме, например, в виде суспензии.

В одном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство изобретения вводится для лечения карциномы *in situ*. Стандартный режим может включать еженедельное введение средства в течение, по меньшей мере, 4, например, 4, 5, 6, 7 или 8 недель в качестве индукционной терапии. Индукционная терапия должна начинаться не

ранее, чем через 2-3 недели после хирургического удаления первичной опухоли. После периода отсутствия лечения, например, 4 недель, введение может быть продолжено с использованием поддерживающей терапии в течение, по меньшей мере, 6 месяцев или, по меньшей мере, 1 года.

В дополнительном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство вводится как индукционная терапия в профилактическом лечении рецидива опухоли. В этом варианте осуществления терапия может начинаться примерно через 2-3 недели после взятия образца биопсии из месторасположения опухоли и повторяться, например, с недельными интервалами, в течение, по меньшей мере, 4, например, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. В случае опухолей с высоким и умеренным уровнем риска это может сопровождаться поддерживающей терапией.

Поддерживающая терапия может включать длительный курс лечения, например, 6, 9 или 12 месяцев лечения или еще дольше при лечении с периодичностью один раз в месяц. Альтернативно, поддерживающая терапия может включать 2, 3 или 4 введения с еженедельными интервалами в 3, 6, 12, 18, 24, 30 и 36 месяцы.

В еще одном дополнительном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство, в частности, рекомбинантный БЦЖ ΔUrec::Hly+, используется для лечения немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря у пациентов с рецидивом после стандартной БЦЖ терапии. Иммунотерапевтическое средство вводится в мочевой пузырь согласно режиму, включающему еженедельные инстилляции во время фазы индукции, например, с использованием 6 еженедельных инстилляций, первую поддерживающую фазу примерно через 3 месяца с использованием, например, 3 еженедельных инстилляций, вторую фазу стабилизации после примерно 6 месяцев с использованием, например, 3 инстилляций и третью фазу стабилизации после примерно 12 месяцев с использованием, например, 3 инстилляций.

Введение в качестве иммунотерапевтического средства рекомбинантной микобактериальной клетки в место расположения солидной опухоли, как описано выше, может сочетаться с дополнительной противоопухолевой терапией, например, облучением и/или химиотерапией. Кроме того, иммунотерапия, как описано выше, может сочетаться с введением рекомбинантной микобактериальной клетки в место, неспецифичное для локализации опухоли, для того, чтобы обеспечить общую стимуляцию иммунной системы. Это неспецифичное для места локализации опухоли введение может осуществляться, как описано в WO 2012/085101, например, перед хирургическим удалением первичной опухоли. В этом случае средство предпочтительно вводится человеку в дозе около 1-10 x 10^5, предпочтительно примерно 2-8 x 10^5 клеток. Средство

предпочтительно вводится в виде однократной дозы, например, путем инъекции. Предпочтительной является подкожная инъекция. Кроме того, предпочтительным является введение средства без адьюванта.

Далее изобретение описывается более подробно при помощи следующих Фигур и Примеров 1-3.

Иммунотерапевтическое средство "*рБЦЖ*", использованное в этих примерах, представляет собой рекомбинантные *M. bovis* (БЦЖ) штамм Danish подтип Prague с инактивированной последовательностью ureC (ΔUrec) и без функционального селективного маркерного гена, которые экспрессируют гибридный белок Ag85B/Hly в соответствии с SEQ ID No.2 (Hly+).

Пример 1. Исследование токсичности однократной дозы рекомбинантной БЦЖ (рБЦЖ) у крыс после инстилляции в мочевой пузырь.

1.1. Проведение исследования

Исследуемый препарат - рБЦЖ в лиофилизированной форме (рБЦЖ Danish подтип Prague ΔUrec::Hly+ без функционального селективного маркерного гена)

Приблизительное количество жизнеспособных колониеобразующих единиц - 5.41×10^8 КОЕ/флакон

Эталонный препарат - БЦЖ medac

Приблизительное количество жизнеспособных колониеобразующих единиц - 2×10^8-2×10^9 КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩИХ ЕДИНИЦ/флакон

Исследуемый вид / Штамм / Сток - Крыса/CD® / Crl:CD(SD)

Заводчик - Charles River Laboratories, Research Models, and Services, Germany GmbH Sandhofer Weg 7 97633 Sulzfeld, Германия

Количество и пол животных - 23 самки;

3 животных в группе 1;

5 животных в группах 2 - 5.

Режим дозирования - Группа 1: Контроль (разбавитель)

Группа 2: - ~2×10^6 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/ животное

Группа 3: - ~2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/ животное

Группа 4: - ~2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные без криопротектора) /животное

Группа 5: - ~2×10^6 КОЕ БЦЖ medac/животное

Способ введения - Внутрипузырная инстилляция

Частота введения - Однократная доза в день 1 исследования.

Вводимый объем - 500 мкл/животное

Продолжительность исследования - • 12 дней адаптации

• 4 прижизненных недели исследования

• 28 дней инкубации

1.2. Результаты

Смертность - Ни одно из животных не умерло преждевременно.

Клинические признаки - Не наблюдалось изменений поведения, внешнего вида или состояния экскрементов ни у одного животного при любом лечении.

Вес тела - Вес тела всех животных во всех дозовых группах находился в пределах нормы на всем протяжении исследования.

Потребление пищи и воды - Потребление пищи у всех животных во всех дозовых группах было в нормальном диапазоне на всем протяжении исследования.

Визуальная оценка потребления питьевой воды не выявила какого-либо влияния, связанного с исследуемым или эталонным препаратом.

Уровни IL-2 Уровни IL-2 в моче и сыворотке всех животных во всех группах были ниже нижнего предела количественного определения.

Макроскопические данные *post mortem.* Не было отмечено изменений, связанных с исследуемым или эталонным препаратом.

Вес органов. - Не наблюдалось изменений, связанных с исследуемым или эталонным препаратом.

КОЕ - рБЦЖ (группы 2 - 4)

vs. контроль (Группа 1)

Не отмечалось образование КОЕ, связанного с тестируемым препаратом, в исследованных органах и крови животных, однократно обработанных путем внутрипузырной инстилляции 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или 2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные)/животное. В частности, было отмечено полное КОЕ в мочевом пузыре через четыре недели после инстилляции исследуемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляции.

Не наблюдалось различий между животными, которых лечили $2x10^6$ или $2x10^8$ КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или $2x10^6$ КОЕ рБЦЖ (замороженные)/животное и контрольными животными.

БЦЖ medac (группа 5) vs. контроль (группа 1)

Не отмечалось КОЕ, связанного с эталонным препаратом, в исследованных органах и крови животных, однократно обработанных путем внутрипузырной инстилляции 2×10^6 БЦЖ medac/животное. В частности, было отмечено полное отсутствие колониеобразующих единиц в мочевом пузыре через четыре недели после инстилляции

эталонного препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляции.

Не наблюдалось различий между животными, которых лечили $2x10^6$ БЦЖ medac/животное и контрольными животными.

рБЦЖ (группы 2 - 4) - vs. БЦЖ medac (группа 5)

Не было обнаружено различий при подсчете КОЕ в исследованных органах и крови животных, однократно обработанных путем внутрипузырной инстилляции 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или 2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные)/животное по сравнению с группой, обработанной аналогичным образом эталонным препаратом 2×10^6 КОЕ БЦЖ medac/животное.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимическое исследование в отношении определения подтипов лимфоцитов в ткани мочевого пузыря выявило высокую частоту возникновения очаговой и многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации CD4 и CD8-положительных клеток в группах 2 и 3, однократно обработанных 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное путем внутрипузырной инстилляции, тогда как у животных в группах 1 (контроль), 4 и 5 наблюдалась экспрессия CD4 и CD8-положительных лимфоцитов только на уровне одноклеточного инфильтрата (диффузная инфильтрация). Почти у всех животных (12 из 13) из групп 1 (контроль), 4 и 5 наблюдалась экспрессия CD4 и CD8-положительных лимфоцитов только на уровне одноклеточного инфильтрата (диффузная инфильтрация). В отличие от этого почти у всех животных (9 из 10) в группах 2 и 3 CD4 и CD8-положительные лимфоциты наблюдались в очаговых и многоочаговых лимфоцитарных инфильтратах в дополнение к диффузной инфильтрации.

Редко можно было обнаружить на исследуемых стеклах нейтрофильные гранулоциты.

В заключение, не было отмечено признаков токсичности у животных, обработанных исследуемым препаратом, эталонным препаратом или разбавителем. Не наблюдалось различий в системном распространении микобактерий в крови и органах между рБЦЖ и БЦЖ medac в случае лечения путем внутрипузырной инстилляции. Не отмечалось КОЕ, связанного с тестируемым препаратом, в исследованных органах и крови животных, обработанных однократно внутрипузырной инстилляцией рБЦЖ по сравнению с контрольными животными. В частности, было отмечено полное отсутствие КОЕ в мочевом пузыре через 4 недели после инстилляции тестируемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляции.

Иммуногистохимическое исследование в отношении определения подтипов лимфоцитов в ткани мочевого пузыря выявило высокую частоту случаев очаговой и многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации CD4 и CD8-положительными клетками в группах 2 и 3, однократно обработанных 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ/животное при помощи внутрипузырной инстилляции, тогда как у животных в группах 1 (контроль), 4 и 5 наблюдалась экспрессия CD4 и CD8-положительных лимфоцитов только в виде одноклеточных инфильтратов (диффузная инфильтрация). Почти у всех животных (12 из 13) в группах 1 (контроль), 4 и 5 наблюдалась экспрессия CD4 и CD8 положительных лимфоцитов только в виде одноклеточных инфильтратов (диффузная инфильтрация). В противоположность этому, почти у всех животных (9 из 10) в группах 2 и 3 были обнаружены CD4 и CD8-положительные лимфоциты в очаговых и многоочаговых лимфоцитарных инфильтратах в дополнение к диффузной инфильтрации. Фиг. 1A показывает очаговую и многоочаговую лимфоцитарную инфильтрацию после введения рБЦЖ. Фиг. 1B показывает только диффузную и единичную инфильтрацию после введения БЦЖ medac (200x увеличение).

Пример 2. Исследование токсичности повторной дозы рекомбинантной БЦЖ (рБЦЖ) у крыс после внутрипузырной инстилляции

2.1. Проведение исследования

Исследуемый препарат - рБЦЖ в лиофилизированной форме (рБЦЖ Danish подтип Prague ΔUrec::Hly+ без функционального селективного маркерного гена)

Приблизительное количество жизнеспособных колониеобразующих единиц - 5.41×10^8 КОЕ/флакон

Эталонный препарат - БЦЖ medac

Приблизительное количество жизнеспособных колониеобразующих единиц - 2×10^8 to 2×10^9 КОЕ /флакон

Исследуемый вид / Штамм / Сток - Крыса / CD® / Crl:CD(SD)

Заводчик - Charles River Laboratories, Research Models, and Services, Germany GmbH Sandhofer Weg 7 97633 Sulzfeld, Германия

Количество и пол животных - 23 самки;

3 животных в группе 1;

5 животных в группах 2 - 5.

Режим дозирования - Группа 1: Контроль (разбавитель)

Группа 2: ~2×10^6 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/ животное

Группа 3: ~2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/ животное

Группа 4: ~2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные без криопротектора) /животное

Группа 5: ~2×10^6 КОЕ БЦЖ medac/животное

Способ введения - Внутрипузырная инстилляция

Частота введения - Повторное введение; один раз в неделю в дни исследования 1, 8, 15, 22, 29 и 36.

Вводимый объем - 500 мкл/животное

Продолжительность исследования - • 21 день адаптации

• 9 прижизненных недель исследования

• 28 дней инкубации

2.2. Результаты

Смертность - Ни одно из животных не умерло преждевременно.

Клинические признаки - Не наблюдалось изменений поведения, внешнего вида или состояния экскрементов ни у одного животного при любом лечении.

Вес тела - Вес тела всех животных во всех дозовых группах находился в пределах нормы на всем протяжении исследования.

Потребление пищи и воды - Потребление пищи у всех животных во всех дозовых группах было в нормальном диапазоне на всем протяжении исследования.

Визуальная оценка потребления питьевой воды не выявила какого-либо влияния, связанного с исследуемым или эталонным препаратом.

Уровни IL-2 - Уровни IL-2 в моче и сыворотке всех животных во всех группах были ниже нижнего предела количественного определения.

Гиперчувствительность - Не наблюдалась гиперчувствительность замедленного типа - (DTH анализ) замедленного типа.

Макроскопические данные - Не было отмечено изменений, связанных с post mortem. исследуемым или эталонным препаратом.

Вес органов - Не наблюдалось изменений, связанных с исследуемым или эталонным препаратом.

КОЕ - рБЦЖ (группы 2 - 4)

vs. контроль (группа 1)

Не отмечалось КОЕ, связанного с тестируемым препаратом, в исследованных органах и крови животных, которых лечили при помощи шести внутрипузырных инстилляций 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или 2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные/w/o криопротектора)/животное. В частности, было отмечено полное отсутствие КОЕ в мочевом пузыре через четыре недели после последней инстилляции тестируемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляции.

Не было обнаружено различий между животными, обработанными $2x10^6$ или $2x10^8$ КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или $2x10^6$ КОЕ рБЦЖ (замороженные)/животное и контрольными животным

БЦЖ medac (группа 5) vs. контроль (группа 1)

Не отмечалось КОЕ, связанного с эталонным препаратом, в исследуемых органах и крови животных, которых лечили при помощи шести внутрипузырных инстилляций 2×10^6 БЦЖ medac/животное. В частности, было отмечено полное отсутствие КОЕ в мочевом пузыре через четыре недели после последней инстилляции эталонного препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляции.

Не наблюдалось различий между животными, которых лечили $2x10^6$ БЦЖ medac/животное и контрольными животными.

рБЦЖ (группы 2 - 4)

vs. БЦЖ medac (группа 5)

Не отмечалось отличия в КОЕ в исследуемых органах и крови животных, которых лечили при помощи шести внутрипузырных инстилляций 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или 2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные)/ животное по сравнению с группой, обработанной аналогичным образом эталонным препаратом 2×10^6 КОЕ БЦЖ medac/животное.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимическое исследование в отношении определения подтипов лимфоцитов в ткани мочевого пузыря выявило высокую частоту возникновения многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации CD4 и CD8-положительными клетками в Группе 2, обработанной 2×10^6 КОЕ рБЦЖ/животное при помощи 6 внутрипузырных инстилляций, за которой следует Группа 3, обработанная 2×10^8 КОЕ рБЦЖ/животное при помощи 6 внутрипузырных инстилляций, тогда как у животных в группах 1 (контроль), 4 и 5 наблюдалась экспрессия CD4 и CD8-положительных лимфоцитов только в виде одноклеточной инфильтрации (диффузная инфильтрация).

Редко можно было обнаружить на исследуемых стеклах нейтрофильные гранулоциты.

В заключение, не было отмечено признаков токсичности у животных, обработанных исследуемым препаратом, эталонным препаратом или разбавителем. Не наблюдалось различий в системном распространении микобактерий в крови и органах между рБЦЖ и БЦЖ medac при лечении внутрипузырной инстилляцией. Было отмечено отсутствие КОЕ, связанного с тестируемым препаратом, в исследуемых органах и крови животных, леченых шесть раз при помощи внутрипузырной инстилляции рБЦЖ, по

сравнению с контрольными животными. В частности, было отмечено полное отсутствие КОЕ в мочевом пузыре через четыре недели после последней инстилляции тестируемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляции.

Иммуногистохимическое исследование в отношении определения подтипов лимфоцитов в ткани мочевого пузыря выявило высокую частоту возникновения многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации CD4 и CD8-положительными клетками в Группе 2, обработанной 2×10^6 КОЕ рБЦЖ/животное при помощи 6 внутрипузырных инстилляций, за которой следует Группа 3, обработанная 2×10^8 КОЕ рБЦЖ/животное при помощи 6 внутрипузырных инстилляций, тогда как у животных в группах 1 (контроль), 4 и 5 наблюдалась экспрессия CD4 и CD8-положительных лимфоцитов только в виде одноклеточной инфильтрации (диффузная инфильтрация). Фиг. 2A показывает очаговую и многоочаговую лимфоцитарную инфильтрацию после введения рБЦЖ. Фиг. 2B показывает только диффузную и единичную инфильтрацию после введения БЦЖ medac (200x увеличение).

Пример 3. Фаза I/II открытого клинического исследования, оценивающего безопасность и эффективность внутрипузырной инстилляции рекомбинантной БЦЖ (рБЦЖ) у людей с рецидивирующим немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря после стандартной БЦЖ терапии.

3.1. Клинический протокол

Рекомбинантная БЦЖ (как определено выше) в настоящее время применяется в клинике в рамках Фазы I/II клинических испытаний путем инстилляции в мочевой пузырь. Клинические испытания фазы I/II направлены на оценку безопасности и эффективности внутрипузырных инстилляций рБЦЖ у людей с рецидивирующим немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря после стандартной БЦЖ терапии. рБЦЖ вводится в мочевой пузырь в ходе 15 еженедельных инстилляций (индукционная фаза: инстилляции 1-6, фаза поддержания 3 месяца: инстилляции 7-9, поддержание 6 месяцев: инстилляции 10-12, поддержание 12 месяцев: инстилляции 13-15).

Первичной конечной точкой фазы I является дозолимитирующая токсичность (DLT) внутрипузырных рБЦЖ инстилляций у пациентов с рецидивом после стандартного БЦЖ лечения при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря. DLT период соответствует 3 инстилляциям плюс 1 неделя и покрывает острую токсичность, вызванную лечением. Пациенты получают лечение в двух когортах по три, что соответствует правилам дизайна исследования 3 + 3 (правило деэскалации дозы: если у пациентов, которых лечили дозой на уровне 1, наблюдаются признаки DLT, доза

вводимого рБЦЖ будет снижена до уровня -1, т.е. до уровня, который в 10 раз ниже уровня 1).

Величина дозы выглядит следующим образом:

- Уровень дозирования 1: 1 – 19.2 x 10^8 КОЕ рБЦЖ
- Уровень дозирования -1: 1 – 19.2 x 10^7 КОЕ рБЦЖ

3.2. Текущее состояние

В настоящее время происходит набор в клинические испытания пациентов в исследовательских центрах в Швейцарии (Базель, Женева, Кур, Берн, Беллинцона, Сен-Галлен) в рамках Фазы I.

DLT-период для первых трех пациентов (когорта 1) был завершен 23 февраля 2016. Данные о безопасности, включая данные по DLT, из этой когорты были собраны спонсором и переданы в Независимый комитет по безопасности данных (ISDC). Поскольку не наблюдалась дозолимитирующая токсичность (DLT), следующим трем пациентам (вторая когорта) было разрешено одновременное включение в испытания, причем доза рекомбинантной БЦЖ сохранялась на уровне 1. Было получено разрешение от ISDC, и все пациенты, участвующие в испытаниях, были об этом информированы спонсором 9 марта 2016. Кроме того, не наблюдалось рецидива опухоли в этой когорте пациентов во время оценки.

В настоящее время происходит набор во вторую когорту, при этом первый пациент уже включен в эту когорту.

Список последовательностей

<110> Vakzine Projekt менеджмент ГмбХ

<120> Рекомбинантная Mycobacterium как иммунотерапевтическое средство для лечения рака.

<130> 60182P EP

<160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1
<211> 1881
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<222> 1..1881
<223> /мол_тип="ДНК"
/примечание="рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты"
/организм="Искусственная последовательность"

<220>
<221> источник
<222> 1..1881
<223> /мол_тип="ДНК"
/примечание="CDS содержащий фаголизосомальный домен (211-1722nt) и стоп-кодон (1879-1881)"
/организм="Искусственная последовательность"

<400> 1
atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca 60

gcggctgtag tccttccggg cctggtgggg cttgccggcg gagcggcaac cgcgggcgcg 120

ttctcccggc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcagtctg caaagcaatc cgctgcaaat 180

aaattgcact cagcaggaca aagcacgaaa gatgcatctg cattcaataa agaaaattca 240

atttcatcca tggcaccacc agcatctccg cctgcaagtc ctaagacgcc aatcgaaaag 300

aaacacgcgg atgaaatcga taagtatata caaggattgg attacaataa aaacaatgta 360

ttagtatacc acggagatgc agtgacaaat gtgccgccaa gaaaaggtta caaagatgga 420

aatgaatata ttgttgtgga gaaaaagaag aaatccatca atcaaaataa tgcagacatt 480

caagttgtga atgcaatttc gagcctaacc tatccaggtg ctctcgtaaa agcgaattcg 540

gaattagtag aaaatcaacc agatgttctc cctgtaaaac gtgattcatt aacactcagc 600

attgatttgc caggtatgac taatcaagac aataaaatcg ttgtaaaaaa tgccactaaa 660

tcaaacgtta acaacgcagt aaatacatta gtggaaagat ggaatgaaaa atatgctcaa 720

gcttatccaa atgtaagtgc aaaaattgat tatgatgacg aaatggctta cagtgaatca 780

caattaattg cgaaatttgg tacagcattt aaagctgtaa ataatagctt gaatgtaaac 840

ttcggcgcaa tcagtgaagg gaaaatgcaa gaagaagtca ttagttttaa acaaatttac 900

tataacgtga atgttaatga acctacaaga ccttccagat ttttcggcaa agctgttact 960

aaagagcagt tgcaagcgct tggagtgaat gcagaaaatc ctcctgcata tatctcaagt 1020

gtggcgtatg gccgtcaagt ttatttgaaa ttatcaacta attcccatag tactaaagta 1080

aaagctgctt ttgatgctgc cgtaagcgga aaatctgtct caggtgatgt agaactaaca 1140

aatatcatca aaaattcttc cttcaaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa 1200

gttcaaatca tcgacggcaa cctcggagac ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgctact 1260

tttaatcgag aaacaccagg agttcccatt gcttatacaa caaacttcct aaaagacaat 1320

gaattagctg ttattaaaaa caactcagaa tatattgaaa caacttcaaa agcttataca 1380

gatggaaaaa ttaacatcga tcactctgga ggatacgttg ctcaattcaa catttcttgg 1440

gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgttc aacataaaaa ctggagcgaa 1500

aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga 1560

aatattaatg tttacgctaa agaatgcact ggtttagctt gggaatggtg gagaacggta 1620

attgatgacc ggaacttacc acttgtgaaa aatagaaata tctccatctg gggcaccacg 1680

ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga 1740

agtcagggtg atcttaatcc attaattaat gaaatcagca aaatcatttc agctgcagtt 1800

ctttcctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcgtta ggcgcggatc cggaattcga 1860

agcttatcga tgtcgacgta g 1881

<210> 2
<211> 626
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> Источник
<222> 1..626
<223> /мол_тип="протеин"
/примечание="соответствующий аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
1."
/организм="Искусственная последовательность"

<400> 2
Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
1 5 10 15
Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
20 25 30
Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
35 40 45
Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser
50 55 60
Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser
65 70 75 80
Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr
85 90 95
Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly

```
            100                 105                 110
Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val
        115                 120                 125
Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile
    130                 135                 140
Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile
145                 150                 155                 160
Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val
                165                 170                 175
Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val
            180                 185                 190
Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn
        195                 200                 205
Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn
    210                 215                 220
Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln
225                 230                 235                 240
Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala
                245                 250                 255
Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala
            260                 265                 270
Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys
        275                 280                 285
Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn
    290                 295                 300
Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr
305                 310                 315                 320
Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala
                325                 330                 335
Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser
            340                 345                 350
Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val
        355                 360                 365
Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys
    370                 375                 380
Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu
385                 390                 395                 400
Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys
                405                 410                 415
Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr
            420                 425                 430
Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn
        435                 440                 445
Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile
    450                 455                 460
Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp
465                 470                 475                 480
Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys
                485                 490                 495
Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser
            500                 505                 510
Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu
        515                 520                 525
Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg
    530                 535                 540
Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr
545                 550                 555                 560
Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala
                565                 570                 575
Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile
            580                 585                 590
Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu
        595                 600                 605
Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met
```

610 615 620

Ser Thr

625

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная клетка *Mycobacterium bovis*, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, включающий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального высвобождения Listeria

для использования в качестве иммунотерапевтического средства при лечении карциномы мочевого пузыря.

2. Клетка по п. 1, которая является клеткой, дефицитной по уреазе.

3. Клетка по п. 1 или 2, которая является рекомбинантной клеткой *M. bovis* БЦЖ штамма Danish подтип Prague.

4. Клетка по любому из пунктов 1-3, отличающаяся тем, что домен, способный вызывать иммунный ответ, выбирают из иммуногенных пептидов или полипептидов из *M. bovis* или *M. tuberculosis*.

5. Клетка по любому из пунктов 1-4, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты не содержит какого-либо функционального селективного маркера.

6. Клетка по любому из пунктов 1-5, отличающаяся тем, что гибридный полипептид содержит

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ и содержащий аминокислотную последовательность от аа.41 до аа.51 в SEQ ID No.2, и

(b) домен фаголизосомального высвобождения Listeria, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из

(i) нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотиды 211-1722, как показано в SEQ ID No.1,

(ii) нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же самую аминокислотную последовательность, как последовательность из (i), и

(iii) нуклеотидной последовательности, гибридизирующейся при строгих условиях с последовательностью из (i) или (ii).

7. Клетка по любому из пунктов 1-6, при этом карцинома мочевого пузыря является неинвазивной карциномой мочевого пузыря, в частности, карциномой *in situ* (T_{cis}), неинвазивной папиллярной карциномой (T_a) или опухолью, вторгающейся в субэпителиальную соединительную ткань (T_1).

8. Клетка по любому из пунктов 1-7, при этом лечение включает местное введение иммунотерапевтического средства в место расположения опухоли, в частности, после хирургической операции.

9. Клетка по любому из пунктов 6-8, при этом средство вводится путем внутрипузырной инстилляции в мочевой пузырь.

10. Клетка по любому из пунктов 1-9, предназначенная для лечения пациентов с впервые диагностированной или рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, которые не подвергались ранее лечению с использованием стандартной БЦЖ.

11. Клетка по любому из пунктов 1-9, предназначенная для лечения пациентов с рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, которые подвергались ранее лечению с использованием стандартной БЦЖ.

12. Клетка по любому из пунктов 1-11, при этом иммунотерапевтическое средство вводится в мочевой пузырь в соответствии с режимом, включающим еженедельные инстилляции во время (i) индукционной фазы с использованием, например, 6 еженедельных инстилляций, первой поддерживающей фазы примерно через 3 месяца с использованием, например, 3 еженедельных инстилляций, второй поддерживающей фазы примерно через 6 месяцев, с использованием, например, 3 инстилляций и третьей поддерживающей фазы примерно через 12 месяцев с использованием, например, 3 инстилляций.

13. Клетка по любому из пунктов 1-12, при этом иммунотерапевтическое средство используется в дозе примерно от 10^6 до 10^{10} КОЕ на введение.

14. Клетка по любому из пунктов 1-13, при этом иммунотерапия сочетается с введением рекомбинантной клетки *Mycobacterium bovis* в место, неспецифичное для опухоли.

15. Клетка по любому из пунктов 1-14, предназначенная для получения очаговой и/или многоочаговой лимфоцитарной инфильтрации в месте введения.

16. Клетка по п. 15 для получения очаговой и/или многоочаговой инфильтрации ткани Т-клетками CD4 и CD8.

17. Способ иммунотерапии карциномы мочевого пузыря у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту рекомбинантной клетки *Mycobacterium bovis*, содержащей молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный полипептид, включающий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

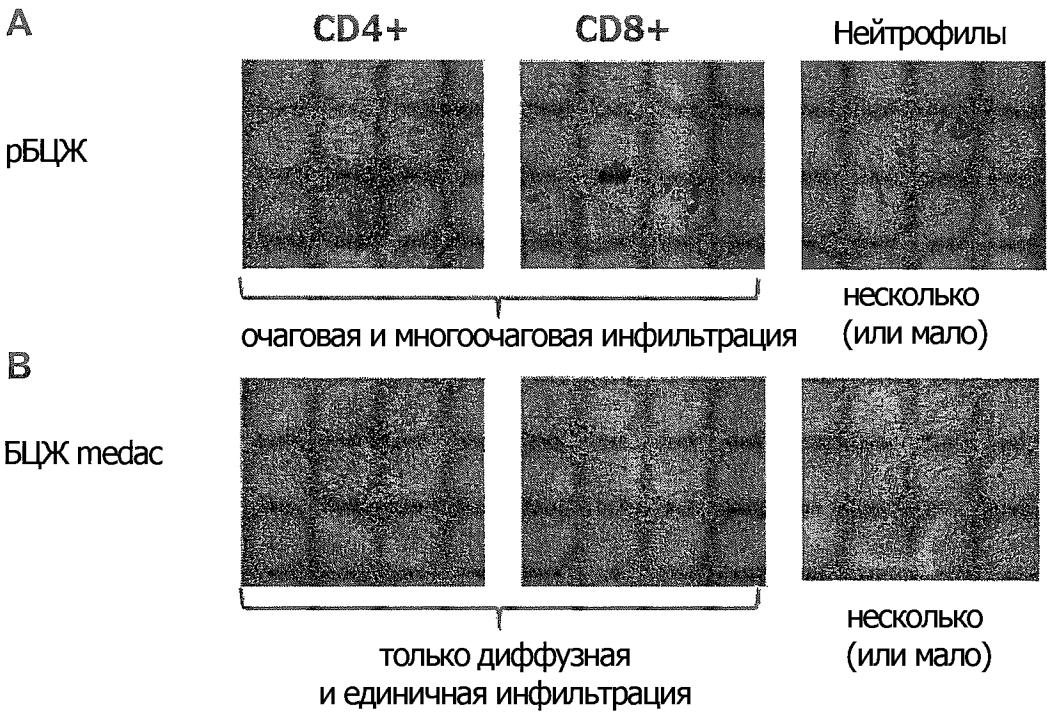
(b) домен фаголизосомального высвобождения Listeria.

18. Способ по п. 17, согласно которому очаговая и/или многоочаговая лимфоцитарная инфильтрация ткани увеличивается по сравнению с введением исходной БЦЖ.

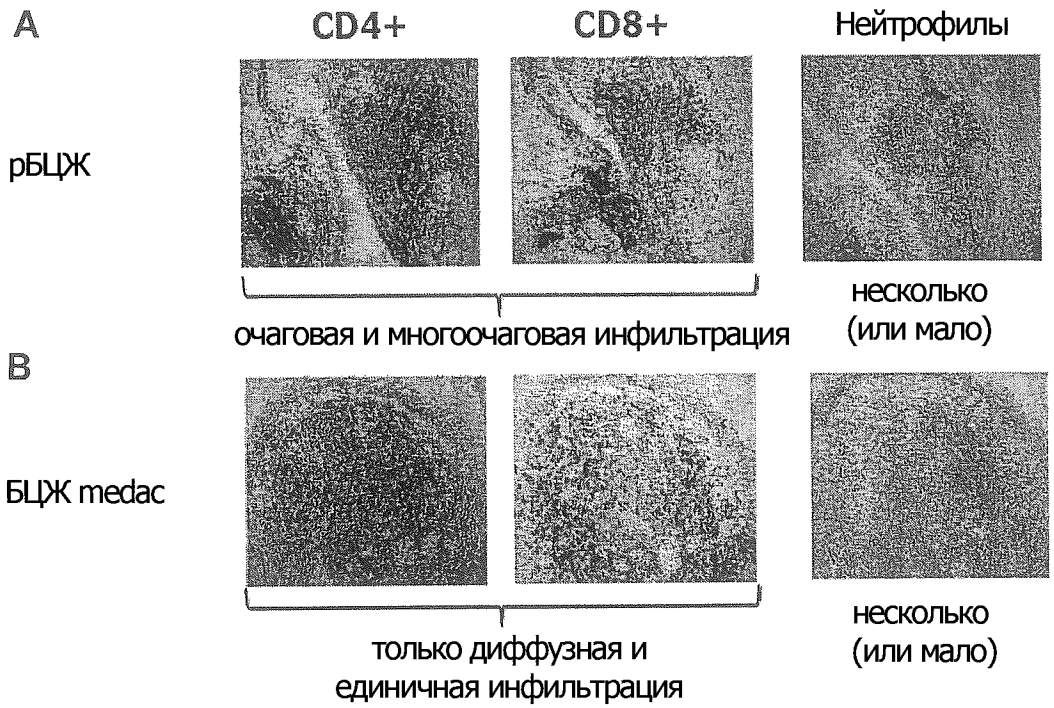
19. Способ по п. 17, который применяется на пациентах с впервые

диагностированной или рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, которые не подвергались ранее лечению с использованием стандартной БЦЖ.

20. Способ по п. 17 лечения пациентов с рецидивом карциномы мочевого пузыря, которых ранее лечили стандартной БЦЖ.


A
CD4+
CD8+
Нейтрофилы
рБЦЖ
несколько
(или мало)
очаговая и многоочаговая инфильтрация
B
БЦЖ medac
несколько
(или мало)
только диффузная
и единичная инфильтрация

Фиг. 1 A/B


A
CD4+
CD8+
Нейтрофилы
рБЦЖ
несколько
(или мало)
очаговая и многоочаговая инфильтрация
B
БЦЖ medac
несколько
(или мало)
только диффузная и
единичная инфильтрация

Фиг.2 A/B