

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036492**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.17

(21) Номер заявки
201792412

(22) Дата подачи заявки
2016.05.03

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

**(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ КЛЕТКА МУСОВАСТЕРИУМ BOVIS КАК
ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЧЕВОГО
ПУЗЫРЯ**

(31) 15166206.1; 62/387,407

(32) 2015.05.04; 2015.12.23

(33) EP; US

(43) 2018.03.30

(86) PCT/EP2016/059872

(87) WO 2016/177717 2016.11.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВАКЦИНЕ ПРОЕКТ МЕНЕДЖМЕНТ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
Гроде Леандр (DE)

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

(56) WO-A1-2012085101

RENTSCH C.A. ET AL.: "VPM1002- a recombinant BCG with favourable preclinical toxicity and immunogenicity for potential improvement of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer", EUR UROL SUPPL, vol. 13, E521, 11 April 2014 (2014-04-11), 15 April 2014 (2014-04-15), XP002746389, the whole document
WO-A1-2004094469

Anonymous: "VPM1002BC in Recurrent Non-muscle Invasive Bladder Cancer", ClinicalTrials.gov 10 February 2015 (2015-02-10), XP002746390, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NC T02371447 [retrieved on 2015-10-12] the whole document
EP-A1-1649869

AU-A1-2014210617
GRODE LEANDER ET AL.: "Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial", VACCINE, vol. 31, no. 9, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 1340-1348, XP028970807, ELSEVIER LTD, GB ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2012.12.053 page 1341, column 1, paragraph 4 page 1345, column 2 - page 1346, column 1, paragraph 1

KUPFERSCHMIDT KAI: "Taking a new shot at a TB vaccine", SCIENCE, vol. 334, no. 6062, 16 December 2011 (2011-12-16), pages 1488-1490, XP002746391, (NEW YORK, N.Y.) ISSN: 1095-9203 page 1489, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 2 figure on page 1490

(57) 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.

B1

036492

036492 B1

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-м 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 внутривезикулярная химиотерапия). В период восстановления после хирургической операции пациенты с низким риском прогрессирования болезни могут находиться под наблюдением или подвергаться дополнительной внутривезикулярной химиотерапии. Пациенты со степенью злокачественности заболевания от умеренной до высокой часто получают внутривезикулярную иммунохимиотерапию с использованием ослабленной живой бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ). БЦЖ была первой, одобренной FDA, иммунохимиотерапией, 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, доксорубинин 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 99/10496, 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 С, 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 больший 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 иммунотерапевтиче-

ского 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 инстиляция 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 инстиляции 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 ($\Delta ureC$), 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 уреазо-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 $\Delta ureC$: :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 aa.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 5733151, 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 ч 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, предпочтительной 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 (T₁), опухолью, вторгающейся в поверхностную мышцу (внутреннее полукольцо) (T_{2a}), опухолью, вторгающейся в глубокую мышцу (наружное полукольцо) (T_{2b}), опухолью, вторгающейся в околопузырную ткань (T₃ 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 (T₁). 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 внутривезикулярной 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, предназначенная 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 криозаконсервированного 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 $\Delta Urec::Hly+$, 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 $1-10 \times 10^5$, предпочтительно примерно $2-8 \times 10^5$ 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* ($\Delta Urec$) 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 инстилляций в мочевой пузырь.

1.1. Проведение исследования.

Исследуемый препарат - рБЦЖ в лиофилизированной форме (рБЦЖ Danish подтип Prague $\Delta Urec::Hly+$ 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®/CrI: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 - $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное;

группа 3 - $\sim 2 \times 10^8$ КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное;

группа 4 - $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ рБЦЖ (замороженные без криопротектора)/животное;

группа 5 - $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ БЦЖ medac/животное.

Способ введения - внутрипузырная инстиляция.

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 инстиляции 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 инстиляции исследуемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстиляции.

Не наблюдалось различий между животными, которых лечили 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или 2×10^6 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 инстиляции 2×10^6 БЦЖ medac/животное. В частности, было отмечено полное отсутствие колониеобразующих единиц в мочевом пузыре через четыре недели после инстиляции эталонного препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстиляции.

Не наблюдалось различий между животными, которых лечили 2×10^6 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 инстиляции 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 инстилляцией, 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 инстилляцией. 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 инстилляцией тестируемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляцией.

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 инстилляцией, 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. 1А показывает очаговую и многоочаговую лимфоцитарную инфильтрацию после введения рБЦЖ. Фиг. 1В показывает только диффузную и единичную инфильтрацию после введения БЦЖ medac (200× увеличение).

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

2.1. Проведение исследования.

Исследуемый препарат - рБЦЖ в лиофилизированной форме (рБЦЖ Danish подтип Prague ΔUrec::Nly+ 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 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 - $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное;

группа 3 - $\sim 2 \times 10^8$ КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное;

группа 4 - $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ рБЦЖ (замороженные без криопротектора)/животное;

группа 5 - $\sim 2 \times 10^6$ КОЕ БЦЖ medac/животное.

Способ введения - внутрипузырная инстилляцией.

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 - (ДТН 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 инстилляций тестируемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляций.

Не было обнаружено различий между животными, обработанными 2×10^6 или 2×10^8 КОЕ рБЦЖ (лиофилизированные)/животное или 2×10^6 КОЕ рБЦЖ (замороженные)/животное и контрольными животными.

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

Не наблюдалось различий между животными, которых лечили 2×10^6 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 инстилляций рБЦЖ, по сравнению с контрольными животными. В частности, было отмечено полное отсутствие КОЕ в мочевом пузыре через четыре недели после последней инстилляций тестируемого препарата, что указывает на быстрое выведение введенных микобактерий из места инстилляций.

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. 2А показывает очаговую и многоочаговую лим-

фоцитарную инфильтрацию после введения рБЦЖ. Фиг. 2В показывает только диффузную и единичную инфильтрацию после введения БЦЖ medac (200× увеличение).

Пример 3. Фаза I/II открытого клинического исследования, оценивающего безопасность и эффективность внутрипузырной инстилляций 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 инстилляций 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: инстилляций 1-6, фаза поддержания 3 месяца: инстилляций 7-9, поддержание 6 месяцев: инстилляций 10-12, поддержание 12 месяцев: инстилляций 13-15).

Первичной конечной точкой фазы I является дозолIMITирующая 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 - 19.2×10^8 КОЕ рБЦЖ;

уровень дозирования -1: 1 - 19.2×10^7 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 (когорты 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 дозолIMITирующая токсичность (DLT), следующим трем пациентам (вторая когорты) 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дефицитная по уреазе рекомбинантная клетка *Mycobacterium bovis* БЦЖ из штамма Danish подтип Prague, которая содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, не содержащую функционального гена селективного маркера, кодирующую слитый полипептид, включающий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, включающий аминокислотную последовательность от положения 41 до положения 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 SEQ ID No. 1,

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

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

в качестве иммунотерапевтического средства при лечении карциномы мочевого пузыря у человека, нуждающегося в этом.

2. Клетка по п.1, отличающаяся тем, что 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, T₁.

3. Клетка по п.1 или 2, отличающаяся тем, что предназначена для лечения впервые диагностированной карциномы мочевого пузыря или рецидивирующей карциномы мочевого пузыря у человека, которого ранее не лечили с использованием стандартной вакцины БЦЖ.

4. Клетка по п.1 или 2, отличающаяся тем, что предназначена для лечения рецидивирующей карциномы мочевого пузыря у человека, которого ранее лечили с использованием стандартной вакцины БЦЖ.

5. Способ иммунотерапии карциномы мочевого пузыря у человека, нуждающегося в этом, при котором указанному человеку вводят в качестве иммунотерапевтического средства дефицитную по уреазе

рекомбинантную клетку *Mycobacterium bovis* БЦЖ из штамма Danish подтип Prague по п.1 в эффективной дозе, причем это лечение включает местное введение иммунотерапевтического средства в мочевой пузырь путем внутривезикулярной инстилляцией.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное иммунотерапевтическое средство вводят человеку с впервые диагностированной карциномой мочевого пузыря или человеку с рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, которого ранее не лечили с использованием стандартной вакцины БЦЖ.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное иммунотерапевтическое средство вводят человеку с рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, которого ранее лечили с использованием стандартной вакцины БЦЖ.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное иммунотерапевтическое средство вводят в мочевой пузырь в соответствии с режимом, включающим еженедельные инстилляций, при этом в фазе индукционной терапии выполняют 6 еженедельных инстилляций, и затем в трех фазах поддерживающей терапии с перерывами между ними примерно в 3, 6 и 12 месяцев выполняют по 3 еженедельные инстилляций иммунотерапевтического средства.

9. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное иммунотерапевтическое средство вводят после хирургического удаления опухоли.

10. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное иммунотерапевтическое средство вводят в дозе примерно от 10^6 до 10^{10} КОЕ на введение.

11. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное иммунотерапевтическое средство дополнительно вводят в место, неспецифичное для локализации опухоли.

