

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490292 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/04* (2006.01)  
*A61P 13/10* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.07.20

---

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ МИКОБАКТЕРИЯ В КАЧЕСТВЕ  
ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ТЕРАПИИ ВТОРОЙ ЛИНИИ  
КАРЦИНОМЫ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

---

(31) 21187253.6; 63/224,575; 17/667,784

(32) 2021.07.22; 2021.07.22; 2022.02.09

(33) EP; US; US

(86) PCT/EP2022/070373

(87) WO 2023/001895 2023.01.26

(71) Заявитель:

СЕРУМ ЛАЙФ САЙЕНЗ ЮРОП  
ГМБХ (DE); СЕРУМ ИНСТИТЮТ  
ОФ ИНДИЯ ЛТД. (IN)

(72) Изобретатель:

Гроде Леандер (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Изобретение относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium* для применения в качестве иммунотерапевтического средства при лечении карциномы мочевого пузыря, в частности лечении второй линии немышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря.

A1

202490292

202490292

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580316EA/025

### РЕКОМБИНАНТНАЯ МИКОБАКТЕРИЯ В КАЧЕСТВЕ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ТЕРАПИИ ВТОРОЙ ЛИНИИ КАРЦИНОМЫ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium* для применения в качестве иммунотерапевтического средства в терапии карциномы мочевого пузыря, в частности, терапии второй линии не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря.

Уротелиальная карцинома мочевого пузыря является 5-ым по распространенности злокачественным новообразованием. В США каждый год диагностируют приблизительно 75000 новых случаев, 4,5% от всех злокачественных новообразований, и ожидают приблизительно 15600 летальных случаев. В Германии каждый год диагностируют приблизительно 16000 новых случаев. Т.к. рецидивирование заболевания является вероятным при карциноме мочевого пузыря, пациенты должны подвергаться наблюдению в течение длительного периода времени.

Большинство карцином мочевого пузыря происходят из клеток переходного эпителия, составляющих внутреннюю выстилку мочевого пузыря. С ростом этих опухолей они могут инвазировать окружающую соединительную ткань и мышцы. При заболевании на поздней стадии опухоли распространяются за пределы мочевого пузыря в близлежащие лимфоузлы или органы малого таза или метастазировать в более отдаленные органы, такие как легкие, печень и кости.

Общая 5-летняя выживаемость при карциноме мочевого пузыря составляет 77%, и этот коэффициент не изменялся значимо за последние 10 лет. При рассмотрении по стадиям 5-летние относительные коэффициенты выживаемости у пациентов с опухолями, ограниченными внутренним слоем мочевого пузыря, составляют 96% и 69%, соответственно. Коэффициенты снижаются до 34% у пациентов с заболеванием, распространившимся локально за пределы мочевого пузыря, и до 6% при отдаленных метастазах.

При лечении карциномы мочевого пузыря рецидивирование опухоли является серьезной проблемой, даже для пациентов с заболеванием низкой степени, и требует обширного последующего наблюдения. Лучшие способы лечения, такие как новые иммунотерапевтические средства, могут снижать показатели рецидивирования и улучшать выживаемость пациентов с карциномой мочевого пузыря.

В случае пациентов с не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря лечение, как правило, включает хирургическое удаление опухоли с последующей химиотерапией, как правило, митомицином C, в пределах мочевого пузыря (так называемая внутривезикулярная химиотерапия). После восстановления после хирургической операции пациентов с более низким риском прогрессирования заболевания можно подвергать наблюдению или дополнительной внутривезикулярной химиотерапии. Пациентов

с заболеванием умеренной или высокой степени зачастую подвергают внутривезикулярной иммунотерапии с использованием аттенуированной живой бактерии бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ). Эту терапию ниже обозначают как "общепринятую" или "стандартную" терапию БЦЖ. Общепринятая терапия БЦЖ являлась первой одобренной FDA иммунотерапией и помогает снижать риск рецидивирования карциномы мочевого пузыря посредством стимуляции иммунного ответа, направленного на бактерии, а также любые клетки карциномы мочевого пузыря. Несмотря на доказанную эффективность общепринятого лечения БЦЖ, приблизительно от 35 до 45% пациентов испытывают рецидивирование заболевания за 5 лет, и у приблизительно от 10 до 13% пациентов заболевание прогрессирует (Oddens et al., Eur Urol 63 (2013), 462-472).

Рецидивирование и прогрессирование до мышечно-инвазивного заболевания может приводить к дополнительным химиотерапевтическим, хирургическим и радиоонкологическим вмешательствам, включая химиотерапию на основе цисплатина, трансуретральную резекцию мочевого пузыря (TURB), цистэктомии и химиолучевую терапию. Рецидивирующую карциному мочевого пузыря можно лечить с помощью комбинированных схем лечения, включая гемцитабин с цисплатином или метотрексат, винбластин, доксорубицин с цисплатином.

Альтернативным вариантом в случае пациентов с рецидивами является повторное лечение с помощью общепринятой терапии БЦЖ (Yates et al, Eur Urol 62 (2012), 1088-1096). Чем раньше происходит неудача БЦЖ, тем вероятнее неудача второго цикла БЦЖ (Gallagher et al., Urology 71 (2008), 297-301).

Однако, обнаружили, что общепринятая иммунотерапия БЦЖ второй линии после исходной неудачи БЦЖ при не-мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря является неэффективной (Di Lorenzo et al., Cancer 2010, doi: 10.1002/cncr.24914). 87,5% пациентов не могли ответить на повторную индукцию БЦЖ к одному году. 37,5% пациентов приходилось подвергать цистэктомии и 40% подвергали лучевой терапии с системной химиотерапией после одного года. Плохой исход у этих пациентов, неспособных ответить на общепринятую терапию БЦЖ, отражают неудовлетворенную потребность в области медицины в улучшенных, сохраняющих мочевой пузырь способах лечения после неудачи общепринятого БЦЖ или другого внутривезикулярного лечения. Таким образом, лучшие варианты лечения не только необходимы для терапии первой линии, но также для пациентов с рецидивированием после первого курса стандартной терапии БЦЖ.

Таким образом, цель настоящего изобретения относится к улучшенному лечению для пациентов, неспособных ответить на общепринятую терапию БЦЖ первой линии, т.к. эти пациенты имеют высокий риск прогрессирования злокачественного новообразования. Улучшенное лечение этих пациентов с высоким риском будет повышать показатели сохранения мочевого пузыря и, таким образом, улучшать качество жизни и снижать затраты на здравоохранение.

Рекомбинантный штамм БЦЖ, экспрессирующий домен фаголизосомального уклонения, описан в WO 99/101496, содержание которой включено в настоящее описание

в качестве ссылки. Домен фаголизосомального уклонения позволяет штамму избегать фагосом инфицированных клеток-хозяев посредством перфорации мембраны фагосомы. Для обеспечения кислого фагосомного pH для оптимальной активности фаголизосомального уклонения разрабатывали рекомбинантный штамм с дефицитом уреазы. Этот штамм описан в WO 2004/094469, содержание которой включено в настоящее описание.

В WO 2012/085101, содержание которой включено в настоящее описание, описано, что рекомбинантный штамм БЦЖ, экспрессирующий перфорирующий мембрану листериолизин (Hly) *Listeria monocytogenes* и неимеющий уреазу C, индуцирует превосходящую защиту против аэрогенной стимуляции *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* по сравнению с родительским БЦЖ в доклинической модели. Кроме того, показано, что рекомбинантный и родительский штамм индуцируют значительные Th1-иммунные ответы, в то время как только рекомбинантный штамм БЦЖ дополнительно вызывает значительный Th17-ответ.

В WO 2016/177717 описано, что рекомбинантный штамм БЦЖ с дефицитом уреазы и листериолизин-экспрессирующий рекомбинантный штамм БЦЖ индуцирует превосходящий иммунный ответ по сравнению с родительским БЦЖ в модели на животных. Кроме того, зарегистрировано начало клинического испытания фазы I/II на людях с использованием рекомбинантного БЦЖ в качестве иммунотерапевтического средства на пациентах после первой стандартной терапии БЦЖ.

Несмотря на удручающие результаты Di Lorenzo et al., выше, при использовании общепринятой терапии БЦЖ в качестве лечения второй линии, авторы настоящего изобретения неожиданно наблюдали высокую общую выживаемость и низкое рецидивирование заболевания даже через 3 или 4 года после начала терапии с использованием листериолизин-экспрессирующего рекомбинантного БЦЖ с дефицитом уреазы в качестве иммунотерапии БЦЖ второй линии, в частности, после исходной неудачи БЦЖ при не-мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря.

Первый аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального уклонения

для применения в способе, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят индивидууму в качестве иммунотерапевтического средства, например, человеку, страдающему карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря в качестве терапии второй линии.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу иммунотерапевтического лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря у индивидуума, в частности, человека,

включающему введение указанному индивидууму в качестве терапии второй линии рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения

для применения в иммунотерапевтическом лечении карциномы мочевого пузыря, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят индивидууму, страдающему карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря, более конкретно, рецидивирующей карциномой мочевого пузыря в качестве терапии второй линии.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу иммунотерапевтического лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря, более конкретно, рецидивирующей карциномы мочевого пузыря у индивидуума, в частности, человека,

включающему введение указанному индивидууму в качестве терапии второй линии рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения

для применения в качестве иммунотерапевтического средства в лечении карциномы мочевого пузыря, в частности, рецидивирующей карциномы мочевого пузыря, где индивидуум, подлежащий лечению, имеет рецидив и/или прогрессирование после первого лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, после первого лечения общепринятой терапией БЦЖ.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу иммунотерапии карциномы мочевого пузыря у нуждающегося в этом индивидуума, в частности не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномы мочевого пузыря, где индивидуум имеет рецидив и/или прогрессирование после первого лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, после первого лечения общепринятой терапией БЦЖ,

включающему введение указанному индивидууму рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения

для применения в способе, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят в качестве иммунотерапевтического средства индивидууму, страдающему карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, где рецидивирование заболевания ингибируют в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу иммунотерапевтического лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномы мочевого пузыря у индивидуума, в частности, человека,

включающему введение указанному индивидууму рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения,

где рецидивирование заболевания ингибируют в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения

для применения в способе, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят в качестве иммунотерапевтического средства индивидууму, страдающему карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, где общую выживаемость повышают за по меньшей мере 1 год, в частности, за по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года или по меньшей мере 4 года.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу иммунотерапевтического лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномы мочевого пузыря у индивидуума, в частности, человека,

включающему введение указанному индивидууму рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

(а) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального уклонения,

где общую выживаемость повышают за по меньшей мере 1 год, в частности, за по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года или по меньшей мере 4 года.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантной клетке *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

(а) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального уклонения

для применения в способе улучшения качества жизни индивидуума, страдающего карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномой мочевого пузыря, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят в качестве иммунотерапевтического средства, таким образом, уменьшая или избегая цистэктомию у указанного индивидуума.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу улучшения качества жизни индивидуума, страдающего карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря, более конкретно - рецидивирующей карциномой мочевого пузыря у индивидуума, в частности, человека,

включающему введение указанному индивидууму рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

(а) домен, способный вызывать иммунный ответ, и

(b) домен фаголизосомального уклонения,

и избегание или уменьшение потребности в цистэктомии у указанного индивидуума.

Следует отметить, что два или более признака указанных выше аспектов можно комбинировать друг с другом.

Таким образом, настоящее изобретение относится к терапии второй линии гBCG в комбинации с по меньшей мере одним из:

- лечения индивидуума, имеющего рецидив и/или прогрессирование после первого лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, после первого лечения общепринятой терапией БЦЖ,

- ингибирования рецидивирования заболевания в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет или по меньшей мере 3 лет, или по меньшей мере 4 лет,

- повышения общей выживаемости до периода по меньшей мере 1 года, в частности, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет, и

- улучшения качества жизни, включающего уменьшение потребности в цистэктомии.

Кроме того, настоящее изобретение относится к улучшению качества жизни, включающему уменьшение потребности в цистэктомии в комбинации по меньшей мере с одним из:

- терапии второй линии в случае индивидуума, имеющего рецидивирование заболевания и/или прогрессирование заболевания после неудачи терапии первой линии,

- ингибирования рецидивирования заболевания в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет,

- повышения общей выживаемости до периода по меньшей мере 1 года, в частности, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к терапии второй линии в комбинации с:

- ингибированием рецидивирования заболевания в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет,

- повышением общей выживаемости до периода по меньшей мере 1 года, в частности, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет,

- и, необязательно, улучшения качества жизни, включающего уменьшение потребности в цистэктомии.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что иммунотерапия второй линии, включающая введение рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, как представлено в настоящем описании, являлась высокоэффективной в снижении частоты заболевания и повышении общей выживаемости. В этом контексте термин "иммунотерапия второй линии" относится к лечению индивидуума, в частности, человека, после неудачи терапии первой линии. Термин "неудача", в частности, означает рецидивирование заболевания и/или прогрессирование заболевания, включая прогрессирование первичной опухоли и/или образование метастазов после терапии первой линии. Более конкретно, термин "неудача" означает рецидивирование заболевания. Термин "терапия первой линии", в частности, относится к терапии первой линии, включающей иммунотерапию, и, более конкретно, к иммунотерапии первой линии, включающей введение стандартной БЦЖ без домена фаголизосомального уклонения, как представлено в настоящем описании, такой как ранее одобренная стандартная БЦЖ, как описано в Rentsch, C A, Eur Urol 2014, PMID: 24674149. Термин "иммунотерапия второй линии" включает введение рекомбинантной

клетки *Mycobacterium*, как представлено в настоящем описании, после одного цикла "терапии первой линии" или после множества, например, 2, 3 или более циклов "терапии первой линии", в частности, одного цикла или множества циклов, включающих введение БЦЖ без домена фаголизосомального уклонения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят в качестве лечения второй линии. В таких вариантах осуществления индивидуума, подлежащего лечению, можно подвергать первому лечению, в частности, лечению карциномы мочевого пузыря, выбранного из группы стандартного лечения БЦЖ, химиотерапии, включая системную и/или внутривезикулярную химиотерапию, хирургического вмешательства на мочевом пузыре, лучевой терапии и любой их комбинации. Например, лечение первой линии может включать химиотерапию на основе цисплатина, в частности, химиотерапии на основе цисплатина с последующим хирургическим вмешательством на мочевом пузыре и/или лучевой терапией, сопутствующую химиотерапию и стандартную БЦЖ. Предпочтительно, индивидуума, подлежащего лечению, подвергали стандартному лечению БЦЖ в качестве первого лечения карциномы мочевого пузыря и/или подвергали цистэктомии или другому местному лечению или системной химиотерапии.

Индивидуум, подлежащий лечению по настоящему изобретению, страдает карциномой мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря (NMIBC), включая карциному *in situ* (CIS). В конкретных вариантах осуществления индивидуум страдает рецидивирующей NMIBC. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет рецидивирующую NMIBC высокой степени по прогрессированию (например, баллы 7-23) в соответствии с критериями Европейской организации по исследованию и лечению рака. В дополнительных вариантах осуществления индивидуума подвергают трансуретральной резекции опухоли мочевого пузыря (TURBT) перед началом терапии. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет мочевой пузырь без опухоли на начало терапии, например, что подтверждено посредством трансуретральной резекции мочевого пузыря (TURB) и биопсии.

В конкретных вариантах осуществления индивидуум является пациентом с опухолью NMIBC высокой степени, присутствующей через 6 месяцев или и 3 месяца, и 6 месяцев после начала предыдущего цикла стандартной терапии БЦЖ и ухудшения заболевания при стандартной терапии БЦЖ, включая по меньшей мере одно из более высокого количества рецидивов, более высокой категории опухоли или более высокой степени и появления CIS, включая опухоли низкой степени, необязательно, несмотря на исходный ответ.

В особенно предпочтительном варианте осуществления индивидуум является курильщиком.

Введение рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, как представлено в настоящем описании, в качестве терапии второй линии является высокоэффективным в снижении

частоты заболевания в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет после начала лечения. Через 3 года после начала лечения медиана времени рецидивирования заболевания уже составляет 1,3 лет и, вероятно, будет повышаться далее. В это время, не наблюдали рецидивирования опухоли у приблизительно 49% пациентов.

Таким образом, терапия по настоящему изобретению относится к периоду без признаков заболевания по меньшей мере 1 год, в частности, по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года или по меньшей мере 4 года для по меньшей мере 30% пациентов и, в частности, по меньшей мере 45% пациентов.

Примечательно, что за период от 2 до 3 лет или от 2 до 4 лет после начала лечения не наблюдали нового рецидивирования заболевания. Таким образом, лечение является высокоэффективным в прекращении рецидивирования заболевания в подгруппе пациентов, нестрадающих рецидивированием заболевания за период до 2 лет после начала лечения.

В отличие от этого, введение стандартной БЦЖ в качестве терапии второй линии совсем не являлось эффективным, как описано Di Lorenzo et al. выше, т.к. через 2 года после начала лечения только у менее чем 5% пациентов не наблюдали рецидивирование опухоли.

Эта высокая клиническая эффективность терапии по настоящему изобретению была обнаружена без возникновения клинически значимых нежелательных явлений. Таким образом, лечение обеспечивает пользу общей выживаемости для пациентов.

Таким образом, введение рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, как представлено в настоящем описании, является высокоэффективным в повышении общей выживаемости на длительный период времени, например, по меньшей мере 1 год, в частности, за по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года или по меньшей мере 4 года. Через 3 года после начала лечения общая выживаемость составляла от 70% до 80%.

В конкретных вариантах осуществления терапия по изобретению подходит для избегания цистэктомии у большого количества пациентов, что приводит к высокому улучшению качеству жизни. Например, цистэктомии можно избегать в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет у по меньшей мере 30% пациентов и, в частности, по меньшей мере 45% пациентов.

Иммунотерапевтическое средство является живой рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и (b) домен фаголизосомального уклонения. Домен, способный вызывать иммунный ответ, предпочтительно, является иммуногенным пептидом, или полипептидом из патогена, или его иммуногенным фрагментом.

Клетка *Mycobacterium*, предпочтительно, представляет собой клетку *M. bovis*, клетку *M. tuberculosis*, в частности, аттенуированную клетку *M. tuberculosis* или другие *Mycobacteria*, например, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* или *M. fortuitum*. Более предпочтительно, клетка является аттенуированной рекомбинантной клеткой *M. bovis* (БЦЖ), в частности, клеткой БЦЖ *M. bovis*, более конкретно - рекомбинантной клеткой БЦЖ *M. bovis* из штамма Danish, подтипа Prague (Brosch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 (2007), 5396-5601). В особенно предпочтительном варианте осуществления клетка *Mycobacterium* является рекомбинантной клеткой с дефицитом уреазы. В особенно предпочтительном варианте осуществления последовательность *ureC* клетки *Mycobacterium* инактивирована ( $\Delta Urec$ ), например, посредством конструирования суицидного вектора, содержащего ген *ureC*, прерванный геном селективного маркера, например, геном резистентности к гигромицину, трансформации клетки-мишени с помощью вектора и скрининга на положительные по селективному маркеру клетки, имеющие уреазо-отрицательный фенотип. В даже более предпочтительном варианте осуществления затем инактивируют ген селективного маркера, т.е. ген резистентности к гигромицину. В этом варианте осуществления, клетка является несодержащей селективный маркер рекомбинантной клеткой *Mycobacterium*. Наиболее предпочтительно, клетка является несодержащим селективный маркер рекомбинантным штаммом БЦЖ Danish, подтипа Prague, охарактеризованным как рекомбинантная БЦЖ  $\Delta Urec::Hly+$ .

Домен, способный вызывать иммунный ответ, предпочтительно выбран из иммуногенных пептидов или полипептидов *M. bovis*, *M. tuberculosis* или *M. leprae* или их иммуногенных фрагментов, имеющих длину по меньшей мере 6, предпочтительно - по меньшей мере 8 аминокислот, более предпочтительно - по меньшей мере 9 аминокислот и, например, до 20 аминокислот. Конкретными примерами подходящих антигенов являются Ag85B (p30) из *M. tuberculosis*, Ag85B ( $\alpha$ -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, выбран из не принадлежащих *Mycobacterium* полипептидов.

Более предпочтительно, иммуногенный домен получают из антигена Ag85B. Наиболее предпочтительно, иммуногенный домен содержит последовательность от а/к 41 до а/к 51 в SEQ ID NO: 2.

Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит домен фаголизосомального уклонения, т.е. полипептидный домен, обеспечивающий уклонение слитого полипептида от фаголизосомы в цитозоль клеток млекопитающих. Предпочтительно, домен фаголизосомального уклонения является доменом фаголизосомального уклонения *Listeria*, описанным в патенте США № 5733151, включенном в настоящее описание в качестве ссылки. Более предпочтительно, домен фаголизосомального уклонения получен из гена листериолизина (Hly) *L. monocytogenes*. Наиболее предпочтительно, фаголизосомальный домен кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из: (а) нуклеотидной последовательности, содержащей

нуклеотиды 211-1722 SEQ ID NO: 1, (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же аминокислотную последовательность, что и последовательность из (a), и (c) нуклеотидной последовательности, гибридизующейся в строгих условиях с последовательностью из (a) или (b).

Помимо нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, настоящее изобретение также включает гибридизующиеся с ней последовательности нуклеиновой кислоты. В настоящем изобретении термин "гибридизация" используют так, как определено в Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104). В рамках изобретения используют термин "гибридизация", если положительный сигнал гибридизации все равно можно наблюдать после промывки в течение одного часа 1-кратным 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-кратном SSC и 0,1% SDS при 55°C, предпочтительно - при 62°C, и более предпочтительно - при 68°C. Последовательность, гибридизующаяся с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 в таких условиях промывки, является доменом фаголизосомального уклонения, кодирующим нуклеотидную последовательность, являющуюся предпочтительной в рамках изобретения.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую домен фаголизосомального уклонения, как описано выше, можно напрямую получать из организма *Listeria* или любого рекомбинантного источника, например, рекомбинантной клетки *E. coli*, содержащей соответствующую молекулу нуклеиновой кислоты *Listeria* или ее вариант, как описано выше.

Предпочтительно, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый полипептид, содержит кодирующую сигнальный пептид последовательность. Более предпочтительно, сигнальная последовательность является сигнальной последовательностью, активной *Mycobacteria*, предпочтительно - в *M. bovis*, например, нативной сигнальной последовательностью *M. bovis*. Предпочтительным примером подходящей сигнальной последовательности является нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный пептид Ag85B, приведенная в SEQ ID NO: 1 нуклеотидах 1-120.

Кроме того, предпочтительно включать пептидный линкер между иммуногенным доменом и доменом фаголизосомального уклонения. Предпочтительно, указанный пептидный линкер имеет длину от 5 до 50 аминокислот. Более предпочтительно, последовательность, кодирующую линкер, как приведено в SEQ ID NO: 1 нуклеотидах 154-210, или последовательность, соответствующую ей в результате вырожденности генетического кода.

Нуклеиновая кислота может находиться в рекомбинантном векторе. Предпочтительно, рекомбинантный вектор является прокариотическим вектором, т.е. вектором, содержащим элементы для репликации и/или геномной интеграции в прокариотических клетках. Предпочтительно, рекомбинантный вектор несет молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, функционально связанную с

последовательностью контроля экспрессии. Последовательность контроля экспрессии, предпочтительно, является последовательностью контроля экспрессии, активной в *Mycobacteria*, в частности, *M. bovis*. Вектор может являться экстрахромосомным вектором или вектором, подходящим для интеграции в хромосомы. Примеры таких векторов известны специалисту в этой области и, например, приведены в Sambrook *et al.* выше.

Иммунотерапевтическое средство по настоящему изобретению подходит для лечения карциномы мочевого пузыря, например, неинвазивной карциномы мочевого пузыря, например, неинвазивной папиллярной карциномы *in situ* (T<sub>a</sub>), неинвазивной карциномы *in situ* (T<sub>cis</sub>), опухоли, инвазирующей субэпителиальную соединительную ткань (T<sub>1</sub>), опухоли, инвазирующей поверхностную мышцу (внутреннюю половину) (T<sub>2a</sub>), опухоли, инвазирующей глубокую мышцу (внешнюю половину) (T<sub>2b</sub>), опухоли, инвазирующей перивезикальную ткань (T<sub>3</sub>, включая T<sub>3a</sub> и T<sub>3b</sub>), опухоли, инвазирующей предстательную железу, матку или влагалище (T<sub>4a</sub>), и опухоли, инвазирующей стенку таза или брюшную стенку (T<sub>4b</sub>). В частности, опухоль является поверхностной опухолью или карциномой *in situ* (T<sub>cis</sub>), неинвазивной папиллярной карциномой (T<sub>a</sub>), или опухолью, инвазирующей субэпителиальную соединительную ткань (T<sub>1</sub>). Иммунотерапевтическое лечение подходит для лечения первичной карциномы мочевого пузыря и/или лечению рецидивирующей карциномы мочевого пузыря.

Иммунотерапевтическое средство вводят локально в очаг опухоли, т.е. в участок первичной опухоли перед хирургическим вмешательством или после хирургического вмешательства и, необязательно, после химиотерапии. В случае лечения уротелиальной карциномы мочевого пузыря, средство, предпочтительно, вводят посредством везикулярной инстилляцией в мочевой пузырь.

Иммунотерапевтическое средство вводят индивидууму, подлежащему лечению, в эффективной дозе. В случае человека, доза для введения может составлять приблизительно от 10<sup>6</sup> до 10<sup>10</sup> жизнеспособных единиц (КОЕ), например, приблизительно от 10<sup>7</sup> до 5×10<sup>9</sup> или от 10<sup>8</sup> до 3×10<sup>9</sup> жизнеспособных единиц. Предпочтительно, доза для введения составляет приблизительно 2×10<sup>9</sup> жизнеспособных единиц (КОЕ). Предпочтительно, иммунотерапевтическое средство вводят несколько раз, например, по меньшей мере, 3 раза или от по меньшей мере 5 до 30 раз, в частности, приблизительно 15 раз в заранее определенные моменты времени в течение лечения.

Иммунотерапевтическое средство, как правило, предоставляют в виде фармацевтического препарата, содержащего рекомбинантную клетку *Mycobacteria* в твердой форме, например, лиофилизованного или криоконсервированного препарата, восстанавливаемого с помощью подходящего жидкого носителя перед использованием. Альтернативно, препарат можно предоставлять в жидкой форме, например, в виде суспензии.

В одном из вариантов осуществления иммунотерапевтическое средство по изобретению вводят для лечения карциномы *in situ*. Стандартная схема может включать еженедельное введение средства в течение по меньшей мере 4, например, 4, 5, 6, 7 или 8

недель в качестве индукционной терапии. Индукционную терапию не следует начинать до 2-3 недель после первичного хирургического вмешательства на опухоли. После перерыв в лечении, например, 4 недели, введение можно продолжать с использованием поддерживающей терапии в течение по меньшей мере 6 месяцев или по меньшей мере 1 года.

В дополнительном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство вводят при индукционной терапии при профилактическом лечении рецидивирования опухоли. В этом варианте осуществления терапию можно начать через приблизительно 2-3 недели после биопсии очага опухоли и повторять, например, с недельными интервалами в течение по меньшей мере 4, например, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. В случае опухолей промежуточного и высокого риска после этого можно проводить поддерживающую терапию.

Поддерживающая терапия может включать длительную терапию, например, 6, 9 или 12 месяцев или более при лечении с месячными интервалами. Альтернативно, поддерживающая терапия может включать 2, 3 или 4 введения с недельными интервалами, в месяц 3, 6, 12, 18, 24, 30 и 36.

В конкретном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство, в частности, рекомбинантную БЦЖ  $\Delta Urec::Hly+$ , используют для лечения не-мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря у пациентов с рецидивированием после стандартной терапии БЦЖ. Иммунотерапевтическое средство вводят в мочевой пузырь по схеме, включая еженедельные инстилляции во время индукционной фазы с использованием, например, 6 еженедельных инстилляций, первой поддерживающей фазы после приблизительно 3 месяцев с использованием, например, 3 еженедельных инстилляций, второй поддерживающей фазы после приблизительно 6 месяцев с использованием, например, 3 инстилляций, и третьей поддерживающей фазы после приблизительно 12 месяцев с использованием, например, 3 инстилляций.

Введение в качестве иммунотерапевтического средства рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, как описано выше, можно комбинировать с дополнительной противоопухолевой терапией, например, лучевой терапией и/или химиотерапией. Кроме того, иммунотерапию, как описано выше, можно комбинировать с введением рекомбинантной клетки *Mycobacterium* не в очаг опухоли для обеспечения общей стимуляции иммунной системы. Это введение не в очаг можно осуществлять, как описано в WO 2012/085101, например, перед хирургическим вмешательством на первичной опухоли. В этом случае, средство предпочтительно вводят человеку в дозе приблизительно  $1-10 \times 10^5$ , предпочтительно - приблизительно  $2-8 \times 10^5$  клеток. Средство предпочтительно вводят в виде однократной дозы, например, посредством инъекции. Подкожная инъекция является предпочтительной. Кроме того, предпочтительно вводить средство без адьюванта.

Кроме того, изобретение более подробно описано с помощью следующих фигур и примеров 1 и 2.

Иммунотерапевтическое средство "rBCG", используемое в этих примерах, представляет собой рекомбинантную *M. bovis* (БЦЖ) Danish, подтип Prague, с инактивированной последовательностью ureC ( $\Delta$ Urec) и без функционального гена селективного маркера, экспрессирующую слитный белок Ag85B/Hly, как приведено в SEQ ID NO: 2 (Hly+).

**Пример 1. Открытое клиническое испытание фазы I/II для оценки безопасности и эффективности внутрипузырной инстилляцией рекомбинантной БЦЖ (rBCG) у пациентов-людей с рецидивирующим не-мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря после стандартной терапии БЦЖ**

### 1.1 Фаза I

Фазу I проводили для определения безопасности, переносимости и рекомендованной дозы внутрипузырных инстилляций rBCG для фазы II у пациентов с рецидивированием не-мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря после TURB и стандартной терапии БЦЖ.

### 1.2 Фаза II

Фазу II проводили для исследования эффективности, безопасности, переносимости и иммуногенности внутрипузырных инстилляций rBCG у пациентов с рецидивированием не-мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря после TURB при стандартной терапии БЦЖ.

### 1.3 Клинический протокол

rBCG вводили в мочевой пузырь за 15 еженедельных инстилляций (индукционная фаза: инстилляциии 1-6; поддерживающая фаза 3 месяца: инстилляциии 7-9; поддерживающая фаза 6 месяцев: инстилляциии 10-12, поддерживающая фаза 12 месяцев: инстилляциии 13-15).

Первичной конечной точкой фазы I являлась дозолимитирующая токсичность (DLT) внутрипузырных инстилляций rBCG у пациентов с рецидивированием после стандартной терапии БЦЖ при не-мышечно-инвазивном раке мочевого пузыря (NMIBC). Период DLT соответствует 3 инстилляциям с 1 неделей и охватывает острую токсичность, вызываемую лечением. Пациентов лечили в двух когортах из трех, следуя правилам дизайна 3+3 (правила снижения дозы: если у пациентов, которых лечат на уровне дозы 1, наблюдают признаки DLT, дозу инстиллируемой rBCG будут снижать до уровня -1, что в 10 раз ниже уровня 1).

Уровни дозы являлись следующими:

Уровень дозы 1:  $1-19,2 \times 10^8$  КОЕ rBCG

Уровень дозы -1:  $1-19,2 \times 10^7$  КОЕ rBCG

### 1.4 Выбор пациентов

#### 1.4.1 Критерии включения

- гистологически подтвержденный диагноз рецидивирующей NMIBC, включая повторную TURB, подтверждающую безопухоловое состояние мочевого пузыря; в случае пациенты с чисто CIS не требуется повторная TURB.

- Отрицательная цитология перед началом лечения, за исключением пациентов с сопутствующей CIS.

- Запланированное начало лечения составляет 2-6 недель после последней TURB.

- Один предшествующий цикл внутривезикулярной БЦЖ (индукционная фаза с использованием по меньшей мере 5 инстилляций ± поддерживающая фаза) не более чем за 5 лет до этого по причине NMIBC.

- Рецидивирующая NMIBC высокой степени по причине прогрессирования (баллы прогрессирования 7-23) с учетом системы балльной оценки Европейская организация по исследованию и лечению рака с неудачей терапии БЦЖ (Babjuk M, Eur Urol 2008, PMID 18468779), в случае чего показана радикальная цистэктомия или повторная индукционная терапия с использованием стандартной БЦЖ.

Это, в частности, включает пациентов с опухолями NMIBC высокой степени, присутствующими через 3 и 6 месяцев после начала предыдущего цикла терапии БЦЖ, и любым ухудшением заболевания во время лечения БЦЖ, таким как более высокое количество рецидивов, более высокая категория опухоли или более высокая степень, или возникновение CIS, включая опухоли низкой степени, несмотря на исходный ответ.

#### **1.4.2 Критерии исключения**

- Текущая или предшествующая уротелиальная карцинома (UC) мочевого пузыря  $\geq T2$ .

- Сопутствующая UC верхних мочевыводящих путей, предстательной железы или мочеиспускательного канала, мелкоклеточная карцинома мочевого пузыря, микропапиллярная уротелиальная карцинома, чистая плоскоклеточная карцинома мочевого пузыря, чистая аденокарцинома, лимфоваскулярная инвазия в образце TURB.

- Предшествующие или текущие признаки UC в дивертикуле мочевого пузыря.

- Признаки метастатического заболевания при (торако-) абдоминальное сканирование КТ при регистрации.

- Хирургическое вмешательство на мочевом пузыре, или травматическая катетеризация, или TURB в пределах 2 недель перед началом лечения.

- Введение системных цитотоксических средств за последние 3 года или повторное введение цитостатических/цитотоксических лекарственных средств посредством внутривезикулярных инстилляций после рецидивирования EUC после первой терапии БЦЖ (за последние 5 лет).

#### **1.5 Текущий статус**

Клиническая фаза I завершена. Фазу II проводили с использованием уровня дозы 1:1-19,2 $\times 10^8$  КОЕ rBCG.

Активное средство вводили в 50 мл раствора для лекарственного средства, содержащего декстран, глюкозу, 0,9% хлорида натрия, 0,025% Tween 80 и воду для инъекций.

Данные последующего наблюдения для рецидивирования по статусу мочевого пузыря всех оцениваемых пациентов фазы II через 3 года приведены в таблице 1. 20

пациентов испытывали подтвержденное явление и 1 пациент неподтвержденное явление. Десять пациентов оставались в живых и на последующем наблюдении для этой конечной точки.

Включено 40 пациентов, все с опухолями высокой степени, как определено выше. Показатель CIS являлся высоким (68%). Состояние без рецидивирования в мочевом пузыре (выживаемость без рецидивирования через 60 недель составляла 49,3%, а через три года - 43,7% с 95%-ным доверительным интервалом [26,9%, 59,4%], как показано на фиг. 1.

Лечение являлось безопасным и хорошо переносимым, при этом только 5% пациентов не могли переносить адекватную индукционную терапию. Не возникало дозолимитирующей токсичности, и не наблюдали нежелательные явления степени 3 или 4.

Общая выживаемость после медианы времени последующего наблюдения 2,9 лет показана на фиг. 2. До этого анализа умерло 7 пациентов, 9 пациентов было утрачено для последующего наблюдения, и 24 пациента оставались на последующем наблюдении. Только двум пациентам (8%) потребовалась цистэктомия. 4 пациентам потребовался переход на химиотерапию.

**Пример 2. Открытое клиническое испытание фазы I/II для оценки безопасности и эффективности внутрипузырной инстилляции рекомбинантной БЦЖ (rBCG) на пациентах-людях с рецидивирующим не-мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря после общепринятой терапии БЦЖ**

## **2.1 Пациенты и способы**

### **2.1.1 Дизайн исследования и участники**

Исследование планировали как многоцентровое, открытое, несравнительное, исследование фазы I/II и проводили его в соответствии с текущей версией Хельсинкской декларации, ICH-GCP и национальными юридическими и регуляторными требованиями. Письменное информированное согласие получали от всех пациентов перед включением.

Пригодные пациенты имели рецидивирующую NMIBC с промежуточным и высоким риском прогрессирования (баллы 7-23 по системе балльной оценки Европейской организации по исследованию и лечению рака) после общепринятой терапии БЦЖ.

Необходимым являлось персистирующее заболевание T1 или не-мышечно-инвазивные опухоли высокой степени, присутствующее через 3 и 6 месяцев после начала предыдущего цикла терапии БЦЖ, или любое ухудшение заболевания после лечения БЦЖ, такое как более высокое количество рецидивов, более высокая категория опухоли или более высокая степень или появление карциномы *in situ* (CIS), несмотря на исходный ответ (определение в соответствии с руководством EAU 2008). Предшествующую терапию определяли как один предшествующий цикл внутрипузырной БЦЖ (индукционная фаза  $\geq 5$  инстилляций  $\pm$  поддерживающая БЦЖ). Для включения обязательным являлся гистологически подтвержденный диагноз рецидивирующей NMIBC и повторная трансуретральная резекция мочевого пузыря (TURB), подтверждающая

безопухолевого состояние в соответствии с текущими патологическими руководствами. Для пациентов, имеющих CIS, рекомендована селективная цитология верхней части мочевыводящего тракта и биопсии предстательной части уретры. На начало исследуемого лечения промывочная цитология мочевого пузыря должна была быть отрицательной, за исключением пациентов с чистой или сопутствующей CIS и визуализацией без признаков метастатического заболевания.

Критериями исключения являлись уротелиальная карцинома мочевого пузыря стадии  $\geq T2$ , сопутствующая уротелиальная карцинома верхних мочевыводящих путей, непредстательной части уретры или признаки метастатического заболевания (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02371447>).

rBCG предоставляли в виде составленного лиофилизированного порошка  $1-19,2 \times 10^8$  КОЕ/флакон живых БЦЖ *Mycobacterium bovis*  $\Delta ureC::hly$  (SIPL, Serum Institute of India Private Limited, Pune, India) и восстанавливали в 50 мл 0,9% физиологического раствора для внутрипузырного введения. Пациентам приписывали стандартную схему лечения из 6 еженедельных внутрипузырных инстилляций с последующей поддерживающей терапией в течение 1 года (3 инстилляций через 3, 6 и 12 месяцев после первой инстилляции).

Первичную конечную точку фазы II определяли как безрецидивность (RFR) в мочевом пузыре через 60 недель после регистрации. В случае предполагаемого рецидивирования из-за положительной цитологии или визуального определения опухоли в мочевом пузыре при цистоскопии, были необходимы гистологические доказательства рецидивирования. Рецидивирование в мочевом пузыре, ассоциированное со злокачественным новообразованием в предстательной части уретры, или признаки злокачественного новообразования в верхней части мочевыводящих путей не считали рецидивированием в мочевом пузыре. Заранее определенные вторичные конечные точки включали время от регистрации в исследовании до рецидивирования в мочевом пузыре, время до прогрессирования, общую выживаемость (OS), АЕ, переносимость и QoL. Прогрессирование определяли как прогрессирование до мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря или прогрессирование до метастатического заболевания. OS вычисляли от времени регистрации до смерти по любой причине. Переносимость определяли как долю пациентов, завершивших пять инстилляций индукционной фазы в пределах 12 недель после начала лечения.

### 2.1.2 Статистические анализы

Для вычисления объема выборки авторы настоящего изобретения оценивали RFR из одного из нескольких проспективных, рандомизированных европейских испытаний, в которых сравнивали повторное воздействие БЦЖ по сравнению с гемцитабином. В этом испытании группа, которой вводили БЦЖ, имела оцениваемую RFR и выживаемость без прогрессирования через 60 недель после последней TURB 15% и 62,5%, соответственно. Использовали одностадийный дизайн с H0: RFR через 60 недель  $\leq 15\%$ ; и H1: RFR через 60 недель  $\geq 30\%$ . Для уровня значимости 10% и мощности 80% было необходимо 37

оцениваемых пациентов для фазы II с учетом оценки Каплана-Майера, оцениваемого через 60 недель после регистрации (пакет R, OptInterim). 6 пациентов из фазы I включали в фазу II. для учета неопениваемых пациентов размер выборки увеличивали до 39 пациентов.

## **2.2 Результаты**

### **2.2.1 Пациенты**

С сентября 2015 года до апреля 2018 года в испытание включали 42 пациентов. Всего открывали 16 центров и в 14 центрах активно набирали пациентов. Двух пациентов пришлось исключить из анализа эффективности из-за значительного нарушения критериев включения, но оставляли их для анализа безопасности/ИТТ. Сорок пациентов определяли как полную выборку для анализа (FAS), и выборка по протоколу (PP) состояла из 22 пациентов. Определения анализируемых выборок и подробные причины исключений показаны на фиг. 3.

Подробные характеристики опухолей первичных случаев NMIBC в когорте пациентов приведены в таблице 2, и подробные характеристики пациентов и опухолей FAS приведены в таблице 3. Медиана риска прогрессирования рецидивирующей NMIBC повышалась на 7 пунктов риска по сравнению с первичным возникновением. Химическое воздействие в анамнезе как фактор риска рака мочевого пузыря определяли у 3 пациентов, в то время как 21 пациент (52,5%) имел курение в анамнезе с медианой (диапазоном) 38 (4,0-99,0) пачко-лет. Сопутствующую или чистую CIS определяли у 27 (67,5%) пациентов. Четырнадцать пациентов (35%) подвергали поддерживающей терапии БЦЖ. Медиана баллов прогрессирования составляла 16 (7-20) для пациентов с предшествующей поддерживающей терапией БЦЖ и 16 (7-19) - без нее.

Все пациенты, включенные в испытание, начинали исследуемое лечение. Тридцати двух пациентов (80%) начинали подвергать поддерживающей терапии. Пятнадцать пациентов (37,5%) подвергали всем запланированным инстилляциям для индукционной и поддерживающей терапии. Подробные причины для прекращения лечения во время испытания показаны на фиг.3. Медиана последующего наблюдения на момент анализа составляла follow 74,4 (12,3-140,9) недель.

### **2.2.2 Первичная конечная точка**

После индукционной и поддерживающей терапии rBCG 49,3% [95% CI 32,1, 64,4] пациентов не имели признаков рецидивирования в мочевом пузыре через 60 недель после регистрации в исследовании. После медианы последующего наблюдения 2,9 лет RFR оставалась на уровне 47,4% [30,4%, 62,6%] и 43,7% [26,9%, 59,4%] через 2 и 3 года после регистрации в исследовании, соответственно. Медиана времени от регистрации в исследовании до рецидивирования в мочевом пузыре составляла 54,1 недель [95% CI, 38,4 недель] (фиг. 4). RFR в мочевом пузыре для выборок ИТТ и PP через 60 недель после регистрации составляла 48,0% [95% CI 31,1, 63,0] и 40,8% [95% CI 19,9, 60,9], соответственно. Если учитывать все потенциальные рецидивы, включая гистологически неподтвержденные, но клинически очевидные экстравезикулярные рецидивы в выборке

FAS, 60-недельная RFR достигала 47,6% [95% CI 30,8, 62,6]. Из пациентов с CIS (n=27) 15 (55,6%; 95% CI [35,3%,74,5%]) имели полный ответ (CR) через 12 недель после начала лечения. Медиана длительности ответа (DOR) для этих 15 пациентов составляла 1,1 лет (95% CI [0,4 лет - не достигнуто]). Дополнительные оценки подгрупп, относящиеся к первичной конечной точке, приведены в таблице 3.

### **2.2.3 Вторичные конечные точки**

Семь пациентов из FAS имели прогрессирующее заболевание (медиана времени до прогрессирования не достигнута). У трех пациентов наблюдали прогрессирование до мышечно-инвазивного заболевания, и 4 пациента прогрессировали с метастатическим заболеванием (регионарные лимфоузлы n=3, отдаленные метастазы n=1). Как обнаружено, ни один из пациентов с метастатическим заболеванием не имел сопутствующего мышечно-инвазивного заболевания в мочевом пузыре.

Последующее лечение для пациентов с рецидивированием после исследуемого лечения приведено в таблице 5. До анализа умерло 5 пациентов (2 от рака мочевого пузыря, 2 от других злокачественных новообразований, неизвестных при включении, и один от острого респираторного дистресс-синдрома, несвязанного с исследуемым лечением).

В совокупности, через 60 недель после регистрации в исследовании выживаемость без прогрессирования и OS составляли 76,3% [95% CI 56,4, 88,0] и 92,9% [95% CI 74,3, 98,2], соответственно.

### **2.2.4 Нежелательные явления и переносимость**

Связанные с лечением АЕ приведены в таблице 6. Основным АЕ степени 2 являлась инфекция мочеполовых путей распространенными уропатогенными бактериями у трети пациентов. Двух пациентов подвергали лечению антибиотиками в стационаре по причине инфекции мочеполового тракта.

Во время фазы лечения не возникало АЕ степени 4 или 5. Двух из 42 пациентов подвергали менее пяти инстилляциям, одного по причине индуцированной БЦЖ системной воспалительной реакции (БЦЖит) из-за травматической катетеризации и одного из-за отказа пациента (фиг. 3).

### **2.2.5 Тестирование PPD**

77,5% пациентов являлись PPD-отрицательными (PPD-) на начало лечения (таблица 2). Преобразование теста PPD после завершения терапии rBCG наблюдали только у 7 пациентов (от PPD- к PPD+: n=5; от PPD+ к PPD-: n=2). У пятнадцати пациентов (37,5%) не наблюдали преобразование из PPD- в PPD+. У этих пациентов RFR в мочевом пузыре составляла 62,9% (таблица 4).

### **2.2.6 Качество жизни**

Все 40 пациентов в FAS заполняли опросник QoL на исходном уровне; 32 из 33 (97%) пациентов, начавших поддерживающую терапию, завершали ее к началу поддерживающей терапии, и 32 из 40 (77,5%) завершали ее к концу лечения. Четырнадцать пациентов (45,2%) завершали оценку QoL после 15 инстилляций, как

требовалось по протоколу. Пациенты сообщали о высоких уровнях QoL по функциональным шкалам и низкой тяжести симптомов на исходном уровне. Сообщали о некотором нарушении в отношении мочевых симптомов, беспокойства о будущем и проблемах сексуального характера. Большинство из шкал QoL демонстрировали стабильные баллы от исходного уровня до начала поддерживающей терапии. Небольшие улучшения наблюдали в отношении эмоциональной сферы и мочевых симптомов. Беспокойство о будущем улучшалось (т.е. пациенты выражали меньше беспокойства) до клинически значимой степени. Почти половина (n=13, 49%) пациентов сообщала о клинически значимом улучшении в отношении эмоциональной сферы, в то время как приблизительно треть сообщала о клинически значимом ухудшении физического состояния (n=10, 30%), общего состояния здоровья/QoL (n=11, 33%) или усталости (n=10, 30%) в течение индукционной терапии. Не наблюдали значительных изменений от исходного уровня до конца лечения по любой из шкал QoL у пациентов, завершивших лечение по протоколу.

## **2.3 Обсуждение**

### **2.3.1 Анализ конечных точек**

Авторы настоящего изобретения выбирали выборку с высоким риском по рецидивированию и прогрессированию с предшествующим воздействием общепринятой БЦЖ для тестирования гBCG. Учитывая плохой исход повторного воздействия БЦЖ у этих пациентов с описанными 12 и 24 месяцами RFR 15% и 3%, соответственно, авторы настоящего изобретения считали плацебо-контролируемое испытание или сравнительное испытание с использованием общепринятой БЦЖ неэтичным. При 49,3% RFR в мочевом пузыре это несравнительное испытание четко соответствовало первичной конечной точке заранее определенной RFR >30% через 60 недель после регистрации в исследовании. Это также верно при расширении определения рецидивирования до экстравезикулярных рецидивов, включая гистологически неподтвержденные, клинически очевидные рецидивы в выборке FAS, выборке ITT и PP, а также если пациентов подвергали поддерживающей терапии БЦЖ или нет (таблица 3). При RFR 47,4% и 43,7% через 2 и 3 года ответ на лечение оставался стабильным, что свидетельствует о потенциально многообещающем длительном эффекте.

После начала этого испытания Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) опубликовало новое определение неудачи БЦЖ, и Международная группа по исследованию рака мочевого пузыря рекомендовала клинически значимую исходную долю полных ответов (в случае CIS) или выживаемость без рецидивирования (в случае папиллярных опухолей) по меньшей мере 30% через 12 месяцев для несравнительных испытаний у неответствующих на БЦЖ пациентов. В соответствии с определением FDA неудачи БЦЖ 16 пациентов (40,0%) классифицировали как имеющих неответствующее на БЦЖ заболевание. При использовании этих более строгих критериев 60-недельная RFR снижалась до 24,0% (таблица 3).

Дополнительный анализ подгрупп, относящийся к первичной конечной точке, показал, что статус курения, наличие CIS и предшествующая поддерживающая терапия БЦЖ возможно были ассоциированы с худшим исходом в этом испытании, что, однако, не являлось статистически значимым - результат снова был ограничен небольшим размером выборки (таблица 3).

Большинство пациентов с рецидивированием подвергали цистэктомии или другому локальному лечению, и 3 пациентов подвергали системной химиотерапии (таблица 4). Хотя пропущенное метастатическое заболевание при включении является потенциальным объяснением такого фатального развития, нельзя исключать, что метастатическое заболевание развилось после TUR и/или при исследуемой внутривезикулярной терапии. Примечательно, что ни у одного из пациентов с метастатическим заболеванием не обнаруживали сопутствующее мышечно-инвазивное заболевание в мочевом пузыре.

### **2.3.2 Нежелательные явления и переносимость**

Наиболее распространенным АЕ являлась мочеполовая инфекция (GU) распространенными бактериями, возникающая у трети пациентов. Потенциальным объяснением является то, i) что недопустимы смазочные средства, содержащие антисептики для инстилляций, и ii) что бессимптомных пациентов с положительным анализом мочи с помощью тест-полоски необходимо было подвергать лечению антибиотиками, если культура мочи являлась положительной. Важно, что инфекции GU не влияли значимо на QoL пациентов (не представлено). Не наблюдали АЕ степени 4 или 5, и переносимость (определяемая как пациенты, подвергнутые более чем 4 инстилляциям во время индукционной терапии) составляла 95,2%. Таким образом, лечение можно считать безопасным и хорошо переносимым.

### **2.3.3 Тестирование PPD**

Экспериментальные модели позволяют предполагать, что PPD+ состояние перед началом лечения или преобразование из состояния PPD- в PPD+ во время лечения может помочь прогнозировать ответ на терапию. В клинических испытаниях клинической корреляции теста PPD с исходом противоречили гетерогенные результаты, предшествующее воздействие микобактерий и разный подход к проведению и интерпретации самого теста. В настоящем испытании большинство пациентов (77,5%) имело отрицательный тест PPD перед началом лечения rBCG, хотя ранее они подвергались воздействию БЦЖ. Неожиданно, пациенты с отрицательным тестом PPD на момент включения демонстрировали 60-недельную RFR в мочевом пузыре 52,8%, и даже без преобразования из PPD- в PPD+, RFR в мочевом пузыре оставалась на уровне 62,9% (n=15; таблица 3), что свидетельствует о том, что в условиях отрицательного теста PPD и отсутствия преобразования невозможно предсказать исход лечения.

### **2.3.4 QoL**

Пациенты сообщали об общем стабильном QoL во время индукционного и поддерживающего лечения с небольшими улучшениями в эмоциональной сфере и беспокойства о будущем. Приблизительно 30% пациентов сообщали о клинически

значимых ухудшениях физического состояния, общего QoL или утомляемость во время индукционной терапии. Примечательно, что в случае пациентов, завершивших лечение по протоколу, не наблюдали значительных изменений по любой из шкал QoL. и снова, ограниченный размер выборки без сравнительной группы подчеркивает необходимость осторожной интерпретации этих результатов QoL.

Если благоприятное QoL и переносимость подтвердят в более крупных исследованиях, гBCG потенциально может снижать долю пациентов, непереносивших лечение БЦЖ, и можно будет комбинировать с другими средствами, такими как ингибиторы контрольных точек для повышения эффективности.

## 2.4 Выводы

Исследование достигло первичной конечной точки и показало отсутствие рецидивирования в мочевом пузыре после внутрипузырного лечения гBCG почти у половины пациентов после одного года. гBCG обладает многообещающей переносимостью, безопасностью и профилем QoL.

### Таблицы и подписи к чертежам

**Таблица 1.** Данные последующего наблюдения для статуса рецидивирования в мочевом пузыре всех оцениваемых пациентов фазы II через 3 года.

**Таблица 2.** Исходные характеристики опухоли при первом возникновении NMIBC (перед первым общепринятым лечением БЦЖ).

**Таблица 3.** Исходные характеристики пациентов и опухоли для FAS (полной выборки для анализа). ВОЗ: Всемирная организация здравоохранения. БЦЖ: бацилла Кальметта-Герена. CIS: Карцинома *in situ*. EORTC: Европейская организация по исследованию и лечению рака.

**Таблица 4.** Анализ эффективности в подгруппах в FAS, демонстрирующий выживаемость без рецидивирования в мочевом пузыре через 60 недель с 95% CI. CIS: Карцинома *in situ*. БЦЖ: бацилла Кальметта-Герена. FDA: Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств. PPD: очищенный белковый дериват.

**Таблица 5.** Лечение пациентов с рецидивированием и/или прогрессированием после исследуемого лечения. БЦЖ: бацилла Кальметта-Герена. Некоторых пациентов подвергали более чем одному лечению. Одного из 13 пациентов, подвергнутых цистэктомии, подвергали хирургическому вмешательству из-за хронической инфекции мочевого пузыря, а не рецидивирования злокачественного новообразования.

\*один из этих способов лечения осуществляли с учетом рецидивирования после 60 недель после регистрации.

**Таблица 6.** Ассоциированные с лечением нежелательные явления (АЕ) в фазу лечения. БЦЖ: бацилла Кальметта-Герена. GU: мочеполовой.

**Фигура 1.** График Каплана-Майера для времени до рецидивирования в мочевом пузыре после времени последующего наблюдения до 2,9 лет.

**Фигура 2.** Общая выживаемость после времени последующего наблюдения до 2,9 лет.

**Фигура 3.** Диаграмма CONSORT 2010 SAKK 06/14. БЦЖ: бацилла Кальметта-Герена. ИТТ: выборка пациентов, которым назначено лечение. FAS: полная выборка для анализа. РР: выборка по протоколу.

<sup>1</sup>Также включает 2 исключения FAS.

**Фигура 4:** График Каплана-Майера для времени до рецидивирования в мочевом пузыре для FAS (последующее наблюдение до 4 лет).

Таблица 1

	<b>Полная выборка для анализа (N=40)</b>
<b>Переменная</b>	<b>n</b>
Статус рецидивирования в мочевом пузыре	
. Рецидивирование в мочевом пузыре	20
. Рецидивирование в мочевом пузыре (неподтвержденное)	1
. Зацензурировано при последней оценке (живые)	10
. Зацензурировано при последней оценке (умершие)	1
. Зацензурировано при последней оценке (утрачены для последующего наблюдения)	4
. Зацензурировано в начале нового лечения	2
. Зацензурировано на дату цистэктомии	2

Таблица 2.

<b>Переменная</b>	<b>FAS n (%)</b>
<b>Т-классификация</b>	<b>18 (45,0)</b>
. T1	6 (15,0)
. T1/CIS	6 (15,0)
. Ta	5 (12,5)
. Ta/CIS	5 (12,5)
. CIS	
<b>Классификация ВОЗ 1973 года</b>	<b>5 (12,5)</b>
. Степень 2	34 (85,0)
. Степень 3	1 (2,5)
. Неизвестно	4 (10,0)
<b>Классификация ВОЗ 2004 года</b>	<b>35 (87,5)</b>
. Уротелиальная карцинома низкой степени	1 (2,5)

. уротелиальная карцинома высокой степени . Неизвестно	
<b>Баллы прогрессирования по EORTC</b> . 0 . 1-6 . 7-13 . 14-23 Медиана (мин, макс)	<b>1 (2,5)</b> <b>7 (17,5)</b> <b>26 (65,0)</b> <b>6 (15,0)</b> <b>9 (0,0 -18)</b>
<b>Рецидивирование по EORTC</b> . 1-4 . 5-9 Медиана (мин, макс)	<b>35 (87,5)</b> <b>5 (12,5)</b> <b>3 (1-7)</b>

Таблица 3.

<b>Переменная</b>	<b>FAS n (%)</b>
<b>Пол</b> . Женский . Мужской	<b>4 (10,0)</b> <b>36 (90,0)</b>
<b>Баллы общего состояния по шкале ВОЗ</b> . 0 . 1	<b>35 (87,5)</b> <b>5 (12,5)</b>
<b>Статус курения</b> . Курильщик в настоящее время . Бывший курильщик . Не курит . Недоступно	<b>10 (25,0)</b> <b>11 (27,5)</b> <b>18 (45,0)</b> <b>1 (2,5)</b>
<b>Поддерживающая терапия БЦЖ, осуществленная во время предшествующей терапии</b> . Нет . Да	<b>26 (65,0)</b> <b>14 (35,0)</b>

<b>Т-классификация по рецидивированию</b>	<b>7 (17,5)</b>
. T1	5 (12,5)
. T1/CIS	6 (15,0)
. Ta	5 (12,5)
. Ta/CIS	17 (42,5)
. CIS	
<b>Классификация рецидивирования ВОЗ 1973 года</b>	<b>3 (7,5)</b>
. Степень 2	37 (92,5)
. Степень 3	40 (100,0)
<b>Классификация рецидивирования ВОЗ 2004 года для включения в исследование</b>	
. Уротелиальная карцинома высокой степени	
<b>Баллы прогрессирования по EORTC</b>	<b>12 (30,0)</b>
. 7-13	28 (70,0)
. 14-23	16 (7, 20)
Медиана (мин, макс)	
<b>Баллы рецидивирования EORTC</b>	<b>4 (10,0)</b>
. 1-4	30 (75,0)
. 5-9	6 (15,0)
. 10-17	8 (4, 11)
Медиана (мин, макс)	
<b>Исходный тест PPD</b>	<b>31 (77,5%)</b>
. Без реакции	7 (17,5%)
. Положительный	2 (5,0%)
. Отсутствующий	

Таблица 4.

Курение	Нет (n=18)	Да/ранее (n=21)	p
Выживаемость без рецидивирования в мочевом пузыре через 60 недель в % [95% CI]	53,1 [27,8, 73,2]	45,5 [22,4, 66,1]	0,652
<b>CIS</b>	Нет (n=13)	Да (n=27)	p
Выживаемость без рецидивирования в мочевом	61,5 [30,8, 81,8]	42,4 [22,0, 61,5]	0,289

пузыре через 60 недель в % [95% CI]			
<b>Предшествующая поддерживающая терапия БЦЖ</b>	Нет (n=26)	Да (n=14)	p
Выживаемость без рецидивирования в мочевом пузыре через 60 недель в % [95% CI]	54,3 [32,9, 71,6]	38,4 [12,2, 64,6]	0,371
<b>Неотвечающие на БЦЖ (определение FDA)</b>	Нет (n=24)	Да (n=16)	p
Выживаемость без рецидивирования в мочевом пузыре через 60 недель в % [95% CI]	63,6% [40,3%, 79,9%]	24,0% [5,9%, 48,8%]	0,022
<b>Преобразование PPD</b>	Нет (n=15)	Из PPD- в PPD+ (n=5)	p
Выживаемость без рецидивирования в мочевом пузыре через 60 недель в % [95% CI]	62,9% [32,3%, 82,6%]	80,0% [20,4%, 96,9%]	0,505

Таблица 5.

Лечение	n (%)
Цистэктомия	13* (32,5)
БЦЖ (верхние отделы мочевыводящего тракта)	2 (5,0)
Системная химиотерапия	3 (7,5)
Внутрипузырная химиотерапия	6* (15,0)

Таблица 6.

АЕ	Степень 1 n (%)	Степень 2 n (%)	Степень 3 n (%)
Головокружение		1 (2,4)	

Желудочно-кишечные нарушения	2 (4,8)		
Утомляемость	2 (4,8)	3 (7,1)	
Жар	2 (4,8)	1 (2,4)	
Частота, неотложный позыв к мочеиспусканию	7 (16,7)	5 (11,9)	
Недомогание		1 (2,4)	
Индукцированная БЦЖ системная воспалительная реакция		1 (2,4)	
Простуда		1 (2,4)	
Инфекция GU		14 (33,3)	2 (4,8)
Повышенная аланинаминотрансфераза		1 (2,4)	
Невралгия		1 (2,4)	
Гематурия	2 (4,8)		
Макрогематурия	1 (2,4)		
Задержка мочи	1 (2,4)		
Обструкция мочевыводящих путей	1 (2,4)	1 (2,4)	
Боль в мочевыводящих путях	6 (14,3)	1 (2,4)	
Вагинальная боль		1 (2,4)	
Поражение кожи	3 (7,1)	2 (4,8)	
Тромбоэмболия		1 (2,4)	

Последовательности, приведенные как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, являются следующими:

**SEQ ID NO: 1:**

*Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен фаголизосомального уклонения (нуклеотиды 211-1722) и стоп-кодон (нуклеотиды 1879-1881)*

atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca  
gcggtctgtag tcctccggg cctggtgggg ctgcccggcg gagcggcaac cgcgggcgcg  
ttctcccggc cggggctgcc ggtcagtag ctgcagcttg caaagcaatc cgctgcaaat  
aaattgcact cagcaggaca aagcacgaaa gatgcatctg cattcaataa agaaaattca  
atttcatcca tggcaccacc agcatctccg cctgcaagtc ctaagacgcc aatcgaaaag  
aaacacgegg atgaaatcga taagtatata caaggattgg attacaataa aaacaatgta  
ttagtatacc acggagatgc agtgacaaat gtgccgcaa gaaaaggta caaagatgga  
aatgaatata ttgtgtgga gaaaaagaag aaatccatca atcaaaataa tgcagacatt  
caagttgtga atgcaatttc gagcctaacc tatccaggtg ctctcgtaaa agcgaattcg  
gaattagtag aaaatcaacc agatgftctc cctgtaaaac gtgattcatt aacctcagc  
attgatttgc caggtatgac taatcaagac aataaaatcg ttgtaaaaaa tgccactaaa

tcaaacgtta acaacgcagt aaatacatta gtggaaagat ggaatgaaaa atatgctcaa  
gcttatccaa atgtaagtgc aaaaattgat tatgatgacg aaatggctta cagtgaatca  
caattaattg cgaattttg tacagcattt aaagctgtaa ataatagctt gaatgtaaac  
ttcggcgcaa tcagtgaagg gaaaatgcaa gaagaagtca ttagtftaa acaaattfac  
tataacgtga atgttaatga acctacaaga cctccagat ttttcggcaa agctgttact  
aaagagcagt tgcaagcgtc tggagtgaat gcagaaaatc ctctgcata tatctcaagt  
gtggcgtatg gccgtcaagt ttaattgaaa ttatcaacta attccatag tactaaagta  
aaagetgctt ttgatgctgc cgtaagcggg aaatctgtct caggtgatgt agaactaaca  
aatacatca aaaattcttc cttcaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa  
gttcaaatca tcgacggcaa cctcggagac ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgctact  
tttaatcgag aaacaccagg agttcccatt gcttatacaa caaacttct aaaagacaat  
gaattagctg ttattaaaa caactcagaa tatattgaaa caactcaaa agcttataca  
gatggaaaaa ttaacatcga tcactcggg ggatacgtg ctcaattcaa catttcttg  
gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgtc aacataaaaa ctggagcgaa  
aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga  
aatattaatg tttacgctaa agaatgcact ggtttagctt gggaatggtg gagaacggta  
attgatgacc ggaacttacc acttgtgaaa aatagaaata tctccatctg gggcaccagc  
ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga  
agtcagggtg atcttaatcc attaattaat gaaatcagca aatcatttc agctgcagtt  
ctttctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcgta ggcgcggatc cggaattcga  
agcttatega tctcagcgtg g

**SEQ ID NO: 2:**

*Аминокислотная последовательность, кодируемая нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1*

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met Ile Gly Thr Ala Ala  
Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg  
Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser Ala  
Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala  
Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln  
Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro  
Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln  
Asn Asn Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val Lys Ala  
Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser  
Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn  
Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn  
Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly  
Thr Ala Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys Met  
Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser  
Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro  
Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser

Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu  
Thr Asn Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu Val Gln  
Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu  
Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys  
Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser  
Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu  
Ile Val Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser Ile Tyr  
Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp  
Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr  
Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala Leu Ala Tyr Gly Ser  
Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu  
Thr Ser Lys Leu Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met Ser Thr

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантная клетка *Mycobacterium*, имеющая дефицит уреазы, рекомбинантная клетка БЦЖ *M. bovis* штамма Danish, подтипа Prague, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения,

для применения в способе, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят в качестве иммунотерапевтического средства индивидууму, страдающему карциномой мочевого пузыря, в качестве терапии второй линии.

2. Рекомбинантная клетка *Mycobacterium* по п.1 для применения по п.1, имеющая дефицит уреазы, рекомбинантная клетка БЦЖ *M. bovis* штамма Danish, подтипа Prague, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, содержащий аминокислотную последовательность аминокислот от 41 до 51 в SEQ ID NO: 2, и

(b) домен фаголизосомального уклонения *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 аминокислотную последовательность, что и последовательность по (i), и

(iii) нуклеотидной последовательности, гибридизующейся в строгих условиях с последовательностью по (i) или (ii),

для применения в способе, где рекомбинантную клетку *Mycobacterium* вводят в качестве иммунотерапевтического средства человеку, страдающему карциномой мочевого пузыря, в качестве терапии второй линии.

3. Клетка по п.1 или 2 для применения по п.1 или 2, где рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты не содержит какой-либо функциональный селективный маркер.

4. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по п.1, 2 или 3, где человек страдает немышечно-инвазивной карциномой мочевого пузыря (NMIBC).

5. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по п.1, 2 или 4, где человек страдает рецидивирующей карциномой мочевого пузыря.

6. Клетка по п.1,2 или 3 для применения по любому из пп.1, 2 или 4-5, где человек имеет рецидивирование и/или прогрессирование после первого лечения карциномы мочевого пузыря.

7. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-6, где введение включает везикулярную инстилляцию в мочевой пузырь.

8. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-7 в лечении индивидуума, ранее подвергнутого по меньшей мере одной безуспешной терапии первой

линии карциномы мочевого пузыря.

9. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-8 в лечении индивидуума, ранее подвергнутого по меньшей мере одной безуспешной терапии первой линии карциномы мочевого пузыря, включающей иммунотерапию, в частности, иммунотерапию стандартной БЦЖ.

10. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-9 в лечении индивидуума ранее подвергнутого по меньшей мере одной безуспешной терапии первой линии карциномы мочевого пузыря, включающей цистэктомию, или другое локальное лечение, и/или системную химиотерапию.

11. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-10 в лечении индивидуума, ранее подвергнутого по меньшей мере одной безуспешной терапии первой линии карцинома мочевого пузыря, выбранной из группы химиотерапии на основе цисплатина, в частности, химиотерапии на основе цисплатина с последующим хирургическим вмешательством на мочевом пузыре и/или лучевой терапией, сопутствующей химиотерапии и стандартной БЦЖ.

12. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-11, где индивидуум является курильщиком.

13. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-12, где иммунотерапевтическое средство вводят в мочевой пузырь по схеме, включающей еженедельные инстилляции.

14. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-13, где иммунотерапевтическое средство вводят в мочевой пузырь по схеме, включающей еженедельные инстилляции во время (i) индукционной фазы, в частности, с 6 еженедельными инстилляциями, (ii) поддерживающей фазы в течение по меньшей мере одного года, в частности, первой поддерживающей фазы после приблизительно 3 месяцев, например, с 3 еженедельными инстилляциями, второй поддерживающей фазы после приблизительно 6 месяцев, например, с 3 инстилляциями и третьей поддерживающей фазы после приблизительно 12 месяцев, например, с 3 инстилляциями.

15. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-14, где иммунотерапевтическое средство вводят в дозе приблизительно от  $10^7$  до  $5 \times 10^9$  КОЕ, в частности, приблизительно  $2 \times 10^9$  КОЕ на введение.

16. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-15, где рецидивирование заболевания ингибируют в течение по меньшей мере 1 года, в частности, в течение по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет.

17. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-16, где иммунотерапия обеспечивает период без признаков заболевания в течение по меньшей мере 1 года, в частности, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет или по меньшей мере 4 лет для по меньшей мере 30% пациентов и, в частности, по меньшей мере 45% пациентов.

18. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-17, где рецидивирование заболевания блокируют на по меньшей мере один дополнительный год у индивидуума без рецидивирования заболевания в течение 2 лет после начала лечения.

19. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-18, где общую выживаемость повышают по сравнению с индивидуумом без лечения за по меньшей мере 1 год, в частности, по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года или по меньшей мере 4 года.

20. Клетка по п.1, 2 или 3 для применения по любому из пп.1 или 4-19, где потребность в цистэктомии уменьшают или устраняют, например, на по меньшей мере 1 год, в частности, по меньшей мере 2 года, по меньшей мере 3 года или по меньшей мере 4 года у по меньшей мере 30% пациентов и, в частности, по меньшей мере 45% пациентов.

21. Способ иммунотерапевтического лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря, у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в качестве терапии второй линии рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, имеющей дефицит уреазы, рекомбинантной клетки БЦЖ *M. bovis*, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

- (a) домен, способный вызывать иммунный ответ, и
- (b) домен фаголизосомального уклонения *Listeria*.

22. Способ иммунотерапевтического лечения карциномы мочевого пузыря, в частности, не-мышечно-инвазивной карциномы мочевого пузыря у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в качестве терапии второй линии рекомбинантной клетки *Mycobacterium*, имеющей дефицит уреазы, рекомбинантной клетки БЦЖ *M. bovis* штамма Danish, подтипа Prague, содержащей рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый полипептид, содержащий:

(a) домен, способный вызывать иммунный ответ, содержащий аминокислотную последовательность аминокислот от 41 до 51 в SEQ ID NO: 2, и

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

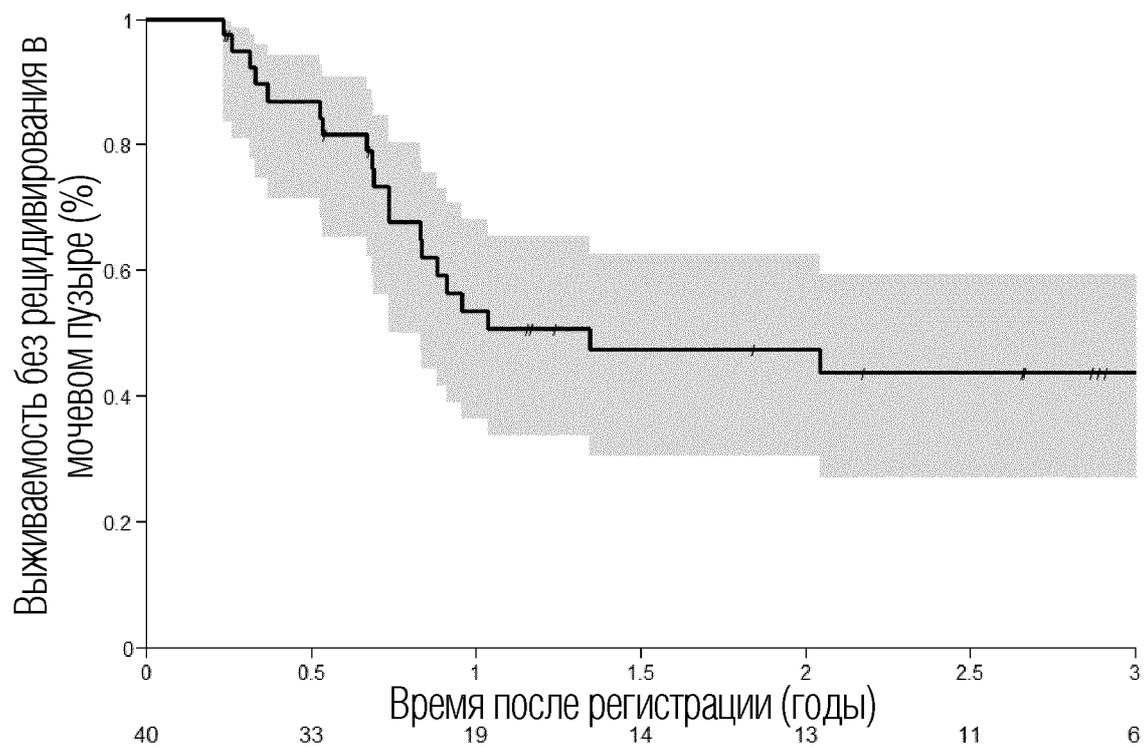
(i) нуклеотидной последовательности, содержащей нуклеотиды 211-1722, как приведено в SEQ ID NO: 1,

(ii) нуклеотидной последовательности, кодирующей ту же аминокислотную последовательность, что и последовательность по (i), и

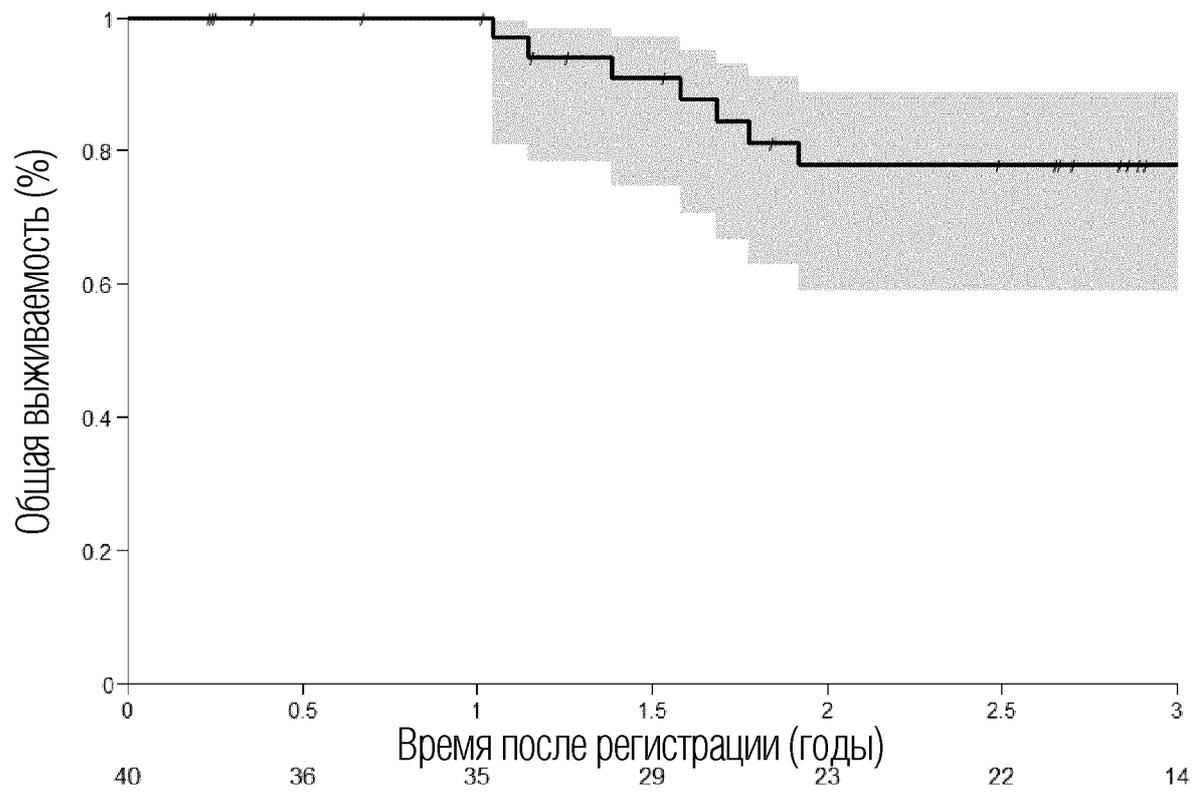
(iii) нуклеотидной последовательности, гибридизующейся в строгих условиях с последовательностью по (i) или (ii).

По доверенности

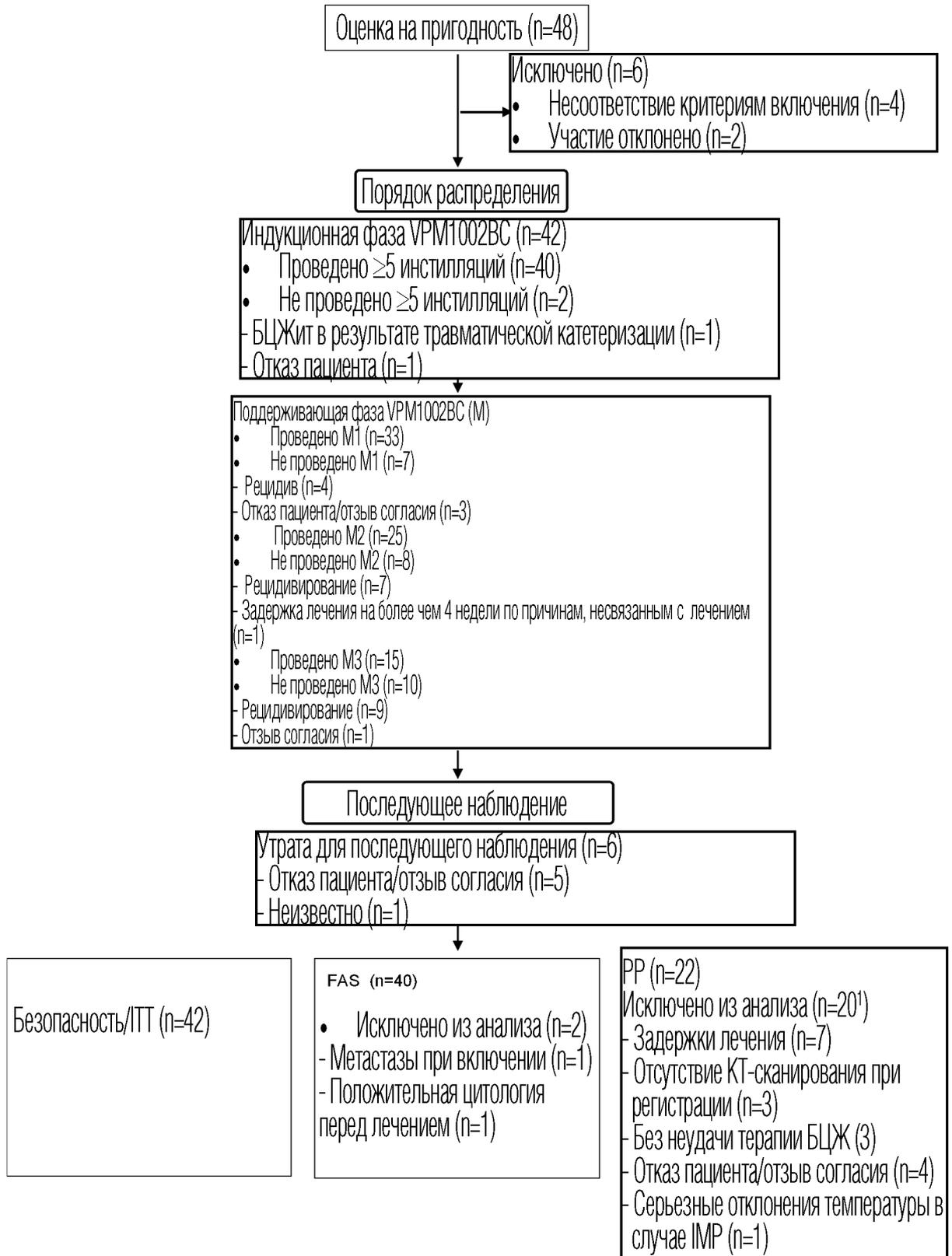
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4

