

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 724**

51 Int. Cl.:

A61P 13/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2016 PCT/EP2016/059872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177717**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2016 E 16724315 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3291831**

54 Título: **Micobacteria recombinante como agente inmunoterapéutico para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

04.05.2015 EP 15166206

23.12.2015 US 201562387407 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2021

73 Titular/es:

**VAKZINE PROJEKT MANAGEMENT GMBH
(100.0%)**

**Mellendorfer Strasse 9
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

GRODE, LEANDER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 845 724 T3

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

DESCRIPCIÓN

Micobacteria recombinante como agente inmunoterapéutico para el tratamiento de cáncer

- 5 La invención se refiere a una célula de Bacilo Calmette Guérin (BCG) *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) recombinante deficiente en ureasa para su uso como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de cáncer, en particular, en el tratamiento de tumores sólidos. Más particularmente, la invención se refiere a la inmunoterapia del carcinoma de vejiga.
- 10 El carcinoma de vejiga urotelial es el 5º cáncer más común. En los Estados Unidos, aproximadamente se diagnostican 75.000 nuevos casos cada año 4,5 % de todos los nuevos cánceres, y se esperan aproximadamente 15.600 muertes. En Alemania, se diagnostican aproximadamente 16.000 nuevos casos cada año. Debido a que una recurrencia de la enfermedad es probablemente en carcinoma de vejiga, los pacientes deben someterse a vigilancia durante un periodo prolongado.
- 15 La mayoría de los carcinomas de vejiga comienzan en las células epiteliales transicionales que componen el revestimiento interno de la vejiga. A medida que estos tumores crecen, pueden invadir el tejido conectivo circundante y el músculo. En enfermedad avanzada, los tumores se propagan más allá de la vejiga a ganglios linfáticos cercanos u órganos pélvicos o dan metástasis en órganos más distantes tales como pulmones, hígado y hueso.
- 20 La tasa de supervivencia de 5 años en total para el carcinoma de vejiga es del 77 % y esta tasa no ha cambiado significativamente durante los últimos 10 años. Cuando se considera por fases, las tasas de supervivencia relativas de 5 años para pacientes con tumores restringidos a la capa interna de la vejiga son del 96 % y 69 %, respectivamente. Las tasas caen al 34 % para aquellos con enfermedad que se ha propagado localmente más allá de la vejiga y al 6 %
- 25 con metástasis distante.
- Para pacientes con carcinoma de vejiga no músculo invasivo, el tratamiento normalmente implica una extirpación quirúrgica del tumor seguida de quimioterapia, normalmente mitomicina C, dentro de la vejiga (denominada quimioterapia intravesical). Después de que se recuperan de una cirugía, los pacientes con un riesgo menor de progresión de la enfermedad pueden someterse a vigilancia o quimioterapia intravesical adicional. Los pacientes con enfermedad en grado moderado a alto con frecuencia reciben inmunoterapia intravesical con una bacteria viva atenuada BCG. BCG fue la primera inmunoterapia aprobada por FDA y ayuda a reducir el riesgo de recurrencia del carcinoma de vejiga estimulando una respuesta inmunitaria que se dirige a la bacteria así como alguna célula del carcinoma de vejiga. En algunos pacientes, sin embargo, se ha encontrado que la terapia con BCG es menos eficaz,
- 30 en particular después de administración repetida.
- El tratamiento estándar para pacientes con carcinoma de vejiga no músculo invasivo incluye quimioterapia basada en cisplatino seguido de extirpación quirúrgica de la vejiga o terapia por radiación y quimioterapia concomitante. El carcinoma de vejiga recurrente se puede tratar con regímenes de terapia de combinación, entre los que se incluyen gemcitabina más cisplatino o metotrexato, vinblastina, doxorubicina más cisplatino.
- 40 En el tratamiento del carcinoma de vejiga, la recurrencia del tumor es una preocupación principal, incluso para pacientes con enfermedad de grado bajo y requiere seguimiento exhaustivo. Tratamientos mejores, tales como novedosas inmunoterapias, podrían reducir las tasas de recurrencia y mejorar la supervivencia de pacientes con carcinoma de vejiga.
- 45 Una cepa BCG recombinante que expresa un dominio de escape fagolisosomal se describe en el documento WO 99/10496. El dominio de escape fagolisosomal permite que la cepa escape del fagosoma de las células hospedadoras infectadas perforando la membrana del fagosoma. A fin de proporcionar un pH fagosomal ácido para la actividad de escape fagolisosomal óptimo, se desarrolló una cepa recombinante deficiente en ureasa. Esta cepa (cepa BCG Pasteur 1173P₃) se divulga en el documento WO 2004/094469.
- 50 El documento WO 2012/085101, divulga que una cepa BCG recombinante que expresa listeriolisina (Hly) que perfora la membrana de *Listeria monocytogenes* y desprovista de ureasa C induce protección superior frente al reto aerogénico con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) en comparación con BCG parental en un modelo preclínico. Asimismo, se muestra que tanto la cepa recombinante como la parenteral induce respuestas inmunitarias Th1 marcadas, mientras que solamente la cepa BCG recombinante suscita son además profunda respuesta Th17.
- 55 Grode et al. (*Vaccine*, 31(9), 1340-1348, 2013), Kupferschmidt (*Science* 334 (6062), 1488-1490, 2011) y Kaufmann et al. (*Expert Rev. Vaccines* 13 (5), 619-630, 2014) divulga la eficacia clínica y la seguridad de una vacuna BCG genéticamente modificada denominada VPM1002 (*Mycobacterium bovis* ΔureC::Hly⁺) como vacuna dirigida frente a tuberculosis.
- 60 Un extracto de internet recuperado de URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT02371447?V1=View#studyPageTop> (19.02.2015), titulado "VPM1002 BC in recurrent non-muscle invasive bladder cancer" se refiere a un protocolo de un ensayo clínico que evalúa la seguridad y la eficacia de la instilación intravesical de
- 65

VPM1002BC en pacientes con cáncer de vejiga no músculo invasivo recurrente (CVNMI) después de la resección transuretral de la vejiga y la terapia con BCG estándar. Sin embargo, no se describe la identidad/estructura exacta de VPM1002BC.

- 5 En el presente estudio, se encontró que una cepa BCG recombinante que expresa listeriolisina y deficiente en ureasa recombinante induce una respuesta inmunitaria superior en comparación con el BCG parental en un modelo animal.

Una materia objeto de la presente invención es una célula de BCG *M. bovis* de la cepa Danish subtipo Prague que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende:

- 10 (a) un dominio capaz de suscitar una respuesta inmunitaria que comprende la secuencia de aminoácidos desde el aa.41 hasta el aa.51 en la SEQ ID NO:2, y
 (b) un dominio de escape fagolisosomal de *Listeria* codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada de
 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 211-1722 como se muestra en la SEQ ID NO:1,
 15 (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de (i), y
 (iii) una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de (i) o (ii)
 para su uso en un sujeto humano como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de carcinoma de vejiga, en el que el tratamiento comprende la administración local del agente inmunoterapéutico por instilación vesicular en la vejiga urinaria, particularmente después de la cirugía.

20 Según la presente invención se encontró que la instilación vesicular de una célula de BCG recombinante en la vejiga de ratas sorprendentemente da como resultado una infiltración incrementada del tejido de vejiga urinaria por linfocitos, particularmente los linfocitos CD4 y CD8 positivos que dan como resultado una alta incidencia de la infiltración linfocítica focal y/o multifocal. A diferencia de esto, el tejido de la vejiga urinaria de los animales tratados con BCG
 25 estándar mostró linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). Asimismo, la administración de una célula de BCG recombinante no planteó ningún asunto de seguridad.

En la actualidad, se lleva a cabo un ensayo clínico en fase I/II que evalúa la seguridad y la eficacia de la instilación intravesical de BCG recombinante en pacientes humanos con carcinoma de vejiga no músculo invasivo recurrente
 30 después de la terapia con BCG estándar.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una célula de BCG *M. bovis* recombinante deficiente en ureasa de la cepa Danish subtipo Prague como se ha descrito anteriormente para su uso como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de tumores sólidos a fin de obtener infiltración linfocítica focal y/o multifocal, por ejemplo, con linfocitos
 35 T CD4 y CD8 en el sitio de administración. La célula de BCG *M. bovis* recombinante de la presente invención es particularmente adecuada para su uso en la medicina humana.

El agente inmunoterapéutico es una célula de BCG *M. bovis* recombinante viva que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende (a) un dominio capaz de suscitar una
 40 respuesta inmunitaria y (b) un dominio de escape fagolisosomal.

La célula de *Mycobacterium* es una célula de BCG *M. bovis* de la cepa Danish subtipo Prague (Brosch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (2007), 5396-5601). La célula de *Mycobacterium* es deficiente en ureasa recombinante. En una realización especialmente preferida la secuencia de ureC de la célula de *Mycobacterium* se inactiva (Δ Urec), por
 45 ejemplo, construyendo un vector suicida que contiene un gen ureC alterado por un gen marcador de selección, por ejemplo, el gen de higromicina, que transforma la célula diana con el vector y criba las células marcador de selección positivas que tienen un fenotipo ureasa negativo. En una realización incluso más preferida, el gen marcador de selección, es decir, el gen de higromicina, posteriormente se inactiva. En esta realización, la célula es una célula de *Mycobacterium* recombinante sin marcador de selección. Lo más preferentemente, la célula es la cepa BCG
 50 recombinante sin marcador de selección Danish subtipo Prague caracterizada como BCG recombinante Δ Urec::Hly+.

El dominio capaz de suscitar una respuesta inmunitaria se deriva del antígeno Ag85B de BCG *M. bovis* y comprende la secuencia de aminoácidos desde el aa.41 hasta el aa.51 en la SEQ ID NO:2.

55 La molécula de ácido nucleico recombinante además comprende un dominio de escape fagolisosomal, es decir, un dominio polipeptídico que prevé un escape del polipéptido de fusión desde el fagolisosoma dentro del citosol de las células mamíferas. El dominio de escape fagolisosomal es un dominio de escape fagolisosomal de *Listeria*, el cual se describe en el documento US 5.733.151, en el que el dominio de escape fagolisosomal es derivado del gen de listeriolisina (Hly) de *L. monocytogenes* y es codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada de: (a) una
 60 secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 211 - 1722 como se muestra en la SEQ ID NO:1, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de (a), y (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de (a) o (b).

Aparte de la secuencia de nucleótidos representada en la SEQ ID NO:1 la presente invención también comprende
 65 secuencias de ácido nucleico que hibridan con la misma. En la presente invención el término "hibridación" se usa como se define en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989),

1.101-1.104). De acuerdo con la presente invención el término "hibridación" se usa si todavía se puede observar una señal de hibridación positiva después de lavar durante una hora con 1 X SSC y SDS al 0,1 % a 55 °C, preferentemente a 62 °C y más preferentemente a 68 °C, en particular durante 1 hora en 0,2 X SSC y SDS al 0,1 % a 55 °C, preferentemente a 62 °C y más preferentemente a 68 °C. Una secuencia que hibrida con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO:1 bajo dichas condiciones de lavado es una secuencia de nucleótidos que codifican dominio de escape preferida por la invención objeto.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de escape fagolisosomal como se ha descrito anteriormente puede obtenerse directamente de un organismo *Listeria* o de cualquier fuente recombinante, por ejemplo, una célula de *E.coli* recombinante que contiene la correspondiente molécula de ácido nucleico de *Listeria* o una variante de la misma como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión contiene una secuencia codificante de péptido señal. Más preferentemente, la secuencia señal es una secuencia señal activa en Micobacterias, preferentemente en *M.bovis*, por ejemplo, una secuencia señal de *M.bovis* nativa. Un ejemplo preferido de una secuencia señal adecuada es la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal Ag85B que está representada en la SEQ ID NO:1 desde el nucleótido 1 al 120.

Asimismo, es preferido que se proporcione un enlazador peptídico entre el dominio inmunógeno y el dominio de escape fagolisosomal. Preferentemente, dicho enlazador peptídico tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos. Más preferentemente, una secuencia que codifica un enlazador como se muestra en la SEQ ID NO:1 desde el nucleótido 154 al 210 o una secuencia correspondiente al mismo respecto a la degeneración del código genético.

El ácido nucleico puede estar localizado sobre un vector recombinante. Preferentemente, el vector recombinante es un vector procariota, es decir, un vector que contiene elementos para la replicación o/y la integración genómica en células procariotas. Preferentemente, el vector recombinante porta la molécula de ácido nucleico de la presente invención ligada de manera operativa con una secuencia de control de la expresión. La secuencia de control de la expresión es preferentemente una secuencia de control de la expresión activa en Micobacterias, en particular en *M.bovis*. El vector puede ser un vector extracromosómico o un vector adecuado para la integración dentro del cromosoma. Ejemplos de dichos vectores son conocidos por los expertos en la materia y, por ejemplo, dados en Sambrook et al. supra.

El agente inmunoterapéutico de la presente invención es adecuado para el tratamiento del carcinoma de vejiga, por ejemplo, carcinoma de vejiga no invasivo, por ejemplo, carcinoma papilar no invasivo *in situ* (T_a), carcinoma no invasivo *in situ* (T_{cis}), tumor que invade el tejido conectivo subepitelial (T_1), tumor que invade el músculo superficial (mitad interior) (T_{2a}), tumor que invade el músculo profundo (mitad exterior) (T_{2b}), tumor que invade el tejido perivesical (T_3 que incluye T_{3a} y T_{3b}), tumor que invade la próstata, útero o vagina (T_{4a}), y tumor que invade la pared pélvica o abdominal (T_{4b}). Particularmente, el tumor es un tumor superficial o carcinoma *in situ* (T_{cis}), carcinoma papilar no invasivo (T_a), o un tumor que invade el tejido conectivo subepitelial (T_1). El tratamiento inmunoterapéutico es adecuado para el tratamiento de tumores primarios y/o para el tratamiento de tumores recurrentes.

El agente inmunoterapéutico se administra localmente al sitio del tumor, es decir, al sitio de un tumor primario antes de la cirugía o después de la cirugía y opcionalmente después de la quimioterapia. Para el tratamiento del carcinoma de vejiga urotelial, el agente preferentemente se administra por instilación vesicular en la vejiga urinaria. Para otros tumores, la administración puede implicar inyección local o, en caso de tumores de pulmón, administración pulmonar.

El agente inmunoterapéutico de la invención se puede administrar como una inmunoterapia de primera línea en pacientes, que no han sido tratados previamente con un agente inmunoterapéutico antitumoral tal como BCG estándar, o una inmunoterapia de seguimiento en pacientes que han sido tratados previamente con agente inmunoterapéutico antitumoral tal como BCG estándar. El agente inmunoterapéutico se puede administrar con un carcinoma de vejiga recién diagnosticado, o a pacientes, en particular pacientes con carcinoma de vejiga recurrente.

El agente inmunoterapéutico se administra al sujeto que se va a tratar en una dosis eficaz. Para un sujeto humano, la dosis para una administración puede ser de aproximadamente 10^6 a 10^{10} unidades viables (UFC), por ejemplo, aproximadamente 10^7 a 10^9 o 10^8 a 10^9 unidades viables. Preferentemente, el agente inmunoterapéutico se administra varias veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces hasta 30 veces, en particular aproximadamente 15 veces, en momentos predeterminados durante el tratamiento.

El agente inmunoterapéutico normalmente se proporciona como una preparación farmacéutica que comprende la célula de BCG *M. bovis* recombinante en forma sólida, por ejemplo, una preparación liofilizada o crioconservada, que se reconstituye con un vehículo líquido adecuado antes de su uso. Como alternativa, la preparación se puede proporcionar en forma líquida, por ejemplo, como una suspensión.

En una realización, el agente inmunoterapéutico de la invención se administra para el tratamiento de carcinoma *in situ*. Un calendario estándar puede comprender la administración semanal del agente durante al menos 4, por ejemplo, 4,

5, 6, 7 u 8 semanas como una terapia de inducción. La terapia de inducción no debería comenzar hasta 2-3 semanas después de la cirugía primaria del tumor. Después de un intervalo sin tratamiento de, por ejemplo, 4 semanas, la administración puede continuar usando terapia de mantenimiento durante al menos 6 meses o al menos 1 año.

5 En una realización adicional, el agente inmunoterapéutico se administra en una terapia de inducción en el tratamiento profiláctico de recurrencia del tumor. En esta realización, la terapia puede comenzar aproximadamente 2-3 semanas después de la biopsia del sitio tumoral y se repite, por ejemplo, a intervalos semanales durante al menos 4, por ejemplo, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. En tumores de riesgo intermedio y alto a esto le puede seguir terapia de mantenimiento.

10 La terapia de mantenimiento puede comprender terapia a largo plazo, por ejemplo, 6, 9 o 12 meses de terapia o incluso más con tratamientos en intervalos mensuales. Como alternativa, la terapia de mantenimiento puede comprender 2, 3 o 4 administraciones a intervalos semanales, en el mes 3, 6, 12, 18, 24, 30 y 36.

15 En una realización adicional más, el agente inmunoterapéutico, en particular BCG recombinante $\Delta Urec::Hly+$, se usa para el tratamiento de cáncer de vejiga no músculo invasivo en pacientes con recurrencia después de la terapia con BCG estándar. El agente inmunoterapéutico se administra dentro de la vejiga según un calendario que implica instilaciones semanales durante una fase de inducción con, por ejemplo, 6 instilaciones semanales, una primera fase de mantenimiento después de aproximadamente 3 meses con, por ejemplo, 3 instilaciones semanales, una segunda fase de mantenimiento después de aproximadamente 6 meses con, por ejemplo, 3 instilaciones y una tercera fase de
20 mantenimiento después de aproximadamente 12 meses con, por ejemplo, 3 instilaciones.

La administración como agente inmunoterapéutico de la célula de BCG *M. bovis* recombinante al sitio de un tumor sólido como se ha descrito anteriormente, se puede combinar con terapia antitumoral adicional, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia. Asimismo, la inmunoterapia como se ha descrito anteriormente, se puede combinar con una
25 administración no específica a sitio tumoral de la célula de BCG *M. bovis* recombinante a fin de proporcionar una estimulación general del sistema inmunitario. Esta administración no específica a sitio se puede efectuar como se ha descrito en el documento WO 2012/085101, por ejemplo, antes de la cirugía del tumor primario. En este caso, el agente preferentemente se administra a un sujeto humano en una dosis de aproximadamente $1-10 \times 10^5$, preferentemente aproximadamente $2-8 \times 10^5$ células. El agente se administra preferentemente como una única dosis,
30 por ejemplo, mediante inyección. Es preferido la inyección subcutánea. Además es preferido administrar el agente sin adyuvante.

Asimismo, la invención se describe más detalladamente por las siguientes Figuras y Ejemplos 1-3.

35 El agente inmunoterapéutico "rBCG" usado en estos ejemplos es *M. bovis* (BCG) Danish subtipo Prague recombinante con una secuencia de ureC inactivada ($\Delta Urec$) y sin gen marcador de selección funcional el cual expresa una proteína de fusión Ag85B/Hly como se muestra en la SEQ ID NO:2 (Hly+).

40 **Ejemplo 1 Estudio de toxicidad de dosis única de BCG recombinante (rBCG) en ratas después de la instilación intravesicular**

1.1 Desarrollo del estudio

Producto de ensayo	rBCG liofilizado (rBCG Danish subtipo Prague ΔUrec::Hly+ sin gen marcador de selección funcional)
Recuentos viables aproximados	5,41×10 ⁸ UFC/vial
Producto de referencia	BCG medac
Recuentos viables aproximados	2×10 ⁸ a 2×10 ⁹ UFC/vial
Especies de ensayo / Cepa / Reserva	Rata / CD® / CrI:CD(SD)
Criador	Charles River Laboratories, Research Models, and Services, Alemania GmbH Sandhofer Weg 7 97633 Sulzfeld, Alemania
Número y sexo de animales	23 animales hembras; 3 animales por grupo 1; 5 animales por grupos 2 a 5.
Pauta posológica	Grupo 1: Control (diluyente) Grupo 2: aproximadamente 2×10 ⁶ UFC de rBCG (liofilizadas)/animal Grupo 3: aproximadamente 2×10 ⁸ UFC de rBCG (liofilizadas)/animal Grupo 4: aproximadamente 2×10 ⁶ UFC de rBCG (congeladas sin crioprotector)/animal Grupo 5: aproximadamente 2×10 ⁶ UFC de rBCG medac/animal
Vía de administración	Instilación intravesical en la vejiga
Frecuencia de administración	Dosis única en el día 1 de ensayo.
Volumen de administración	500 µl/animal
Duración del estudio	• 12 días de adaptación • 4 semanas de ensayo en vivo • 28 días de incubación

1.2. Resultados

Mortalidad	Ninguno de los animales murió prematuramente.
Signos clínicos	No se observaron cambios de comportamiento, apariencia externa o condición de las heces para ningún animal en ningún tratamiento.
Peso corporal	El peso corporal de todos los animales de todos los grupos de dosis estuvo en el intervalo normal por todo el transcurso del estudio.
Consumo de comida y agua potable	La ingesta de comida de todos los animales de todos los grupos de dosis estuvo en el intervalo normal por todo el transcurso del estudio. La estimación visual del consumo de agua potable no reveló ninguna influencia relacionada con el producto de ensayo o de referencia.
Niveles de IL-2	Los niveles de IL-2 en orina y suero de todos los animales de todos los grupos estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación.
Hallazgos <i>post mortem</i> macroscópicos	No se notaron cambios relacionados con el producto de ensayo o de referencia.
Pesos de los órganos	No se notaron cambios relacionados con el producto de ensayo o de referencia.
Recuentos de UFC	<u>rBCG (grupos 2 a 4) frente a control (grupo 1)</u> No se notaron recuentos de UFC relacionados con el producto de ensayo para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados una vez con una instilación intravesical de 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas)/animal , o de 2x10⁶ UFC de rBCG (congeladas)/animal . En particular, no se notaron en absoluto recuentos de UFC para la vejiga urinaria cuatro semanas después de la instilación del producto de ensayo, que indica un aclaramiento rápido de las micobacterias administradas desde el sitio de instilación. No se notaron diferencias entre los animales tratados con 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas)/animal o con 2x10⁶ UFC de rBCG (congeladas)/animal y los animales de control.
	<u>BCG medac (grupo 5) frente a control (grupo 1)</u> No se notaron recuentos de UFC relacionados con el producto de referencia para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados una vez con una instilación intravesical de 2x10⁶ BCG medac/animal . En particular, no se notaron en absoluto recuentos de UFC para la vejiga urinaria cuatro semanas después de la instilación del producto de referencia, que indica un aclaramiento rápido de las micobacterias administradas desde el sitio de instilación. No se notaron diferencias entre los animales tratados con 2x10⁶ BCG medac/animal y los animales de control.
	<u>rBCG (grupos 2 a 4) frente a BCG medac (grupo 5)</u> No se notó diferencia en los recuentos de UFC para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados una vez con una instilación intravesical de 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas) /animal , o de 2x10⁶ UFC de rBCG (congeladas) /animal en comparación con el grupo de referencia tratado de la misma manera con 2x10⁶ UFC de BCG medac/animal .
Inmunohistoquímica	La inmunohistoquímica para la subtipificación del linfocito en el tejido de vejiga urinaria reveló la más alta incidencia de la infiltración linfocítica focal y multifocal con células CD4 y CD8 positivas en los grupos 2 y 3 tratados una vez con 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas) /animal por instilación intravesical, mientras que los animales de los grupos 1 (control), 4 y 5 expresaron linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). Casi todos los animales (12 de 13) de los grupos 1 (control), 4 y 5 expresaron linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). Por el contrario casi todos los animales (9 de 10) de los grupos 2 y 3 contenían linfocitos CD4 y CD8 positivos en infiltrados de linfocito focales o multifocales además de la infiltración difusa. Pocas veces se pudieron detectar granulocitos neutrofílicos en algunos portaobjetos examinados.

En conclusión, no se notaron signos de toxicidad para los animales tratados con el producto de ensayo, el producto de referencia o el diluyente. No hubo diferencias en la propagación sistémica de micobacterias en sangre y órganos entre **rBCG** y **BCG medac** para el tratamiento por instilación intravesical. No se notaron recuentos de UFC relacionados con el producto de ensayo para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados una vez con una instilación intravesical de **rBCG** en comparación con los animales de control. En particular, no se notaron en absoluto recuentos de UFC para la vejiga urinaria 4 semanas después de la instilación del producto de ensayo, que indica un aclaramiento rápido de las micobacterias administradas desde el sitio de instilación.

La inmunohistoquímica para la subtipificación del linfocito en el tejido de vejiga urinaria reveló la más alta incidencia de la infiltración linfocítica focal y multifocal con células CD4 y CD8 positivas en los grupos 2 y 3 tratados una vez con

2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG/animal por instilación intravesical, mientras que los animales de los grupos 1 (control), 4 y 5 expresaron linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). Casi todos los animales (12 de 13) de los grupos 1 (control), 4 y 5 expresaron linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). Por el contrario, casi todos los animales (9 de 10) de los grupos 2 y 3 contenían linfocitos CD4 y CD8 positivos en infiltrados de linfocito focales o multifocales además de la infiltración difusa. La Figura 1A muestra la infiltración linfocítica focal o multifocal después de la administración de rBCG. La Figura 1B muestra únicamente la infiltración difusa y singular después de la administración de BCG medac (aumento 200x).

10 Ejemplo 2 Estudio de toxicidad de dosis repetida de BCG recombinante (rBCG) en ratas después de la instilación intravesicular

2.1 Desarrollo del estudio

Producto de ensayo	rBCG liofilizado (rBCG Danish subtipo Prague ΔUrec::Hly+ sin gen marcador de selección funcional)
Recuentos viables aproximados	5,41×10 ⁸ UFC/vial
Producto de referencia	BCG medac
Recuentos viables aproximados	2×10 ⁸ a 2×10 ⁹ UFC/vial
Especies de ensayo / Cepa / Reserva	Rata / CD®/ Crl:CD(SD)
Criador	Charles River Laboratories, Research Models, and Services, Alemania GmbH Sandhofer Weg 7 97633 Sulzfeld, Alemania
Número y sexo de animales	23 animales hembras; 3 animales por grupo 1; 5 animales por grupos 2 a 5.
Pauta posológica	Grupo 1: Control (diluyente) Grupo 2: aproximadamente 2×10 ⁶ UFC de rBCG (liofilizadas)/animal Grupo 3: aproximadamente 2×10 ⁸ UFC de rBCG (liofilizadas)/animal Grupo 4: aproximadamente 2×10 ⁶ UFC de rBCG (congeladas sin crioprotector)/animal Grupo 5: aproximadamente 2×10 ⁶ UFC de rBCG medac/animal
Vía de administración	Instilación intravesical en la vejiga
Frecuencia de administración	Administración repetida; una vez a la semana en los días de ensayo 1, 8, 15, 22, 29, y 36.
Volumen de administración	500 µl/animal
Duración del estudio	• 21 días de adaptación • 9 semanas de ensayo en vivo • 28 días de incubación

2.2. Resultados

Mortalidad	Ninguno de los animales murió prematuramente.
Signos clínicos	No se observaron cambios de comportamiento, apariencia externa o condición de las heces para ningún animal en ningún tratamiento.

Peso corporal	El peso corporal de todos los animales de todos los grupos de dosis estuvo en el intervalo normal por todo el transcurso del estudio.
Consumo de comida y agua potable	La ingesta de comida de todos los animales de todos los grupos de dosis estuvo en el intervalo normal por todo el transcurso del estudio. La estimación visual del consumo de agua potable no reveló ninguna influencia relacionada con el producto de ensayo o de referencia.
Niveles de IL-2	Los niveles de IL-2 en orina y suero de todos los animales de todos los grupos estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación.
Hipersensibilidad de tipo retardada (ensayo HTR)	No se notó hipersensibilidad de tipo retardada.
Hallazgos <i>post mortem</i> macroscópicos	No se notaron cambios relacionados con el producto de ensayo o de referencia.
Pesos de los órganos	No se notaron cambios relacionados con el producto de ensayo o de referencia.
Recuentos de UFC	<u>rBCG (grupos 2 a 4)</u> <u>frente a control (grupo 1)</u> No se notaron recuentos de UFC relacionados con el producto de ensayo para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados seis veces con una instilación intravesical de 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas)/animal , o de 2x10⁶ UFC de rBCG (congeladas/sin crioprotector)/animal . En particular, no se notaron en absoluto recuentos de UFC para la vejiga urinaria cuatro semanas después de la última instilación del producto de ensayo, que indica un aclaramiento rápido de las micobacterias administradas desde el sitio de instilación. No se notaron diferencias entre los animales tratados con 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas)/animal o con 2x10⁶ UFC de rBCG (congeladas)/animal y los animales de control. <u>BCG medac (grupo 5) frente a control (grupo 1)</u> No se notaron recuentos de UFC relacionados con el producto de referencia para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados seis veces con una instilación intravesical de 2x10⁶ BCG medac/animal . En particular, no se notaron en absoluto recuentos de UFC para la vejiga urinaria cuatro semanas después de la última instilación del producto de referencia, que indica un aclaramiento rápido de las micobacterias administradas desde el sitio de instilación. No se notaron diferencias entre los animales tratados con 2x10⁶ BCG medac/animal y los animales de control. <u>rBCG (grupos 2 a 4)</u> <u>frente a BCG medac (grupo 5)</u> No se notó diferencia en los recuentos de UFC para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados seis veces con una instilación intravesical de 2x10⁶ o 2x10⁸ UFC de rBCG (líoofilizadas)/animal , o de 2x10⁶ UFC de rBCG (congeladas)/animal en comparación con el grupo de referencia tratado de la misma manera con 2x10⁶ UFC de BCG medac/animal .
Inmunohistoquímica	La inmunohistoquímica para la subtipificación del linfocito en el tejido de vejiga urinaria reveló la más alta incidencia de la infiltración linfocítica multifocal con células CD4 y CD8 positivas en el grupo 2 tratado con 2x10⁶ UFC de rBCG/animal por 6 instilaciones intravesicales, seguido del grupo 3 tratado con 2x10⁸ UFC de rBCG/animal por 6 instilaciones intravesicales, mientras que los animales de los grupos 1 (control), 4 y 5 expresaron linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). Pocas veces se pudieron detectar granulocitos neutrofilicos en algunos portaobjetos examinados.

En conclusión, no se notaron signos de toxicidad para los animales tratados con el producto de ensayo, el producto de referencia o el diluyente. No hubo diferencias en la propagación sistémica de micobacterias en sangre y órganos entre **rBCG** y **BCG medac** para el tratamiento por instilación intravesical. No se notaron recuentos de UFC relacionados con el producto de ensayo para los órganos examinados y la sangre de los animales tratados seis veces con una instilación intravesical de **rBCG** en comparación con los animales de control. En particular, no se notaron en absoluto recuentos de UFC para la vejiga urinaria 4 semanas después de la última instilación del producto de ensayo, que indica un aclaramiento rápido de las micobacterias administradas desde el sitio de instilación.

- 5 La inmunohistoquímica para la subtipificación del linfocito en el tejido de vejiga urinaria reveló la más alta incidencia de la infiltración linfocítica multifocal con células CD4 y CD8 positivas en el grupo 2 tratado con **2x10⁶ UFC de**

rBCG/animal por 6 instilaciones intravesicales, seguido del grupo 3 tratado con **2x10⁸ UFC de rBCG/animal** por 6 instilaciones intravesicales, mientras que los animales de los grupos 1 (control), 4 y 5 expresaron linfocitos CD4 y CD8 positivos únicamente como niveles de infiltrado de célula individual (infiltración difusa). La Figura 2A muestra la infiltración linfocítica focal o multifocal después de la administración de rBCG. La Figura 2B muestra únicamente la infiltración difusa y singular después de la administración de BCG medac (aumento 200x).

Ejemplo 3 Ensayo clínico abierto en fase I/II que evalúa la seguridad y la eficacia de la instilación intravesical de BCG (rBCG) recombinante en pacientes humanos con cáncer de vejiga no músculo invasivo recurrente después de la terapia con BCG estándar

3.1 Protocolo clínico

El BCG recombinante (como se ha definido anteriormente) actualmente se aplica en clínicas como parte de un ensayo clínico en Fase I/II mediante instilación dentro de la vejiga. El ensayo clínico en fase I/II se dirige a la evaluación de la seguridad y la eficacia de la instilación intravesical de rBCG en pacientes humanos con cáncer de vejiga no músculo invasivo recurrente después de terapia con BCG estándar. rBCG se administra dentro de la vejiga en 15 instilaciones semanales (fase de inducción: instilación 1-6, mantenimiento 3 meses: instilación 7-9, mantenimiento 6 meses: instilación 10-12, mantenimiento 12 meses: instilación 13-15).

El criterio de evaluación principal de la fase I es la toxicidad limitante de la dosis (TLD) de instilaciones de rBCG intravesicales en pacientes con recurrencia después de terapia con BCG estándar en cáncer de vejiga no músculo invasivo. El periodo de TLD corresponde a 3 instilaciones más 1 semana y cubre toxicidades agudas inducidas por el tratamiento. Los pacientes se tratan en dos cohortes de tres, siguiendo las reglas de un diseño 3 + 3 (reglas de reducción gradual de la dosis: si los pacientes tratados a nivel de dosis 1 muestran signos de TLD, la dosis de rBCG instilado se reducirá a nivel -1, que es 10 veces menor que el nivel 1).

Los niveles de dosis son los siguientes:

- Nivel de dosis 1: 1 - 19,2 x 10⁸ UFC de rBCG
- Nivel de dosis -1: 1 - 19,2 x 10⁷ UFC de rBCG

3.2 Estados actuales

El ensayo clínico actualmente está reclutando pacientes en sitios de ensayo en Suiza (Basel, Ginebra, Chur, Bern, Bellinzona, St. Gallen) dentro del marco de la Fase I.

El periodo de TLD para los primeros tres pacientes (cohorte 1) se completaron el 23 de Febrero de 2016. Los datos de seguridad, entre los que se incluyen los datos de TLD, de esta cohorte han sido recogidos por el patrocinador y administrados al "Independent Safety Data Committee" (ISDC). Puesto que no se han observado TLD, se permitió que los siguientes tres pacientes (segunda cohorte) se inscribieran simultáneamente y la dosis de BCG recombinante se mantuvo a nivel de dosis 1. Se recibió una aprobación del ISDC y el patrocinador informó sobre esto a todos los pacientes implicados en el ensayo el 9 de marzo de 2016. Además, no se ha observado recurrencia del tumor en esta cohorte de pacientes en el momento de la evaluación.

Actualmente está en curso el reclutamiento de la segunda cohorte, con el primer paciente ya inscrito en esta cohorte.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vakzine Projekt Management GmbH

<120> Micobacteria recombinante como agente inmunoterapéutico para el tratamiento de cáncer.

<130> 60182P EP

<160> 2

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1881

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..1881

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="molécula de ácido nucleico recombinante" /organismo="Secuencia artificial"

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..1881

<223> /mol_tipo="ADN" /nota="CDS que comprende un dominio fagolisosomal (211-1722nt) y un codón de parada (1879-1881)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 1

10

atgacagacg	tgagccgaaa	gattcgagct	tggggacgcc	gattgatgat	cggcacggca	60
gcggctgtag	tccttccggg	cctggtgggg	cttgccggcg	gagcggcaac	cgcgggcgcg	120
ttctcccggc	cggggctgcc	ggtcgagtac	ctgcagtctg	caaagcaatc	cgctgcaa	180
aaattgcact	cagcaggaca	aagcacgaaa	gatgcatctg	cattcaataa	agaaaattca	240
atttcatcca	tggcaccacc	agcatctccg	cctgcaagtc	ctaagacgcc	aatcgaaaag	300
aaacacgcgg	atgaaatcga	taagtatata	caaggattgg	attacaataa	aaacaatgta	360
ttagtatacc	acggagatgc	agtgacaaat	gtgccgccaa	gaaaaggtta	caaagatgga	420
aatgaatata	ttgttgtgga	gaaaaagaag	aaatccatca	atcaaaataa	tgacagacatt	480
caagtttgtga	atgcaatttc	gagcctaacc	tatccaggtg	ctctcgtaaa	agcgaattcg	540
gaattagtag	aaaatcaacc	agatgttctc	cctgtaaaac	gtgattcatt	aacactcagc	600
attgatttgc	caggtatgac	taatcaagac	aataaaatcg	ttgtaaaaaa	tgccactaaa	660
tcaaacgtta	acaacgcagt	aaatacatta	gtggaaagat	ggaatgaaaa	atatgctcaa	720
gcttatccaa	atgtaagtgc	aaaaattgat	tatgatgacg	aaatggctta	cagtgaatca	780
caattaattg	cgaaatttgg	tacagcattt	aaagctgtaa	ataatagctt	gaatgtaaac	840
ttcggcgcaa	tcagtgaagg	gaaaatgcaa	gaagaagtca	ttagttttta	acaaatttac	900

tataacgtga atgttaatga acctacaaga ccttccagat ttttcggcaa agctgttact 960
aaagagcagt tgcaagcgct tggagtgaat gcagaaaatc ctctgcata tatctcaagt 1020
gtggcgatg gccgtcaagt ttatttgaaa ttatcaacta attcccatag tactaaagta 1080
aaagctgctt ttgatgctgc cgtaagcgga aaatctgtct caggtgatgt agaactaaca 1140
aatatcatca aaaattcttc cttcaaagcc gtaatttacg gaggttccgc aaaagatgaa 1200
gttcaaatca tcgacggcaa cctcggagac ttacgcgata ttttgaaaaa aggcgcgtact 1260
tttaatcgag aaacaccagg agttcccatt gcttatacaa caaacttcct aaaagacaat 1320
gaattagctg ttattaaaaa caactcagaa tatattgaaa caacttcaaa agcttataca 1380
gatggaaaaa ttaacatcga tcaactctgga ggatacgttg ctcaattcaa catttcttgg 1440
gatgaagtaa attatgatcc tgaaggtaac gaaattgttc aacataaaaa ctggagcgaa 1500
aacaataaaa gcaagctagc tcatttcaca tcgtccatct atttgccagg taacgcgaga 1560
aatattaatg tttacgctaa agaatgcact ggttttagctt gggaatgggtg gagaacggta 1620
attgatgacc ggaacttacc acttgtgaaa aatagaaata tctccatctg gggcaccacg 1680
ctttatccga aatatagtaa taaagtagat aatccaatcg aatatgcatt agcctatgga 1740
agtcagggtg atcttaatcc attaattaat gaaatcagca aaatcatttc agctgcagtt 1800
ctttcctctt taacatcgaa gctacctgca gagttcggtta ggcgcggtac cggaattcga 1860
agcttatcga tgtcgacgta g 1881

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..626

<223> /mol_tipo="proteína" /nota="CORRESPONDIENTE SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA SEQ ID NO: 1" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 2

Met	Thr	Asp	Val	Ser	Arg	Lys	Ile	Arg	Ala	Trp	Gly	Arg	Arg	Leu	Met
1				5					10					15	
Ile	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Ala
			20					25					30		
Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Phe	Ser	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Val
		35				40					45				
Glu	Tyr	Leu	Gln	Ser	Ala	Lys	Gln	Ser	Ala	Ala	Asn	Lys	Leu	His	Ser
	50					55					60				
Ala	Gly	Gln	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Ser	Ala	Phe	Asn	Lys	Glu	Asn	Ser
65					70					75				80	
Ile	Ser	Ser	Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Lys	Thr
			85					90						95	
Pro	Ile	Glu	Lys	Lys	His	Ala	Asp	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ile	Gln	Gly
			100					105						110	

Leu	Asp	Tyr	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Leu	Val	Tyr	His	Gly	Asp	Ala	Val
		115					120					125			
Thr	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asn	Glu	Tyr	Ile
		130					135					140			
Val	Val	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ile	Asn	Gln	Asn	Asn	Ala	Asp	Ile
145						150				155					160
Gln	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Leu	Val
				165					170					175	
Lys	Ala	Asn	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Pro	Val
				180					185				190		
Lys	Arg	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly	Met	Thr	Asn
		195					200					205			
Gln	Asp	Asn	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Asn	Ala	Thr	Lys	Ser	Asn	Val	Asn
		210					215				220				
Asn	Ala	Val	Asn	Thr	Leu	Val	Glu	Arg	Trp	Asn	Glu	Lys	Tyr	Ala	Gln
225						230				235					240
Ala	Tyr	Pro	Asn	Val	Ser	Ala	Lys	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Glu	Met	Ala
				245					250					255	
Tyr	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Ile	Ala	Lys	Phe	Gly	Thr	Ala	Phe	Lys	Ala
				260					265				270		
Val	Asn	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Glu	Gly	Lys
		275						280				285			
Met	Gln	Glu	Glu	Val	Ile	Ser	Phe	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Val	Asn
		290					295				300				
Val	Asn	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Lys	Ala	Val	Thr
305						310				315					320
Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Asn	Pro	Pro	Ala
				325						330				335	
Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser
				340					345				350		
Thr	Asn	Ser	His	Ser	Thr	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Val
		355						360				365			
Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Ile	Lys
		370					375				380				
Asn	Ser	Ser	Phe	Lys	Ala	Val	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ala	Lys	Asp	Glu
385						390				395					400
Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Gly	Asn	Leu	Gly	Asp	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Lys
				405						410				415	
Lys	Gly	Ala	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Thr	Pro	Gly	Val	Pro	Ile	Ala	Tyr
			420						425				430		
Thr	Thr	Asn	Phe	Leu	Lys	Asp	Asn	Glu	Leu	Ala	Val	Ile	Lys	Asn	Asn
		435						440				445			
Ser	Glu	Tyr	Ile	Glu	Thr	Thr	Ser	Lys	Ala	Tyr	Thr	Asp	Gly	Lys	Ile
		450					455				460				
Asn															

610
Ser Thr
625

615

620

REIVINDICACIONES

1. Una célula de BCG *Mycobacterium bovis* recombinante deficiente en ureasa de la cepa Danish subtipo Prague que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión que comprende:
 - (a) un dominio capaz de suscitar una respuesta inmunitaria que comprende la secuencia de aminoácidos desde el aa.41 hasta el aa.51 en la SEQ ID NO:2, y
 - (b) un dominio de escape fagolisosomal de *Listeria* codificado por una molécula de ácido nucleico seleccionada de
 - (i) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 211-1722 como se muestra en la SEQ ID NO:1,
 - (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de (i), y
 - (iii) una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de (i) o (ii)
 para su uso en un sujeto humano como agente inmunoterapéutico en el tratamiento de carcinoma de vejiga, en el que el tratamiento comprende la administración local del agente inmunoterapéutico por instilación vesicular en la vejiga urinaria, particularmente después de la cirugía.
2. La célula para su uso de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico recombinante no comprende ningún marcador de selección funcional.
3. La célula para su uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el carcinoma de vejiga es carcinoma de vejiga no invasivo, en particular carcinoma *in situ* (T_{cis}), carcinoma papilar no invasivo (T_a), o un tumor que invade el tejido conectivo subepitelial (T₁).
4. La célula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el tratamiento de pacientes con carcinoma de vejiga recién diagnosticado o recurrente que no han sido previamente tratados con BCG estándar.
5. La célula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el tratamiento de pacientes con carcinoma de vejiga recurrente que han sido previamente tratados con BCG estándar.
6. La célula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el agente inmunoterapéutico se administra dentro de la vejiga según un calendario que implica instilaciones semanales durante (i) una fase de inducción con, por ejemplo, 6 instilaciones semanales, una primera fase de mantenimiento después de aproximadamente 3 meses con, por ejemplo, 3 instilaciones semanales, una segunda fase de mantenimiento después de aproximadamente 6 meses con, por ejemplo, 3 instilaciones y una tercera fase de mantenimiento después de aproximadamente 12 meses con, por ejemplo, 3 instilaciones.
7. La célula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el agente inmunoterapéutico, se usa a una dosis de aproximadamente 10⁶ a 10¹⁰ UFC por administración.
8. La célula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la inmunoterapia se combina con una administración no específica a sitio tumoral de la célula de *Mycobacterium bovis* recombinante.
9. La célula para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para obtener infiltración linfocítica focal y/o multifocal en el sitio de administración, en particular para obtener infiltración de tejido focal y/o multifocal con linfocitos T CD4 y CD8.

Figura 1 A/B

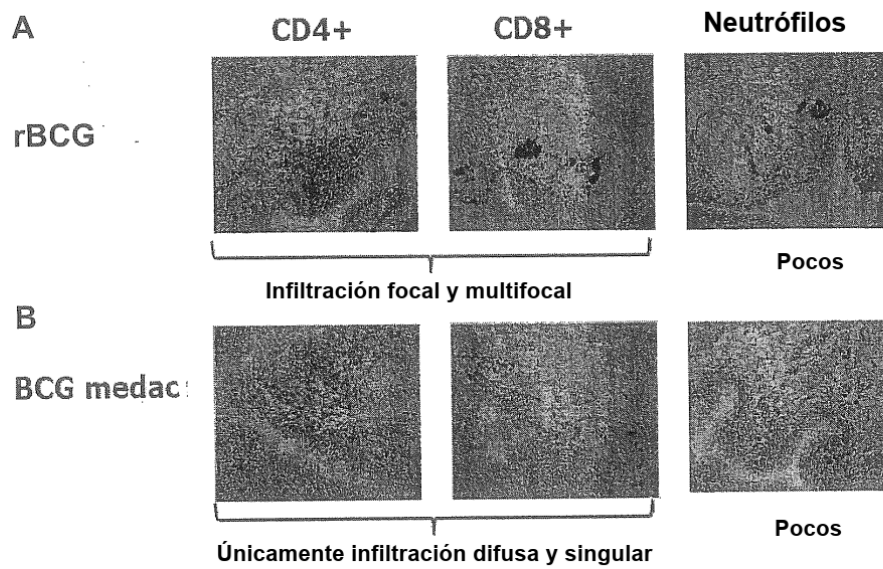


Figura 2 A/B

