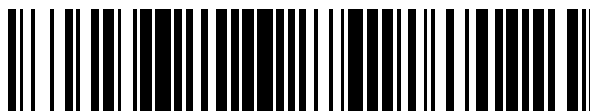


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 108**

21 Número de solicitud: 201231202

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **26.07.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.11.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
(100.0%)
Campus universitari s/n
08193 Bellaterra (Cerdanyola del Valles),
Barcelona, ES**

72 Inventor/es:
**JULIÁN GÓMEZ, Esther;
LUQUÍN FERNÁNDEZ, Marina y
SECANELLA FANDOS, Sílvia**

74 Agente/Representante:
No consta

54 Título: **USO DE MYCOBACTERIUM BRUMAE PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE VEJIGA**

57 Resumen:

Uso de Mycobacterium brumae para el tratamiento del cáncer de vejiga. La presente invención hace referencia al tratamiento del cáncer de vejiga, preferentemente el cáncer de vejiga superficial no invasivo, mediante el uso de la micobacteria Mycobacterium brumae. El tratamiento llevado a cabo en la presente invención es particularmente efectivo en células tumorales en grado 1 y 2 de diferenciación, lo que posibilita llevar a cabo el tratamiento de la enfermedad en un estadio aún incipiente, reduciendo el riesgo de que la enfermedad evolucione a estadios más dañinos y/o se produzca metástasis.

ES 2 391 108 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de *Mycobacterium brumae* para el tratamiento del cáncer de vejiga.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención puede ser englobada en el campo de la medicina en general y, más especialmente, en el campo de la oncología. Particularmente, la presente invención hace referencia al tratamiento del cáncer de vejiga, preferentemente el cáncer de vejiga superficial no invasivo, mediante el uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae* (en adelante *M. brumae*). El tratamiento llevado a cabo en la presente invención es particularmente efectivo en células tumorales en grado 1 y 2 de diferenciación, lo que posibilita llevar a cabo el tratamiento de la enfermedad en un estadio aún incipiente, reduciendo el riesgo de que la enfermedad evolucione a estadios más dañinos y/o se produzca metástasis.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

M. brumae fue aislada y descrita en el año 1993 por el mismo grupo de investigación que ha desarrollado la presente invención. No se ha descrito en la bibliografía ninguna infección causada por ella, ni en humanos ni en animales. En todas las colecciones de cultivos internacionales es considerada de nivel de bioseguridad 1 (LDG Standards-ATCC). Pertenece pues al grupo de micobacterias ambientales no patógenas. Actualmente se halla en fase II de estudio el uso de un extracto celular de otra micobacteria, *Mycobacterium phlei*, para el tratamiento del cáncer de vejiga superficial no invasivo. Sin embargo, *M. phlei* no puede ser considerada como una micobacteria no patógena ya que se han descrito casos de infección en humanos (Khatter et al., 2008; Paul and Devarajan, 1998; Cage and Saubolle, 1997; Aguilar et al., 1989). Por su parte, *Mycobacterium vaccae* se ha estudiado muerta por calor como inmunoestimulador para el tratamiento de tuberculosis, asma y cáncer de pulmón entre otros (Assersohn et al., 2002; Houdra et al., 1998; Mendes et al., 2002). Sin embargo, también se han descrito casos de infección en humanos con *M. vaccae* (Khatter et al., 2008; Hachem et al., 1996)

El cáncer de vejiga es la patología maligna más común del tracto urinario. En Europa, la incidencia más alta aparece en Europa Occidental (23,6 en hombres y 5,4 en mujeres) y en el sur (27,1 en hombres y 4,1 en mujeres) (Babjuk et al., 2008). En Estados Unidos, en el año 2008, se estima que fue diagnosticado a 68.810 personas y causó 14.100 muertes (Kresowik et al., 2009). Aproximadamente, el 75-85% de los pacientes con cáncer de vejiga presentan enfermedad confinada a la mucosa o submucosa cuando se diagnostican. Además, después de la cirugía local existe un elevado nivel de recurrencia local (78%) y progresión (45%) (Brandau et al., 2007).

Los tumores de vejiga se clasifican en diferentes estadios en función del nivel de invasividad del tumor en el tejido vesical. Esta clasificación se realiza tras un examen citoscópico del paciente habiendo sido establecida por la Unión Internacional Contra el Cáncer (Sobin, et al., 2009):

- Carcinomas superficiales (no músculo-invasivos):
 - Estadio T0. Comprende estadio Ta (si sólo afecta al epitelio) o TIS (carcinomas in situ)
 - Estadio T1. Se refiere cuando el tumor invade el tejido conectivo subepitelial (lámina propia), pero sigue confinado a la mucosa.
- Carcinomas infiltrantes (invasivos). Según el nivel de afectación de capas tisulares interiores de la vejiga se diferencian:
 - Estadio T2, cuando el tumor invade músculo
 - Estadio T3, invade tejido perivesical, o
 - Estadio T4, cuando invade órganos periféricos como próstata, utero, vagina, pared pelviana o pared abdominal.

Además del estadio, la Organización Mundial para la Salud (OMS) estableció en 1973 un criterio de clasificación según el análisis histopatológico del tumor. Esta clasificación revisada posteriormente por la OMS/ ISUP (Sociedad Internacional de Uropatólogos) (1998) y actualizada en 2004 (OMS) en la que los grados de diferenciación celular (G1, G2 o G3) establecidos en la clasificación de 1973, se amplían y especifican. Las dos clasificaciones no son excluyentes, e incluso se recomienda el uso de ambas (Alvarez et al., 2007).

Así encontramos:

- Tumores G1 (nivel bajo o diferenciado) que se corresponderían en la clasificación de 2004 con papilomas, papilomas invertidos y neoplasias papilares uroteliales de bajo potencial maligno (PUNLMP), y carcinomas de bajo grado.
- Tumores G2, un grado medio o moderadamente diferenciado, que en la clasificación de 2004 serían carcinomas papilares no invasivos de bajo grado y, en su mayoría, de alto grado.
- Tumores G3, el grado de diferenciación más elevado o pobremente diferenciado, con un mayor pronóstico de recurrencia y progresión. En la clasificación de 2004 se definen como carcinomas de alto grado.

Sólo en el caso de tumores superficiales se realiza terapia biológica con *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). En el caso de tumores superficiales, en función del resultado del estudio de anatomía patológica se evalúa el riesgo de recidivas y progresión, optándose por diferentes estrategias terapéuticas (Babjuk et al., 2011):

- En el caso de un Ta G1 único, se considera de bajo riesgo, de manera que tras la resección transuretral (RTU) solamente se procederá al control del paciente.
- Si se trata de un Ta G1 múltiple, Ta G2, o T1 G1 o G2 se considera un tumor superficial de riesgo intermedio. En este caso se realizará quimioterapia local o tratamiento con BCG, o si éstas están contraindicadas, otra inmunoterapia, procediendo posteriormente al control del paciente.
- Si se trata de un T1 G3 con o sin tumor *in situ* (TIS), se considera un tumor de elevado riesgo. En este caso se realizará tratamiento con BCG, o si éste está contraindicado, otra inmunoterapia o quimioterapia local, procediendo posteriormente al control del paciente.

Con el fin de evitar las recidivas y la progresión a estadios más agresivos se adoptan otras estrategias. En las siguientes 24 horas tras la RTU se administra una dosis de quimioterapia intravesical (normalmente mitomicina C) y, en tumores de riesgo medio y alto, se administra BCG vivo intravesicalmente durante 6 semanas, con posibilidad de realizar una terapia de mantenimiento más larga con BCG. La administración de BCG previene la recidiva, además previene, o al menos retrasa, la progresión tumoral, a diferencia de la quimioterapia que es incapaz de prevenir la progresión (van Rhijn, 2009; Babjuk, 2008). Este protocolo establecido por Morales et al. en 1976 continúa siendo la primera opción en el tratamiento de pacientes con cáncer de vejiga superficial y carcinoma *in situ* (Gontero et al., 2010).

Los pacientes, entonces, requieren de un tratamiento profiláctico efectivo con BCG para prevenir recurrencias y la progresión del tumor, y, además, de un seguimiento continuo a lo largo de la vida. Consecuentemente el cáncer de vejiga no invasivo se considera una enfermedad crónica que requiere un seguimiento frecuente y repetidos tratamientos, convirtiéndose en el tratamiento de más elevado coste (considerando el coste por paciente desde el diagnóstico hasta la muerte) de todos los cánceres (Ploeg et al., 2009).

Treinta años después del inicio de su administración, se desconocen con exactitud los mecanismos mediante los que BCG actúa como agente antitumoral. Se sabe que tiene lugar una actividad directa (inhibición de la proliferación) sobre las células tumorales (Zhang, 1997), así como una actividad tumoral indirecta consistente en la estimulación del sistema inmune. Inicialmente BCG es fagocitado, por células presentadoras de antígeno y células del urotelio, resultando en una alteración de la expresión génica y la secreción de citocinas como IL-6 (citocina proinflamatoria) e IL-8 (quimioatrayente) (Bever et al., 2004; Saban et al., 2008; Shintani et al., 2007), produciéndose una infiltración masiva. Esta reacción inflamatoria local en la mucosa de la vejiga se caracteriza por la presencia de numerosas células T (CD4 y CD8) y macrófagos, lo que conlleva a una secreción de citocinas proinflamatorias que a menudo supone una respuesta favorable. La secreción de IL-12 e IFN- α por monocitos activados por BCG es indispensable para la activación de células citotóxicas como células Natural Killer (NK) de acción antitumoral, células T CD8, macrófagos y linfocitos gamma-delta (Suttman et al., 2004).

Sin embargo, aunque eficaz, la inmunoterapia con BCG tiene sus limitaciones y ocasiona problemas que comprometen su uso. Se presentan problemas de toxicidad asociados aunque generalmente no severos. La mayoría de pacientes experimentan síntomas de irritabilidad (cistitis), aproximadamente un 40% desarrolla hematuria y un 30% presenta fiebre, malestar, y náuseas o vómitos (Lamm et al., 2000, Gontero et al., 2010), llegando a presentarse incluso casos de sepsis por BCG (Gonzalez et al., 2003; Nadasy et al., 2008). Se estima que tienen lugar un 0,4% de casos de sepsis por BCG (Lamm et al., 2000). Cabe destacar que BCG es una micobacteria atenuada obtenida a partir de *Mycobacterium bovis* después de 230 resiembas, y que se administra viva. De hecho, aunque el tratamiento con BCG pueda ser efectivo, existe un consenso a la hora de no tratar a todos los pacientes con cáncer vesical no invasivo debido al riesgo de toxicidad. Se considera un sobretratamiento en tumores de bajo riesgo de recidiva y progresión (Babjuk et al., 2008).

BCG es una especie de micobacteria atenuada obtenida a partir de 230 resiembas de la micobacteria patógena *Mycobacterium bovis*, que causa enfermedad en animales. Al ser una cepa atenuada BCG es considerada de nivel de riesgo biológico 2. Es decir es un agente patógeno que puede provocar enfermedades humanas o animales pero que tiene pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado. Así pues, BCG debe ser manipulada, como mínimo, en un laboratorio de nivel 2, donde se disponga de cabinas de seguridad biológica por la posible formación de aerosoles, y debe ser manipulada por personal cualificado.

Así, dada la ausencia actual de alternativas al BCG para el tratamiento de cáncer de vejiga que demuestren, suficientemente, que consiguen tratar el cáncer de vejiga de forma efectiva pero sin mostrar los graves efectos secundarios asociados al uso de BCG; el objetivo de la presente invención es encontrar micobacterias alternativas, no patógenas, que demuestren ser capaces de ser eficaces en el tratamiento del cáncer de vejiga sin mostrar efectos secundarios adversos para el paciente. Los experimentos que se llevan a cabo en Yuksel et al., 2011 se basan, exclusivamente, en añadir las micobacterias sonicadas a líneas celulares monocíticas y determinar la liberación de citoquinas (ver "experimental procedures"). A partir de estos experimentos se elabora una lista (Tabla 2) con las micobacterias que inducen una actividad TNF- α y/o IL-12 significativa. Sin embargo Yuksel et al., 2011, a pesar de indicar la inducción en la producción de citoquinas por parte de las micobacterias seleccionadas,

realmente no demuestra que dicha producción de citoquinas tenga como consecuencia el tratamiento del cáncer de vejiga. En Yuksel et al., 2011 no se lleva a cabo ningún experimento con cultivos celulares de vejiga ni con modelos animales que demuestren que las micobacterias estudiadas son capaces de tratar el cáncer de vejiga. De hecho Yuksel et al., 2011, en su página 26, divulga que “este estudio es sólo el primer paso para el desarrollo de un nuevo agente anticancerígeno. Se requieren más estudios, incluyendo cultivos de células de vejiga y animales modelo, para desarrollar agentes apropiados”. Esta afirmación deja claro que el tratamiento del cáncer de vejiga al que se hace referencia Yuksel et al., 2011 es especulativo, a partir de una base teórica. Así, Yuksel et al., 2011 no debe ser considerado como una divulgación que demuestre, de forma suficiente, el tratamiento del cáncer de vejiga mediante el uso de micobacterias porque el tratamiento del cáncer de vejiga a partir de micobacterias no se ha reducido a la práctica en este documento. De hecho existen numerosos agentes con capacidad de estimular la producción de citoquinas y que sin embargo no tienen ningún efecto antitumoral sobre células tumorales. Por lo explicado más arriba, se considera que Yuksel et al., 2011 no describe suficientemente la aplicación de micobacterias en el tratamiento del cáncer de vejiga, para que un experto medio en la materia pueda reproducirlo ya que no hay ningún ejemplo/experimentación que lo demuestre.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema anteriormente mencionado mediante el uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae* (en adelante *M. brumae*) para el tratamiento del cáncer de vejiga, preferentemente el cáncer de vejiga superficial no invasivo. El tratamiento llevado a cabo en la presente invención es particularmente efectivo en células tumorales en grado 1 y 2 de diferenciación, lo que posibilita llevar a cabo el tratamiento de la enfermedad en un estadio aún incipiente, reduciendo el riesgo de que la enfermedad evolucione a estadios más dañinos y/o se produzca metástasis.

Por lo tanto, se considera que *M. brumae* es un buen candidato para ser usado en la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer de vejiga.

Así, el primer aspecto de la presente invención hace referencia al uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae* para la elaboración de un medicamento, preferentemente al uso de dicha micobacteria para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer de vejiga. En un aspecto preferido, la presente invención se dirige al uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae* para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer de vejiga superficial no invasivo, particularmente al tratamiento del cáncer de vejiga en grado 1 y 2 de diferenciación. En un aspecto aún más preferido, el uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae* mencionado en este párrafo, se lleva a cabo en combinación con al menos un compuesto citostático, preferentemente mitomicina C.

El segundo aspecto de la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende la micobacteria *Mycobacterium brumae* y excipientes farmacéuticamente aceptables. Entre estos excipientes se incluyen agentes de suspensión y agentes estabilizantes, como por ejemplo, agua, solución salina, sacarosa, manosa, trealosa, glutamato sódico, glicerol, polímeros no-iónicos e iónicos tales como monooleato polioxietileno sorbitán (Tween) o ácido hialurónico, y similares, o combinaciones de los mismos (Jin et al., 2011). En un aspecto preferido de la invención, la composición definida en este párrafo comprende a la micobacteria *Mycobacterium brumae* en combinación con al menos un compuesto citostático, preferentemente mitomicina C.

Mycobacterium brumae se puede formular en suspensiones líquidas o formas sólidas. Las preparaciones líquidas pueden ser disoluciones por suspensión o emulsión en soluciones acuosas (como agua, solución salina o solución salina en tampón fosfato (PBS)) no acuosas o ambas (como suspensiones acuosas, emulsiones de aceite, emulsiones de agua en aceite o aceite en agua, microemulsiones, nanoemulsiones o liposomas) (Fox et al., 2011; Jin et al., 2011).

Los vehículos sólidos pueden ser micropartículas, nanopartículas, microsferas, minibombas y polímeros naturales o sintéticos biodegradables o no biodegradables.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser preparada en formulaciones y/o administrados, de acuerdo a los conocimientos existentes en el estado la técnica del desarrollo galénico, de distintas formas tales como: por inyección intradérmica o por vía oral mediante cápsulas, grageas o tabletas. El medicamento se puede administrar a una mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, gástrica, intestinal, vaginal o el tracto urinario. De forma preferida, la administración se lleva a cabo a nivel intravesical.

La presente invención hace igualmente referencia a la micobacteria *Mycobacterium brumae* para ser usada como medicamento, preferentemente para ser usada en el tratamiento del cáncer de vejiga. En un aspecto preferido el tipo de cáncer de vejiga es superficial no invasivo, preferentemente en grado 1 y 2 de diferenciación.

El último aspecto de la presente invención hace referencia a un método de tratamiento del cáncer de vejiga (preferentemente de cáncer de vejiga superficial no invasivo en grado 1 y 2 de diferenciación) que comprende la administración al paciente aquejado de dicha enfermedad de una cantidad terapéuticamente eficaz de *M. brumae* o de una composición farmacéutica que la comprenda.

5

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Inhibición de la proliferación MOI (dosis de infección) dependiente. Inhibición de la proliferación de la línea tumoral T24 tras infectar con las diferentes micobacterias a diferentes MOI. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia relativo a las células control (no infectadas). Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes.

10

Figura 2. Inhibición de la proliferación en las líneas SW780 (A) y RT112 (B). Se observa un mayor efecto antitumoral de *M. brumae* frente al resto de micobacterias ensayadas, incluidas BCG y *M. phlei*. La infección se realizó con las micobacterias vivas a una MOI de 10:1 y durante 72 horas. Los resultados se muestran como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no infectadas). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes.

15

Figura 3. Inhibición de la proliferación tumoral (líneas T24 y RT4) con BCG y *M. brumae* vivos y muertos mediante diferentes tratamientos. Se observa que *M. brumae* continúa inhibiendo la proliferación tumoral más eficientemente que BCG en la línea RT4 incluso muerto. La infección se realizó con las micobacterias vivas, muertas por irradiación (gamma (25 kGy) y UV / 20 minutos), y muertas por calor (121°C / 15 minutos y 60°C / 30 minutos), a una MOI de 10:1 y durante 72 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia relativo a las células control (células no infectadas). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes.

20

25

Figura 4. Inhibición de la proliferación tumoral (línea J82) con diferentes micobacterias. Se observa la misma capacidad de inhibir la proliferación por parte de BCG, *M. brumae* y *M. phlei*. La infección se realizó con las micobacterias vivas, muertas por irradiación (gamma (25 kGy) y UV / 20 minutos), y muertas por calor (121°C / 15 minutos y 60°C / 30 minutos), a una MOI de 10:1 y durante 120 horas. Los resultados se muestran como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no infectadas). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes.

30

Figura 5. Inducción de producción de citocinas IL-8 (A) e IL-6 (B) en la línea tumoral T24. La línea T24 se infectó con las micobacterias tanto vivas como muertas (con diferentes tratamientos de irradiación o calor), a una MOI de 10:1 y durante 72 horas. Se comparan los resultados con células sin infectar (control). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs BCG vivo.

35

Figura 6. Efecto sinérgico en la inhibición tumoral entre las micobacterias y mitomicina C (MMC). Se muestra el resultado en la línea J82. Se infectó con las micobacterias tanto vivas como muertas (por calor, 121°C / 15 minutos, o irradiadas a 25 KGy), a una MOI de 10:1 y durante 24 horas. Los resultados con *M. brumae* fueron similares a los observados en BCG. Los resultados se muestran como el porcentaje de viabilidad respecto al control (células no infectadas). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes.

40

45

Figura 7. Producción de citocinas en PBMC estimuladas con las diferentes micobacterias vivas o muertas por irradiación. Se muestra la producción de IL-10 (A), TNF (B), IL-12 (C) e IFN (D). Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control.

50

Figura 8. Actividad citotóxica inducida por las PBMCs estimuladas con las micobacterias. En el gráfico superior (A) se muestra la actividad citotóxica de las PBMCs estimuladas con las micobacterias, mientras que en el gráfico inferior (B) se muestra la actividad citotóxica de los factores solubles presentes en los sobrenadantes.

55

Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control (PBMC sin infectar).

Figura 9. Expresión de marcadores CD80 (A), CD86 (B) y CD40 (C) de activación de macrófagos en la línea J774. La infección se realizó con las micobacterias vivas y muertas por calor (121°C) e irradiación (25 kGy). Los resultados están expresados como el promedio de la intensidad de fluorescencia (Geo MFI) \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control (células sin infectar).

60

Figura 10. Producción de las citocinas IL-6 (A) e IL-12 (B) en macrófagos J774 infectados con las diferentes micobacterias vivas o muertas (por calor o irradiación). Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control (células sin infectar).

65

Figura 11. Producción de citocinas y quimiocinas en el sobrenadante de cultivos de macrófagos procedentes de médula ósea de ratón. Los datos se expresan en pg/ml. Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de dos experimentos independientes. * p <0,05 vs control & p <0,05 vs BCG.

Figura 12. Inhibición de la proliferación tumoral de la línea de cáncer de vejiga murina MB49 (A) e inducción de la producción de IL-6 (B) y KC (similar a la IL-8 humana) (C) en la línea MB49. La inhibición de la proliferación fue similar entre *M. brumae* y BCG, siendo, igual que en las líneas humanas, tiempo-dependiente. *M. brumae* indujo elevados niveles de IL-6 (aunque menores que BCG) y de KC (similares a BCG). Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de dos experimentos independientes. * p <0,05 vs control. & p <0,05 vs BCG.

Figura 13. Actividad citotóxica inducida por los macrófagos derivados de médula ósea estimulados con las micobacterias. En la parte izquierda del gráfico se muestra la actividad citotóxica de los macrófagos estimulados con las micobacterias, mientras que en la parte derecha del gráfico se muestra la actividad citotóxica de los factores solubles presentes en los sobrenadantes de los cultivos. En ambos casos tanto *M. brumae* como BCG presentan actividad antitumoral. Los resultados están expresados como el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de tres experimentos independientes. * p <0,05 vs control (BMM sin infectar). & p <0,05 vs BCG.

Figura 14. Supervivencia de las bacterias en macrófagos murinos (línea J774). *Mycobacterium brumae* es eliminado del macrófago tras 96 horas de cultivo, mientras que BCG sobrevive en el macrófago. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias (CFU) en cada pocillo de cultivo, y corresponden a la media \pm desviación estándar de tres pocillos. El gráfico corresponde a los resultados de un experimento representativo tres experimentos independientes realizados.

Figura 15. Supervivencia de las bacterias en la línea tumoral T24. A diferencia de BCG y del resto de bacterias estudiadas, *M. brumae* y la variante colonial lisa de *M. vaccae* no son viables dentro de las células tumorales a las 24 horas post-infección. La variante colonial rugosa de *M. vaccae* disminuye su concentración progresivamente hasta desaparecer a las 72 horas de incubación del cultivo. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias (CFU) en cada pocillo de cultivo, y corresponden a la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Figura 16. Ensayos con micobacterias diferentes a *M. brumae*. Ensayos comparativos.

Se muestra la inhibición de la proliferación de las líneas tumorales T24 (grado 3 de diferenciación), RT112 y 5637 (grado 2) y SW780 (grado 1) tras infectar con las diferentes micobacterias. La infección se realizó con las micobacterias vivas a una MOI de 10:1 y durante 72 horas. Se expresan los resultados como porcentaje de supervivencia relativo a las células control (no infectadas). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de como mínimo tres experimentos independientes realizados. Los resultados se explican el **Ejemplo 18**.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se seleccionó *M. brumae* (ATCC 51384) a partir un grupo de varias micobacterias estudiadas. *M. brumae* es una micobacteria ambiental, no patógena, con una capacidad antitumoral similar a la de BCG. En el caso de la actividad antitumoral directa, *M. brumae* inhibe las células tumorales de grado 3 de diferenciación a niveles similares a BCG o *M. phlei*, pero presenta una mayor actividad antitumoral que BCG y *M. phlei* en las líneas de grado 1 y 2 (un incremento de inhibición tumoral entre un 10-20% respecto a BCG). La actividad antitumoral directa se mantiene cuando la micobacteria se utiliza muerta.

En cuanto a la actividad antitumoral indirecta, en el caso de producción de citocinas en las líneas tumorales, de entre todas las micobacterias estudiadas *M. brumae* es la que produce mayores niveles de IL-6 e IL-8 después de BCG, en general con mucha diferencia respecto al resto de micobacterias. La producción de citocinas disminuye cuando las micobacterias se utilizan muertas, hecho que también se observa tanto para *M. brumae* como para el resto de micobacterias, incluida BCG.

Al igual que BCG, *M. brumae* presenta una actividad antitumoral sinérgica con mitomicina C. En la presente invención, utilizando tres sistemas diferentes: sangre periférica humana, la línea de macrófago murina J774 y macrófagos murinos procedentes de médula ósea, se demuestra que *M. brumae* estimula la respuesta inmune induciendo la producción de citocinas proinflamatorias.

En el caso de células humanas los niveles de citocinas inducidos (TNF y IL-12) son similares a los inducidos por BCG, pero mayores a los inducidos por *M. phlei* (tanto TNF y IL-12 como IFN). En los experimentos de macrófagos derivados de médula ósea *M. brumae* induce una mayor producción que BCG de IL-12, IL-6, RANTES e IP-10, y menor de IL-10. En macrófagos murinos se demuestra que *M. brumae* induce la expresión de marcadores de

activación de la misma forma que BCG e incluso incrementando la expresión de CD40 respecto a lo observado con BCG.

5 Además, en dos tipos de experimentos distintos, utilizando células de sangre periférica humana y macrófagos murinos de médula ósea, se observa que *M. brumae* activa una actividad citotóxica frente a las células tumorales, al igual que lo hace BCG. En células humanas se observa que esta actividad inducida por la micobacteria se mantiene cuando la micobacteria se utiliza muerta.

10 Por otro lado, tal y como se ha explicado anteriormente, *M. brumae* no es patógeno. A diferencia de BCG, *M. brumae* no sobrevive ni en macrófago ni en las células tumorales, y no se ha descrito en la bibliografía ningún caso de infección en humanos o animales causado por *M. brumae*.

15 Cabe destacar, finalmente, que *M. brumae* es una micobacteria de crecimiento rápido (Luquin, M., et al 1993). *In vitro* crece 4 veces más rápido que BCG, y en medios de cultivo más económicos, de forma que la producción de *M. brumae* a gran escala sería más rápida y barata que la de BCG. Además, el hecho de que *M. brumae* sea una micobacteria de nivel de bioseguridad 1, hace que su proceso de obtención sea menos complejo en comparación con BCG.

20 Por lo tanto, se puede concluir que en la presente invención se ha identificado una micobacteria ambiental, no patógena, capaz de inhibir la proliferación de células tumorales de cáncer de vejiga, mejorando incluso la actividad que presenta BCG sin presentar efectos secundarios adversos (dado que *M. brumae* no es patógena, no tendría asociados algunos de los efectos secundarios que presenta BCG).

25 Además, esta micobacteria promueve una actividad citotóxica en el sistema inmune frente a las células tumorales. Así, *M. brumae*, al tratarse de una micobacteria inocua para el hombre, es una alternativa mejorada a BCG, en la terapia antineoplásica.

30 En el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el test T-student para comparar las diferencias entre los valores de inhibición del crecimiento de los diferentes cultivos celulares tras ser infectados con las bacterias, para comparar las diferencias entre los niveles de citocinas inducidas por cada bacteria en los diferentes cultivos. También se utilizó la T-student para comparar las diferencias entre los niveles de expresión de los marcadores de superficie de los macrófagos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

35 Los ejemplos que se exponen a continuación tienen el objetivo de ilustrar la invención arriba descrita sin limitar el alcance de la misma.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1. Cultivo y origen de los microorganismos.

Se escogieron 7 micobacterias ambientales de crecimiento rápido, para ser comparadas con BCG utilizado como control positivo, y con otras dos bacterias, una grampositiva y otra gramnegativa, utilizadas como control negativo.

45 Dichos microorganismos fueron: *Mycobacterium bovis* BCG Connaught (ATCC 35745) adquirido de Aventis Pasteur Laboratories (ImmuCyst). *Mycobacterium confluentis* (ATCC 49920) y *Mycobacterium hibernae* (ATCC 49874) obtenidos de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. *M. brumae*, *Mycobacterium gastri* (ATCC 15754), *Mycobacterium mageritense* (ATCC 700351), *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758), *Mycobacterium vaccae* (ATCC 15483) (que presenta una morfología colonial lisa), una variante de morfología colonial rugosa de *M. vaccae* obtenida en nuestro laboratorio, *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) (los 2 últimos utilizados como controles negativos) obtenidos de la colección de cepas de nuestro laboratorio (Laboratorio de Micobacteriología, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain). Las micobacterias se hicieron crecer en medio de cultivo sólido agar Middlebrook 7H10 (Difco Laboratories, Surrey, UK) suplementado con 10% del medio de enriquecimiento oleico-albumina-dextrosa-catalasa (OADC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37°C. BCG, *M. hibernae* y *M. gastri* crecieron durante 2 semanas y *M. brumae*, *M. confluentis* y *M. mageritensis* durante una semana. *M. vaccae*, *E. coli* y *E. faecalis* se hicieron crecer en medio de cultivo sólido de agar de triptona de soja (TSA; Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) a 37°C durante 7, 1 y 1 día, respectivamente.

55 Ejemplo 2. Cultivo de las líneas celulares.

60 Las líneas tumorales humanas de carcinoma transicional T24, J82, RT112, RT4 y SW780, que representan grados histopatológicos de tumor 3, 3, 2, 1 y 1, respectivamente, fueron suministradas por el Banco de Líneas Celulares de Cáncer del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) (como parte del proyecto de investigación Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) financiado por el Ministerio de Sanidad, C03/010). Las monocapas celulares se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) / Ham's F-12 nutrient mixture (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) completo, es decir, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Lonza, Basel, Switzerland), conteniendo 100 U/ml penicilina G (Lab ERN, S.A., Barcelona, Spain) y 100 µg/ml

estreptomycin (Lab Reig Jofre, S.A., Barcelona, Spain) (medio completo), a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

La línea celular de cáncer de vejiga de ratón MB49 fue cedida amablemente por el Dr. Thomas Tötterman (Laboratorio Rudbeck del Departamento de Inmunología, Genética y Patología de la Universidad de Uppsala, Suecia). Los cultivos celulares de esta línea se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) completo. La línea celular de macrófagos de ratón J774 fue cedida amablemente por el Dr. Carlos Martín (Laboratorio de Genética Molecular de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Gibco, Invitrogen) completo.

Ejemplo 3. Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de humano.

Las muestras de sangre procedieron de individuos sanos negativos para la prueba cutánea de la tuberculosis. Todos los donantes fueron informados y dieron su consentimiento firmado para este estudio.

Las PBMC se aislaron a partir de las muestras de sangre heparinizada mediante gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (LymphoprepTM, Comercial Rafer, Zaragoza, Spain) (Böyum, 1968). Las células se contaron con azul de tripano y se guardaron a -80°C hasta el momento de su utilización o se cultivaron en placas de 6 pocillos (Nunc) a una concentración de 4 x 10⁶ células / pocillo en medio completo RPMI 1640 sin antibióticos, a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% CO₂.

Ejemplo 4. Obtención y cultivo de macrófagos derivados de médula ósea (BMM) de ratón.

Se utilizaron ratones de 10-12 semanas de vida de la cepa C57BL/6 wild type (WT) y deficientes para los receptores TLR2, TLR4 o MyD88 con un background C57BL/6. Las parejas reproductoras de los ratones TLR-deficientes se obtuvieron del Instituto Karolinska (Sweden) con el permiso del Dr. S. Akira (Universidad de Osaka, Japón), y se mantuvieron en el estabulario de los laboratorios Arrhenius de la Universidad de Estocolmo (Suecia). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía Ética de la Universidad de Estocolmo. Los BMM se obtuvieron como previamente se ha descrito (Racoosin et al., 1989; Rothfuchs et al., 2001). Brevemente, después del sacrificio del animal, se obtuvieron los fémures y tibias de las patas posteriores del animal. Se lavaron las cavidades de la médula ósea con medio RPMI 1640 con 20% de HEPES. Las células obtenidas se lavaron y se cultivaron en placas con medio RPMI 1640 completo al que se añadió 20% de medio condicionado de la línea celular L929 (fuente de factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF)). Los cultivos se incubaron durante 7 días a 37°C y 5% de CO₂, con reemplazamiento del medio cada dos días. Antes de ser utilizadas, se lavaron para retirar las células no adherentes y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 completo durante 24 horas.

Ejemplo 5. Preparación de las suspensiones bacterianas.

Para los experimentos de infección, se recogieron las bacterias de la superficie de las placas de cultivo y se realizó una suspensión en tampón fosfato salino (PBS) estéril con bolitas de cristal para disgregar las agrupaciones bacterianas. Posteriormente, se dejaron reposar los tubos entre 20-30 minutos con el fin de que precipitaran los agregados más pequeños que pudieran quedar (Schulze-Röbbecke et al., 1992). Una vez sedimentados, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se diluyó en PBS hasta obtener una concentración equivalente a una turbidez correspondiente a un McFarland 1. Después de centrifugar a 2000 x g durante 10 minutos, el pellet bacteriano se diluyó en medio completo sin antibióticos y, posteriormente, se sometió a tres pulsos (45 W) consecutivos de 30 segundos en un baño de agua ultrasónico (Bandelin Electronic, model Sonorex Super RK52H, Berlin, Alemania) para así obtener predominantemente una suspensión celular de bacterias individuales (Stokes RW, et al., 2004). Se realizaron diluciones seriadas en PBS de suspensiones bacterianas representativas, y se sembraron en placas de medio de cultivo sólido (Middlebrook 7H10 o TSA). Tras 1-4 semanas de incubación, dependiendo de la bacteria, se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU).

Ejemplo 6. Tratamiento de las suspensiones bacterianas.

Suspensiones bacterianas en PBS a una turbidez correspondiente a un McFarland 1, fueron sometidas a diferentes tratamientos de calor y radiación. Los tratamientos de calor consistieron en 121°C durante 15 minutos en autoclave, 80°C durante 30 minutos y 60°C durante 30 minutos en baño húmedo. Los tratamientos de radiación correspondieron a la exposición con luz UV o radiación gamma. Siguiendo el protocolo de Shin et al., 2008, y tras medir la intensidad de la luz UV disponible en la cabina de bioseguridad de nuestro laboratorio, las suspensiones bacterianas se expusieron a luz UV durante 20 minutos (85 mJ/cm²/s). La exposición a radiación gamma de las suspensiones bacterianas se realizó en una empresa externa (Aragogamma, S.A., Barcelona, España), donde se sometieron a dosis de 5, 15 y 25 KGy, las cuales fueron escogidas según lo descrito en la bibliografía (García et al., 1987; Gulle et al., 1995).

Ejemplo 7. Infección de los cultivos celulares con las suspensiones bacterianas.

5 Para los experimentos de infección de las líneas tumorales, se depositaron 3×10^4 células por triplicado en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en el caso de las líneas humanas (T24, J82, RT112, RT4 y SW780), y de 48 pocillos (Costar, Corning, NY, EEUU) en el caso de las murinas (MB49). Tras 3 horas de incubación, a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂, las células tumorales humanas fueron infectadas con cada bacteria a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5:1; 2,5:1; 12,5:1 y 62,5:1 (bacteria : célula), mientras que las células tumorales de ratón fueron infectadas a una MOI de 10:1 después de 24 horas de incubación. Se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ y tras las 3 horas de infección, las bacterias extracelulares se eliminaron con 3 lavados de cada pocillo con PBS tibio. Posteriormente se añadió a cada pocillo medio de cultivo completo (con antibiótico) y se dejaron incubar a 37°C en una atmósfera húmeda del 5% de CO₂.

10 Los efectos de la infección por parte de las diferentes bacterias en las células tumorales se monitorizaron después de 24, 48 y 72 horas para las líneas celulares T24, RT112, RT4, SW780 y MB49; o después de 24, 72 y 120 horas para la línea celular J82.

15 Los macrófagos J774 se depositaron en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc) a una concentración de 5×10^5 macrófagos / pocillo. A las 24 horas de cultivo se infectaron a una MOI de 1:1 para BCG y de 10:1 para el resto de micobacterias. Los pasos siguientes fueron los mismos que en el caso de las líneas tumorales. Los efectos de la infección se monitorizaron después de 24 horas. Las PBMC fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (Nunc). 4×10^6 células/pocillos fueron infectadas con una MOI de 0,1:1 para BCG y de 1:1 para el resto de micobacterias, y se incubaron con medio de cultivo completo sin antibióticos durante 7 días a 37°C en una atmósfera húmeda del 5% de CO₂.

20 Los BMM se depositaron por triplicado en placas de cultivo de 48 pocillos (Costar). En el momento de la infección se partió de 1×10^5 macrófagos diferenciados y se utilizó una MOI de 10:1. Los pasos siguientes fueron los mismos que en el caso de las líneas tumorales. Los efectos de la infección se monitorizaron después de 24 horas.

25 Para los cultivos de BMM se utilizaron los siguientes compuestos durante 24 horas, como controles positivos: Pam3Cys-Ser-(Lys)₄ trihydrochloride (Pam3) (Enzo Life Sciences, Lausen, Suiza) a 1 µg/ml, como agonista del TLR2; LPS de *E. coli* (Sigma) a 10 µg/ml, como agonista del TLR4; e Interferón gamma (IFN - gamma) (Mabtech, Nacka Strand, Suecia) a 20 ng/ml, como control de viabilidad celular general dado que el tipo de estimulación es independiente de los TLR.

30 En todos los experimentos se realizaron, en paralelo a las infecciones, cultivos de células tumorales sin infectar como control.

35 Cada una de las infecciones se realizó por triplicado en cada experimento y los experimentos fueron repetidos como mínimo 3 veces.

Ejemplo 8. Reactivos para el estudio del efecto sinérgico de las micobacterias con un agente quimioterápico.

40 Para el estudio del efecto sinérgico de las micobacterias con un agente quimioterápico, las células tumorales humanas, infectadas y no infectadas, se cultivaron junto con la mitomicina C (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) a una concentración de 10 µg/ml en la línea T24 y de 1 µg/ml en las líneas J82 y RT4, durante 48 horas.

Ejemplo 9. Ensayo de viabilidad celular.

45 La viabilidad celular fue analizada mediante el método 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Mosmann, 1983). A diferentes tiempos después de la infección, según la línea tumoral estudiada, tal y como se ha especificado anteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se añadió a cada pocillo medio de cultivo completo con un 10% de MTT (Sigma) a una concentración de 5 mg/ml y se incubó durante 3 horas a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. Posteriormente, los cristales de formazán formados se disolvieron con isopropanol ácido y se determinó la absorbancia de cada pocillo a 550 nm (Infinite 200 PRO, Tecan, Männedorf, Suiza).

Ejemplo 10. Análisis de citocinas.

50 Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos a diferentes tiempos después de la infección, según la línea tumoral estudiada tal y como se ha especificado anteriormente. Se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos, y se guardaron a -40°C hasta ser utilizados. Los niveles de las diferentes citocinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos se determinaron mediante un enzimo-inmunoensayo (ELISA) comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En las líneas tumorales humanas se utilizaron los tests de interleuquina (IL-) 6 y IL-8 (Becton Dickinson (BD, Pharmingen, San Diego, CA, EEUU), y de Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alfa) (Mabtech). En las PBMC se utilizaron los tests de IL-6, IL-8 y Interferon gamma (IFN-gamma) (BD), de TNF-alfa, IL10 y IL-12 (total) (Mabtech).

55 En la línea tumoral de ratón se utilizaron los tests de TNF-alfa, IL-6 y keratinocyte Chemoattractant (KC) (R&D

Systems, Minneapolis, MN, USA). En las células J774 se utilizaron los tests de IL10 y IL-12 (total) (Mabtech), de IL-6 y TNF-alfa (BD). En los BMM se utilizaron los tests de KC, Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted (RANTES), Interferon gamma-induced Protein 10 (IP-10) y TNF-alfa (R&D Systems), de IL-10 y IL-12 (total) (Mabtech). Los resultados de absorbancia obtenidos fueron transformados en concentración de cada una de las citocinas tras ser comparadas con la recta patrón, suministrada por el fabricante, incluida en cada placa (Costar). Los datos se expresaron como la media de los duplicados realizados de cada uno de los pocillos triplicados de los experimentos.

Ejemplo 11. Viabilidad de las micobacterias en los cultivos infectados.

Con el fin de determinar la viabilidad intracelular de las micobacterias tras la infección, se realizaron cultivos con la línea celular T24 que se sacrificaron a diferentes tiempos post-infección (3, 24, 48 y 72 horas). Tras recoger el medio de cultivo de los pocillos, se añadió 400 µl/pocillo de 0,1% Triton X-100 (Sigma) en PBS y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas, se sembraron en placas de cultivo para bacterias, y se incubaron a la temperatura correspondiente durante 1-2 semanas. Transcurrido este tiempo se contaron las unidades formadoras de colonias (cfu) obtenidas (Dobos et al., 2000).

Ejemplo 12. Detección de los marcadores de superficie de los macrófagos J774 activados.

Para el estudio de los marcadores de activación de la superficie de las células J774, éstas se recuperaron del pocillo y se incubaron con el anticuerpo anti-ratón CD32/CD16 (receptor FcγII/III). Después de 15 minutos se añadió el anticuerpo anti-ratón correspondiente diluido en PBS. Los anticuerpos utilizados fueron IA^d (MHC II), CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y sus correspondientes controles de isotipo. Todos los anticuerpos se obtuvieron de Becton-Dickinson. La incubación se realizó en hielo durante 30 minutos. Finalmente se lavaron y se resuspendieron en PBS para ser analizadas por el citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el software CellQuestPro (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Los macrófagos J774 fueron estimulados con Lipopolysaccharide (LPS) de *E. coli* (Sigma) a 10 µg/ml durante 24 horas, utilizado como control positivo.

Ejemplo 13. Citotoxicidad de las PBMC y los BMM activados.

Las PBMC se infectaron con las diferentes micobacterias a una MOI de 0,1:1 para BCG y de 1:1 para el resto de bacterias, y los BMM a una MOI de 1:1, durante 7 días y 24 horas, respectivamente. Posteriormente, las PBMC activadas se cultivaron con la línea tumoral T24 y los BMM activados con la línea tumoral MB49, a una proporción de 20:1 (célula efectora : célula tumoral) durante 48 y 24 horas, respectivamente.

Con el fin de analizar la capacidad citotóxica de factores solubles procedentes del medio de cultivo de las células efectoras activadas, se recogió el sobrenadante a las 24 horas post-infección, se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos, y se utilizó como medio de cultivo para las líneas tumorales correspondientes durante 48 horas.

Después de los tiempos de cultivo necesarios se recogieron las células tumorales de cada pocillo y se procedió al análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en el caso de las células T24, y mediante el recuento microscópico mediante la tinción celular con azul de tripano en el caso de las células MB49.

RESULTADOS

Ejemplo 14. Micobacterias de estudio.

Tras seleccionar un grupo de 8 micobacterias de entre las más de 120 especies descritas hasta el momento, se estudió su capacidad antitumoral directa en líneas tumorales de cáncer de vejiga, así como su capacidad de activar la respuesta inmune, clave para la actividad antitumoral indirecta.

Entre las micobacterias estudiadas se hallaba *M. brumae*. Actualmente se encuentra en fase II de estudio el uso de un extracto celular de otra micobacteria, *Mycobacterium phlei*, para el tratamiento del cáncer de vejiga superficial no invasivo. Por ello, *M. phlei* se incluyó en el estudio aunque no se puede considerar una micobacteria no patógena ya que se han descrito casos de infección en humanos. Tras una primera selección, en la mayoría de experimentos posteriores se estudiaron en paralelo junto con *M. brumae*, BCG y *M. phlei*, *M. vaccae* y *M. gastri* como controles. *M. gastri* fue una de las micobacterias que no mostraron ningún efecto antitumoral en los primeros experimentos así que se escogió como control para el resto de experimentos.

Ejemplo 15. Respuesta antitumoral directa.

Sólo algunas micobacterias no patógenas son capaces de inhibir el crecimiento de las células de cáncer de vejiga. Se trabajó con cultivos de líneas tumorales de grado de diferenciación 1 (RT4 y SW780), grado 2 (RT112) y grado 3 (T24 y J82) pertenecientes todas ellas a carcinoma superficial de vejiga. Tras infectar con las diferentes micobacterias, se observó que no todas producían el mismo efecto. Mientras la mayoría no ejercía ningún tipo de actividad sobre las células tumorales, una de ellas, *M. brumae*, inhibía la proliferación tumoral de manera similar a

BCG en las líneas tumorales, consiguiendo valores de inhibición entre un 30-40%, superando incluso la capacidad antitumoral de BCG en las líneas de grado 1 y de grado 2 (RT4, SW780 y RT112) (**Figuras 2 y 3**). La inhibición de la proliferación se analizó a diferentes tiempos y a diferentes MOI, observándose una actividad anti-proliferativa tiempo- y MOI-dependiente.

M. brumae muerto mantuvo su capacidad de inhibición de la proliferación tumoral. Tal y como se ha explicado anteriormente, el uso de BCG vivo en pacientes conlleva una posible infección por este microorganismo. Dada la ventaja que podría suponer la terapia con bacilos no viables, se estudió la capacidad antitumoral directa de las micobacterias muertas mediante diferentes tipos de tratamientos de calor o radiación. El comportamiento es similar al obtenido con las micobacterias vivas. *M. brumae* continúa inhibiendo la proliferación tumoral incluso muerto (**Figuras 3 y 4**).

Además, *M. brumae* indujo la producción de citocinas en las líneas tumorales. Se analizó la inducción de la producción de citocinas por parte de las micobacterias en las líneas tumorales infectadas, observándose una relación directa entre el aumento de la producción de las citocinas y el tiempo de incubación, y entre la producción de citocinas y la concentración de bacterias utilizada para infectar los cultivos. La producción de citocinas varió según las bacterias utilizadas y las líneas celulares estudiadas.

De entre todas las micobacterias vivas, *M. brumae* indujo valores de IL-6 e IL-8 menores que BCG, (en el caso de la línea T24 similares a BCG) (**Figura 5**) pero superiores al resto de micobacterias estudiadas.

Por otro lado comentar que se produjo un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación tumoral de las micobacterias con mitomicina. Se infectaron las células tumorales con las diferentes micobacterias tratándose en paralelo con el quimioterapéutico mitomicina C (habitualmente utilizado en el tratamiento de pacientes con cáncer de vejiga superficial no invasivo). Se observó un efecto sinérgico entre la micobacteria y el agente químico en la inhibición de la proliferación tumoral. El efecto sinérgico se pudo observar utilizando tanto las micobacterias vivas como muertas (**Figura 6**).

Ejemplo 16. Respuesta antitumoral indirecta.

Se estudió la estimulación del sistema inmune humano y actividad citotóxica frente a las células tumorales. Así, con el fin de comprobar su efecto inmunoestimulador se infectaron células de sangre periférica humanas (PBMC) con *M. brumae*, BCG y *M. gastri* (como control negativo) tanto vivas como muertas por irradiación, así como con *M. phlei* muerto por irradiación. En los sobrenadantes de los cultivos se evaluó la presencia de citocinas proinflamatorias (TNF, IFN e IL-12) y antiinflamatorias (IL-10) (**Figura 7**).

M. brumae, tanto vivo como muerto por irradiación, indujo la producción de niveles similares de IL-10, TNF e IL-12 que BCG. Únicamente indujo niveles inferiores que BCG de IFN. En todos los casos la producción de citocinas fue superior a la inducida por *M. gastri* (**Figura 7**).

Comparando con la infección con *M. phlei* muerto por irradiación, *M. brumae* indujo niveles superiores de TNF, IL-12 e IFN, las tres citocinas proinflamatorias estudiadas. En células humanas, *M. phlei* no indujo ni la producción de IL-12 ni de IFN, citocinas clave para la activación de la respuesta antitumoral (**Figura 7**).

Se comprobó la actividad citotóxica frente a la línea tumoral T24 de las PBMC estimuladas con las diferentes micobacterias. Se analizó tanto la actividad citotóxica de las células, poniendo en contacto las PBMCs con la línea T24, como la actividad citotóxica de factores solubles presentes en el sobrenadante de las PBMCs estimuladas, poniendo el sobrenadante en contacto con la línea T24. Se observó que las PBMC estimuladas con *M. brumae*, tanto vivo como muerto por irradiación, tienen actividad citotóxica frente a la línea tumoral T24 humana, con valores de citotoxicidad similares a los obtenidos con PBMCs estimuladas con BCG o *M. phlei* (en el caso de *M. phlei* sólo muerto por irradiación, no se pudo utilizar vivo) (**Figura 8**).

Se demostró además que *M. brumae* inducía factores solubles, presentes en el sobrenadante de los cultivos de PBMCs estimulados, con actividad citotóxica. Los valores de citotoxicidad fueron menores a los obtenidos por BCG vivo pero iguales a los obtenidos con BCG muerto por irradiación (**Figura 8**). *M. phlei* no indujo factores solubles en los cultivos con actividad citotóxica.

Además se procedió al ensayo de la activación de macrófagos murinos por medio de la expresión de marcadores de activación y producción de citocinas. Así, con el fin de estudiar con más detalle la capacidad de activación del sistema inmune, se realizaron experimentos con la línea celular de macrófagos murinos J774, debido a la incapacidad de realizar estos experimentos con sangre humana.

Así, se estudió la capacidad de activar células presentadoras de antígeno. Se observó que el nivel de expresión de determinados marcadores superficiales asociados a activación (CD80, CD86 y CD40) incrementaba tras ser infectados los macrófagos con las micobacterias (**Figura 9**). Excepto en el caso de la expresión de CD86, que se observó relativamente incrementada utilizando micobacterias muertas, para observar un incremento significativo de

la expresión de marcadores de activación fue necesario infectar los macrófagos con las micobacterias vivas. *M. brumae* inducía una expresión mayor de CD40 que BCG, y similar a BCG en la inducción de la expresión de CD80 y CD86 (**Figura 9**).

5 En los cultivos con la línea murina J774 también se pudo estudiar la producción de citocinas tras ser infectadas con las micobacterias. Así, se observó que *M. brumae* induce la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12 e IL-6) en los macrófagos infectados. Los niveles de producción de citocinas inducidos por *M. brumae* vivo fueron similares (IL-6) o menores (IL-12) a los inducidos por BCG (**Figura 10**). Cuando se infectaron los macrófagos con las micobacterias muertas se indujeron niveles inferiores de producción de citocinas en todos los casos (**Figura 10**).
10 Destacar que *M. brumae*, al igual que BCG, y tal y como se había observado en los cultivos de sangre periférica humana, induce la producción de IL-12, clave en la inmunoterapia del cáncer de vejiga (Zaharoff, 2009).

Por otro lado se estudió la activación de macrófagos de médula ósea de ratones mediante la inducción de producción de citocinas/quimiocinas y actividad citotóxica frente a células tumorales.

15 Así, se estimularon de nuevo macrófagos pero, en este caso, procedentes de médula ósea de ratón con *M. brumae*, BCG y *M. gastrí*. En el sobrenadante de los cultivos se evaluó la inducción de la producción de diferentes citocinas y quimiocinas (**Figura 11**). Se observó en estos cultivos un incremento de la producción de las citocinas IL-12 e IL-6 y las quimiocinas RANTES e IP-10, en los sobrenadantes de células estimuladas con *M. brumae* respecto a las células estimuladas con BCG. En todos los casos la producción de citocinas inducida por *M. brumae* y BCG es superior a la inducida por *M. gastrí*, excepto en la producción de IP-10, que BCG induce una menor producción comparado con el resto de micobacterias (**Figura 11**).

25 También se comprobó en células tumorales murinas la actividad citotóxica de los macrófagos estimulados con las diferentes micobacterias. Para ello se utilizó la línea tumoral murina de cáncer de vejiga MB49. Inicialmente se comprobó que al igual que en las células tumorales humanas, BCG y *M. brumae* inhibían la proliferación tumoral e inducían la producción de citocinas (**Figura 12**).

30 Finalmente se analizó la capacidad de inducir una actividad citotóxica frente a células tumorales. Al igual que se observó en células humanas, los experimentos demostraron que tanto *M. brumae* como BCG activan las células del sistema inmune induciendo una actividad citotóxica. Además se demostró de nuevo que se induce la producción de factores solubles en el sobrenadante con también actividad citotóxica (**Figura 13**).

35 **Ejemplo 17. Patogenicidad.**

No se ha descrito ninguna infección causada por *M. brumae* ni en humanos ni en animales. En la presente invención se demuestra que *M. brumae* no sobrevive en macrófagos infectados *in vitro*, a diferencia de BCG que persiste en el macrófago a lo largo del tiempo (**Figura 14**). Además se comprobó la viabilidad de las micobacterias en el interior de las células tumorales. Así, se observó que *M. brumae*, junto con *M. vaccae* (variante lisa) dejan de ser viables dentro de la línea tumoral T24 tras 24 horas de incubación (**Figura 15**).

40 **Ejemplo 18. Ensayos con micobacterias diferentes a *M. brumae*. Ensayos comparativos.**

45 En este ejemplo se estudió la inhibición de la proliferación de las líneas tumorales T24 (grado 3 de diferenciación), RT112 y 5637 (grado 2) y SW780 (grado 1) tras infectar con las diferentes micobacterias. La infección se realizó con las micobacterias vivas a una MOI de 10:1 y durante 72 horas. En la **Figura 16** se expresan los resultados como porcentaje de supervivencia relativo a las células control (no infectadas). Cada columna representa el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos de como mínimo tres experimentos independientes realizados.

50 Se han estudiado las siguientes especies divulgadas en Yuksel et al., para las cuales dicha referencia no demuestra su posible uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, tal y como se explica en el apartado del estado de la técnica. Así, las micobacterias utilizadas fueron *Mycobacterium aichiense* (CR-103), *Mycobacterium aurum* (ATCC 23366), *Mycobacterium brumae* (ATCC 51384), *Mycobacterium chitae* (CIP 141160002), *Mycobacterium chubuense* (ATCC 27278), *Mycobacterium gadium* (ATCC 27726) y *Mycobacterium obuense* (ATCC 27023) obtenidas de la colección de cepas de nuestro laboratorio (Laboratorio de Micobacteriología, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, España). BCG, *M. brumae*, *M. chitae* y *M. gadium* se hicieron crecer en medio de cultivo sólido agar Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado con 10% de OADC a 37°C (excepto *M. gadium* que creció a 30°C). *M. aichiense*, *M. aurum*, *M. chubuense* y *M. obuense* crecieron en TSA a 30°C (excepto *M. aichiense* que creció a 37°C).

60 En todos los experimentos realizados se observa un mayor efecto antitumoral de *M. brumae* frente al resto de micobacterias estudiadas (excepto para BCG en la línea T24). En la línea de grado 1 (T24) *M. brumae* inhibe en un 34% la proliferación de las células tumorales, mientras que BCG induce hasta un 40% de inhibición. En el resto de micobacterias la inhibición se sitúa únicamente entre un 4 y 10%, excepto *M. chitae* que induce una inhibición del 20%.

- 5 En las líneas tumorales de grado 2 los patrones de inhibición de las micobacterias son diferentes, pero en ambos casos *M. brumae* induce el mayor índice de inhibición de la proliferación celular, con valores incluso superiores a los inducidos por BCG. En el caso de la línea celular RT112, *M. brumae* inhibe en un 20% la proliferación tumoral, mientras que el resto de micobacterias estudiadas, incluida BCG, presenta valores entre el 1 y 8%. En la línea tumoral 5637, *M. brumae* inhibe en un 51% la proliferación tumoral. BCG y *M. chitae* inhiben la proliferación con valores del 36 y 40%, respectivamente, mientras que el resto de micobacterias presenta valores inferiores de inhibición de la proliferación.
- 10 Finalmente, en la línea de grado 1 SW780, la inhibición de *M. brumae* es entre un 15 y 20% superior a la inhibición de la proliferación inducida por el resto de micobacterias (incluida BCG), alcanzando un valor del 36%.

REFERENCIAS

- 5 1. Aguilar JL, Sanchez EE, Carrillo C, Alarcón GS, Silicani A. (1989) Septic arthritis due to *Mycobacterium phlei* presenting as infantile Reiter's syndrome. *J Rheumatol.* 16 (10): 1377-8.
2. Álvarez Kindelán J., Campos Hernández J.P., López Beltrán A., Requena Tapia M.J. (2007) Clasificación de la OMS 2004 para los tumores vesicales: resumen y comentarios. *Actas Urol Esp.* 31 (9):978-988.
3. Assersohn L, Sourberbielle B E, O'Brien M E, Archer C D, Mendes R, Bass R, Bromelow K V, Palmer R D, Bouilloux E, Kennard D A, Smith I E. (2002). A randomized pilot study of SRL 172 (*Mycobacterium vaccae*) in patients with small cell lung cancer (SCLC) treated with chemotherapy. *Clin. Oncol.* 14:23.
- 10 4. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta. (2008). Guía clínica del carcinoma urotelial no músculo invasivo de la Asociación Europea de Urología. *Actas urológicas Españolas.* 33:361-371.
5. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Rouprêt M; European Association of Urology (EAU). (2011) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol.* 59 (6): 997-1008.
6. Bevers RF, et al. (2004) Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer.* 91: 607-12.
7. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* (1968) 97:7.
8. Brandau S, Suttman H. (2007). Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed. Pharmacother. Rev.* 61:299-305.
9. Cage GD, Saubolle MA. (1997) Infrequently isolated and unusual mycobacterial species as agents of human disease. *Reviews in Medical Microbiology.* 8 (3): 125-135.
- 25 10. Dobos KM, Spotts EA, Quinn FD, King CH. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun* (2000) 68(11): 6300-10.
11. Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. (2011) Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine.* 29 (51): 9563-9572.
12. Garcia MM, Brooks BW, Stewart RB, Dion W, Trudel JRR, Ouwerkerk T. Evaluation of gamma radiation levels for reducing pathogenic bacteria and fungi in animal sewage and laboratory effluents. *Can J Vat Res* (1987) 51: 285-9.
13. Gontero P, Bohle A, Malmstrom P-U, O'Donnell M A, Oderda M, Sylvester R, Witjes F. (2010). The role of *Bacillus Calmette-Guérin* in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol.* 57:410-429.
14. Gonzalez OY, Musher DM, Brar I, Furgeson S, Boktour MR, Septimus EJ, Hamill RJ, Graviss EA. (2003) Spectrum of bacille Calmette-Guérin (BCG) infection after intravesical BCG immunotherapy. *Clin Infect Dis.* 36 (2): 140-8.
15. Gulle H, Fray LM, Gormley EP, Murray A, Moriarty KM. Responses of bovine T cells to fractionated lysate and culture filtrate proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Vet Immunol Immunopath* (1995) 48: 183-90.
- 40 16. Hachem R, Raad I, Rolston KV, Whimbey E, Katz R, Tarrand J, Libshitz H. (1996) Cutaneous and pulmonary infections caused by *Mycobacterium vaccae*. *Clin Infect Dis.* 23 (1): 173-175.
17. Houdra D, Baban B, Dunsmuir W, Kirby R, Dalgleish AG. (1998). Immunotherapy of advanced prostate cancer: a phase I/II trial using *Mycobacterium vaccae* (SRL 172). *BR. J. Urol.* 13:182.
18. Jin TH, Nguyen L, Qu T, Tsao E. (2011) Improved formulation and lyophilization cycle for rBCG vaccine. *Vaccine.* 29 (29-30): 4848-4852.
- 45 19. Khatter S, Singh UB, Arora J, Rana T, Seth P. (2008) Mycobacterial infections in human immuno-deficiency virus seropositive patients: role of non-tuberculous mycobacteria. *Indian J Tuberc.* 55(1):28-33.
20. Kresowik T P, Griffith T S. (2009). *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 1(2):281-288.
21. Lamm D L. (2000). Efficacy and safety of *Bacille Calmette-Guérin* immunotherapy in superficial bladder cancer. *Clin. Infect. Dis.* 31:S86-S90.
- 50 22. Luquin M., Ausina V., Vincent-Levy-Frebault V., Laneelle M.A., Belda F., Garcia-Barcello M., Prats G., and Daffe M. (1993) *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:405-413.
23. Mendes R, O'Brien M E R, Mitra A, Norton A, Gregor R K, Padhani A R, Bromelow K V, Winkley A R, Ashley S, Smith I E, Souberbielle B E. (2002). Clinical and immunological assessment of *Mycobacterium vaccae* (SRL 172) with chemotherapy in patients with malignant mesothelioma. *BR. J. Immunol.* 86:336.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* (1983) 65: 55-63.
25. Nadasy KA, et al. (2008) Four cases of disseminated *Mycobacterium bovis* infection following intravesical BCG instillation for treatment of bladder carcinoma. *South Med. J.* 101: 91-95.
- 60 26. Ploeg M, et al. (2009) The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol.* 27(3): 289-93.
27. Paul E, Devarajan P. (1998) *Mycobacterium phlei* peritonitis: a rare complication of chronic peritoneal dialysis. *Pediatric nephrology.* 12 (1): 67-68.
- 65 28. Racoosin EL, Swanson JA. Macropage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J Exp Med* (1989) 170: 1635-48.

29. Rothfuchs AG, Gigliotti D, Palmblad K, Andersson U, Wigzell H, Rottenberg ME. IFN-alpha betadependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. *J Immunol* (2001) 167: 6453-61.
- 5 30. Saban MR (2008) Molecular networks discriminating mouse bladder responses to intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG), LPS, and TNF- α . *BMC Immunol*. 9: 4.
31. Shin DM, Yang CS, Yuk JM, Kim KH, Shin SJ, Takahara K, Lee SJ, Jo EK. Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* (2008) 10(8): 1608-21.
- 10 32. Shin G A, Lee J K, Freeman R, Cangelosi G A. (2008). Inactivation of Mycobacterium avium complex by UV irradiation. *App. Environ. Microbiol*. 74:7064-7069.
33. Shintani Y., et al. (2007) Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guérin for superficial bladder cancer: Study of the mechanism of BCG immunotherapy. *Int J Urol*. 14: 140-6.
- 15 34. Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D, Thorson LM. The glycan-rich outer layer of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun* (2004) 72(10): 5676-86.
35. Sobin, LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TMM classification of malignant tumors (UICC International Union Against Cancer), ed. 7, New York, NY: Wiley-Blackwell; 2009.
- 20 36. Suttman H, Jacobsen M, Reiss K, Jocham D, Bohle A, Brandau S. (2004) Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol*. 172: 1490-5.
37. van Rhijn BW, et al. (2009) Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol*. 56(3): 430-42.
38. Yuksel et al., (2011) Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *J Mol Microbiol* 2011; 20:24-28.
- 25 39. Zaharoff DA. (2009) Intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer with chitosan/Interleukin-12. *Cancer Res*. 69: 6192-99
40. Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K. (1997) Effects of bacillus Calmette-Guérin and interferon α 2b on human bladder cancer in vitro. *Int. J. Cancer*. 71: 851-857.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae* para la elaboración de un medicamento.
2. Uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae*, según la reivindicación 1, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de vejiga.
- 10
3. Uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae*, según la reivindicación 2, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de vejiga superficial no invasivo.
4. Uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de vejiga en grado 1 y 2 de diferenciación.
- 15
5. Uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en combinación con al menos un compuesto citostático.
- 20
6. Uso de la micobacteria *Mycobacterium brumae*, según la reivindicación 5, donde el compuesto citostático es la mitomicina C.
7. Composición farmacéutica que comprende la micobacteria *Mycobacterium brumae* y excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25
8. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7, que comprende la micobacteria *Mycobacterium brumae* en combinación con al menos un compuesto citostático y excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 30
9. Composición farmacéutica, según la reivindicación 8, donde el compuesto citostático es mitomicina C.
10. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7, caracterizada porque los excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan del grupo que comprende: agua, solución salina, sacarosa, manosa, trealosa, glutamato sódico, glicerol y polímeros no-iónicos e iónicos, o combinaciones de los mismos.
- 35
11. Composición farmacéutica, según las reivindicaciones 7 a 10, caracterizada porque se administra por vía intranasal, vía intradérmica, vía oral, vía vaginal o a través del tracto urinario.

FIGURA 1

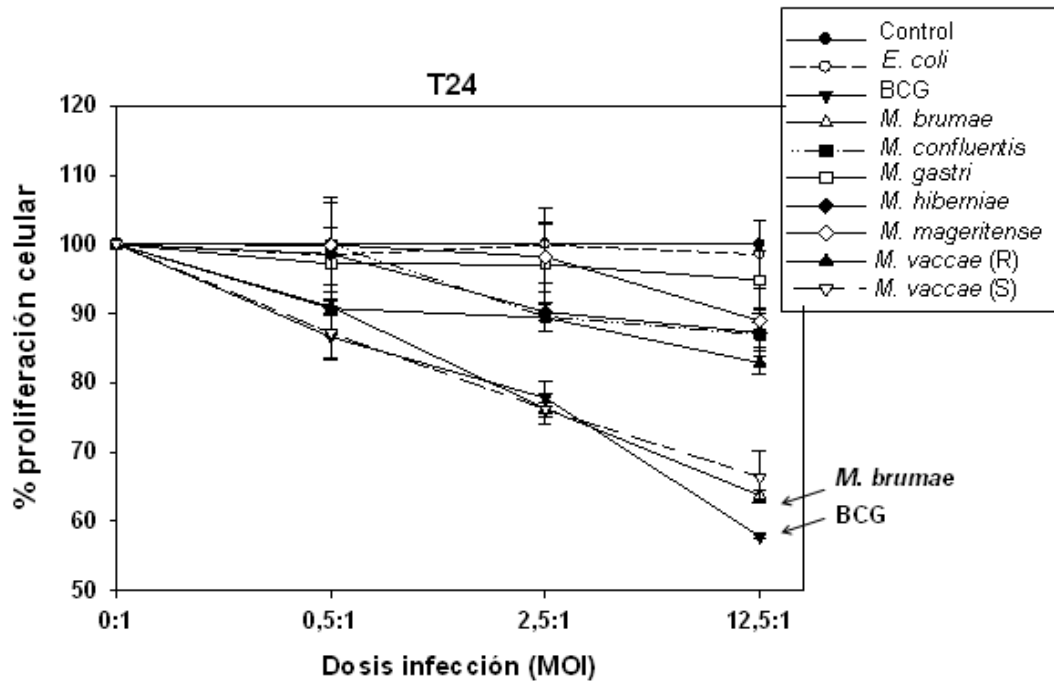


FIGURA 2

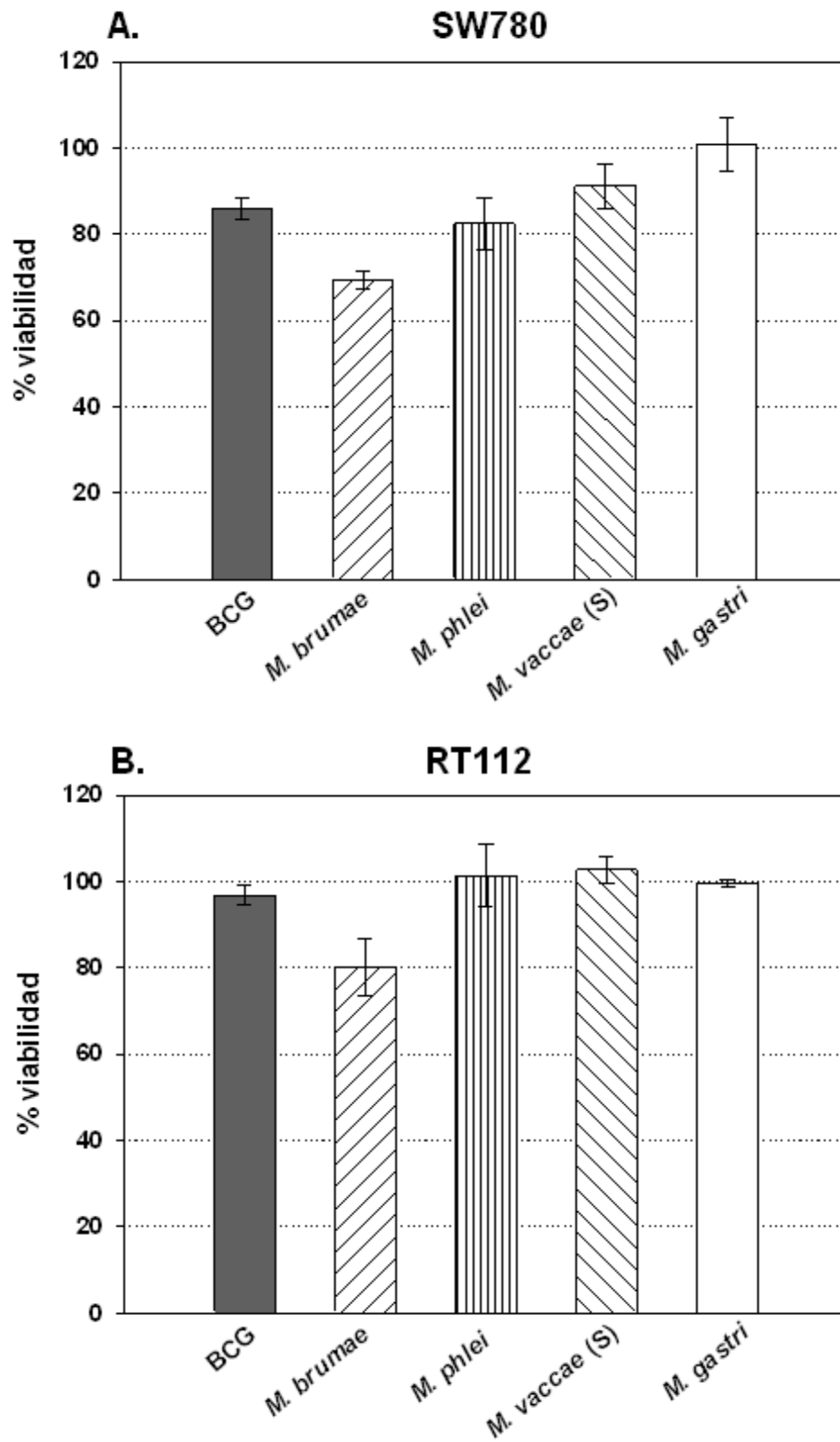


FIGURA 3

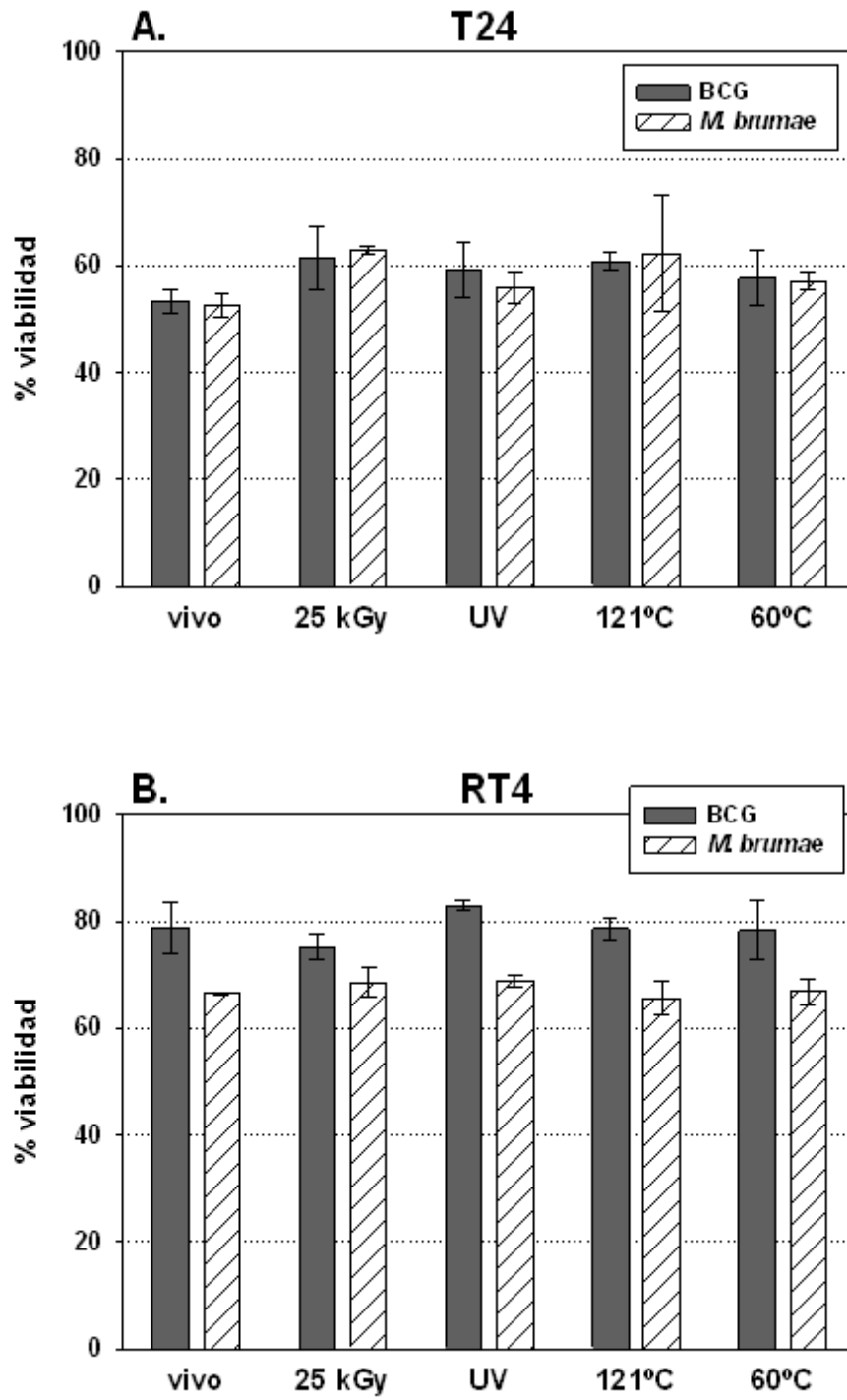
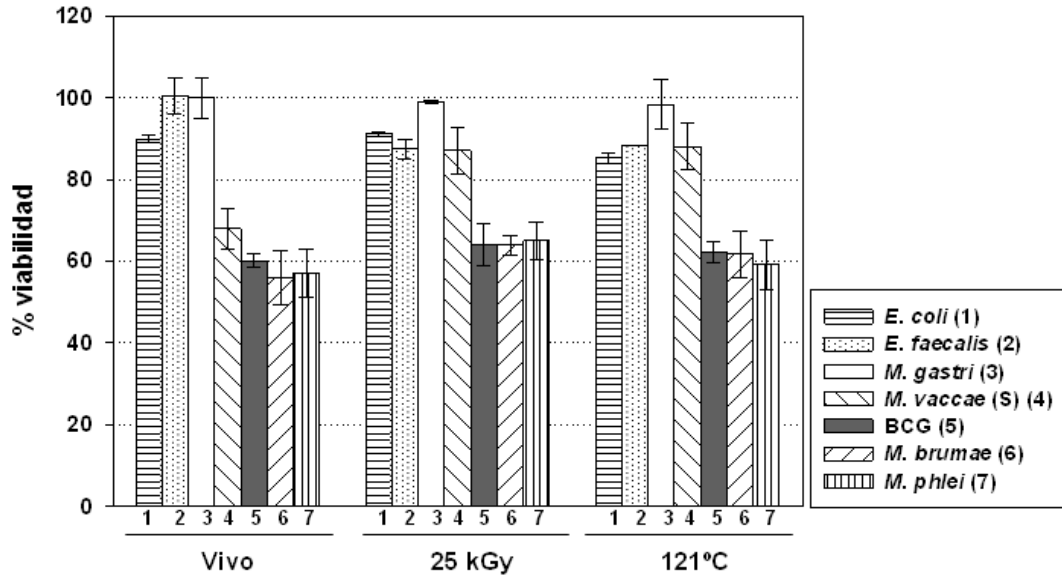


FIGURA 4



5

FIGURA 5

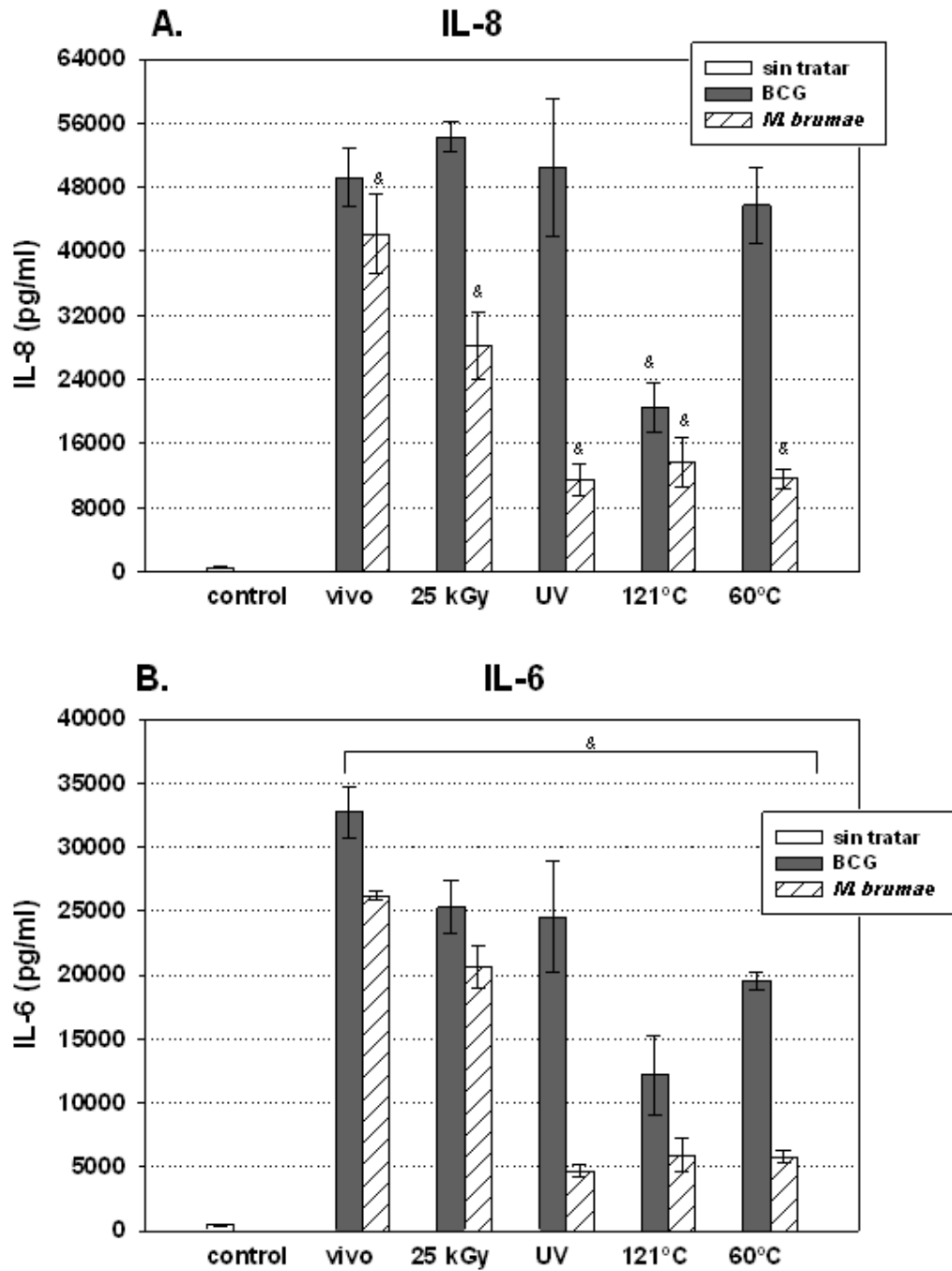


FIGURA 6

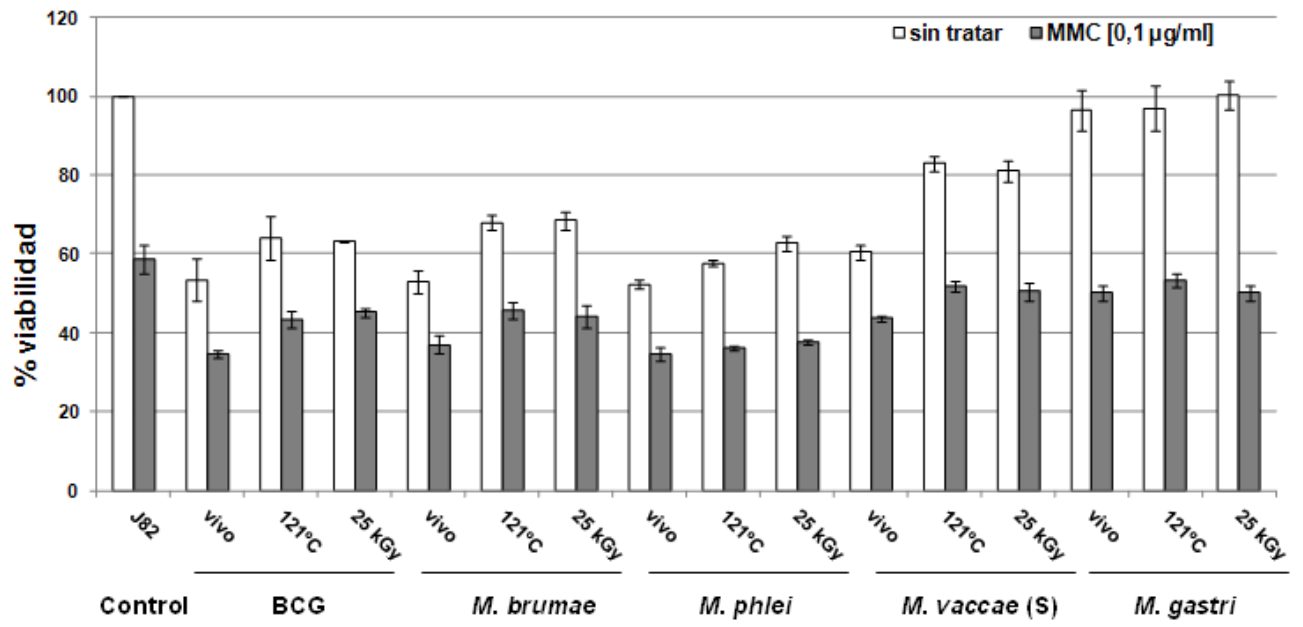


FIGURA 7

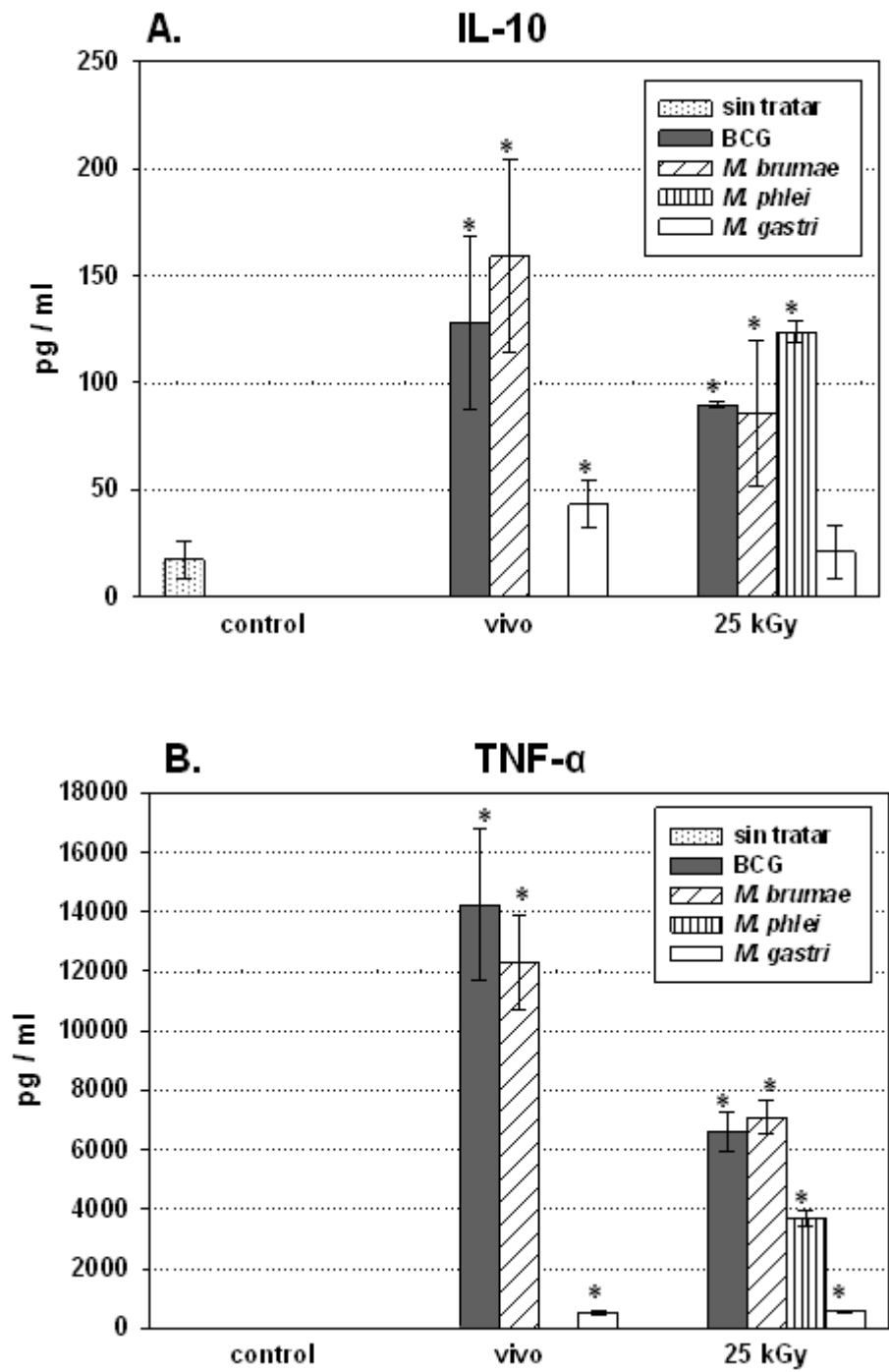


FIGURA 7 (cont.)

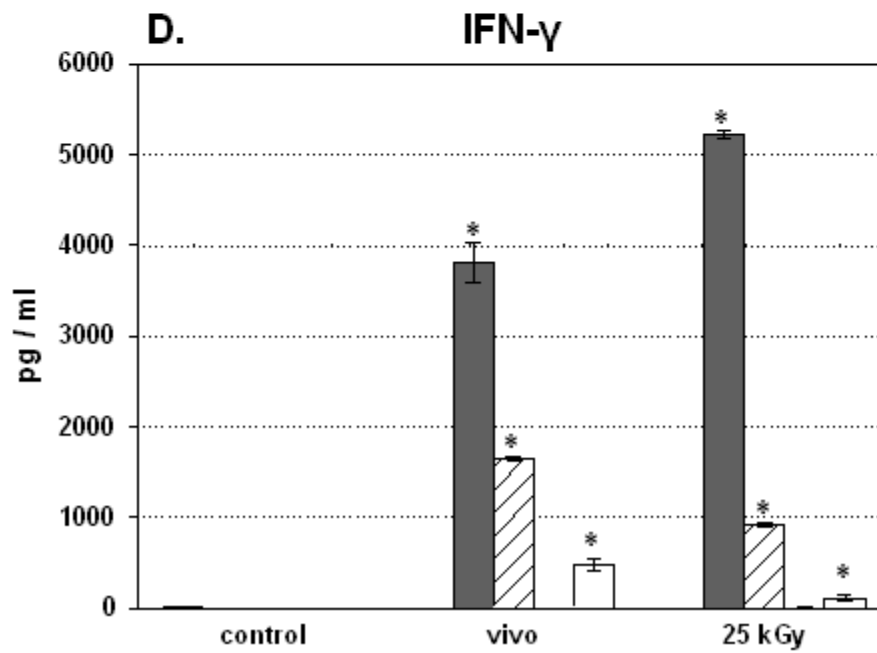
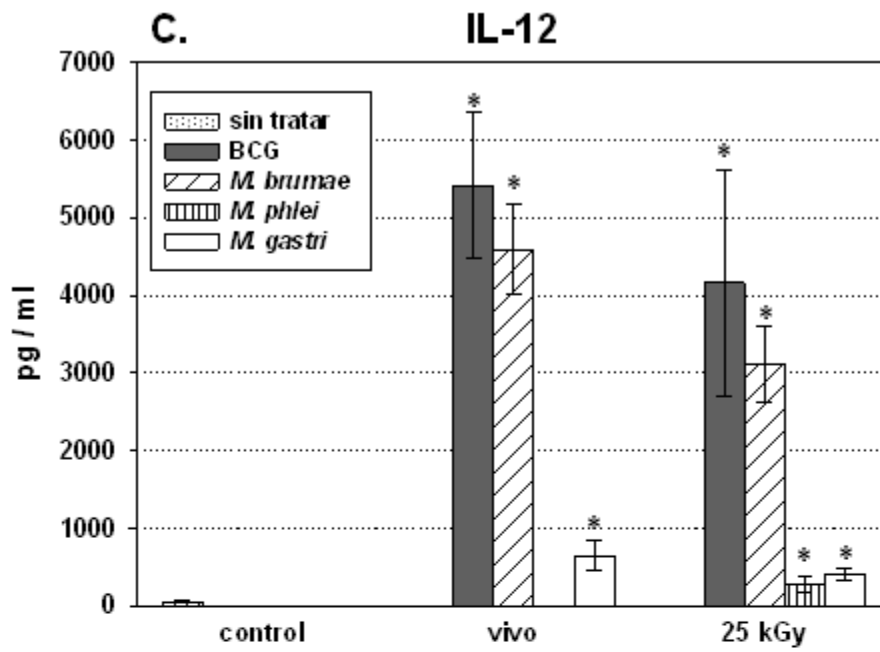


FIGURA 8

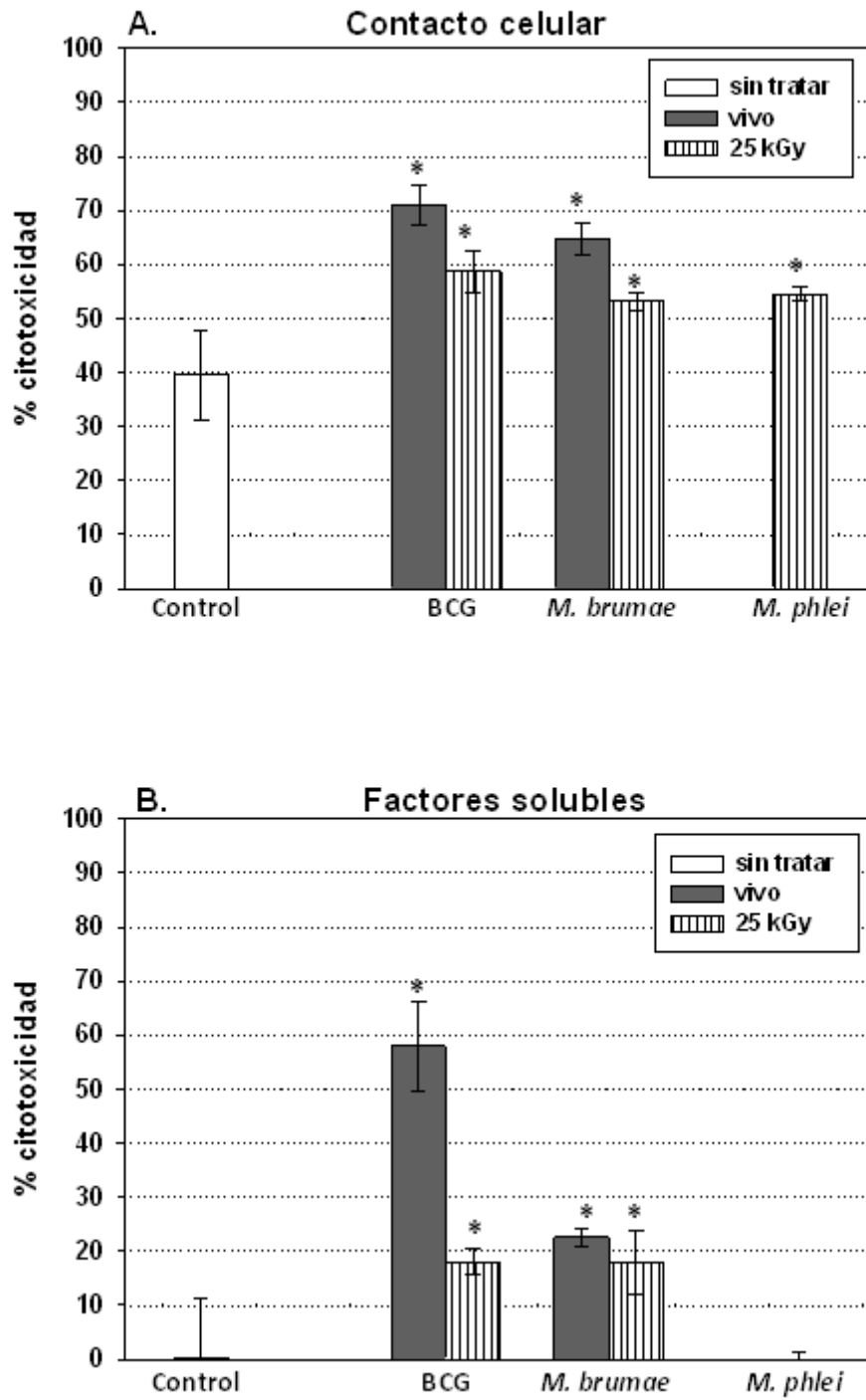


FIGURA 9

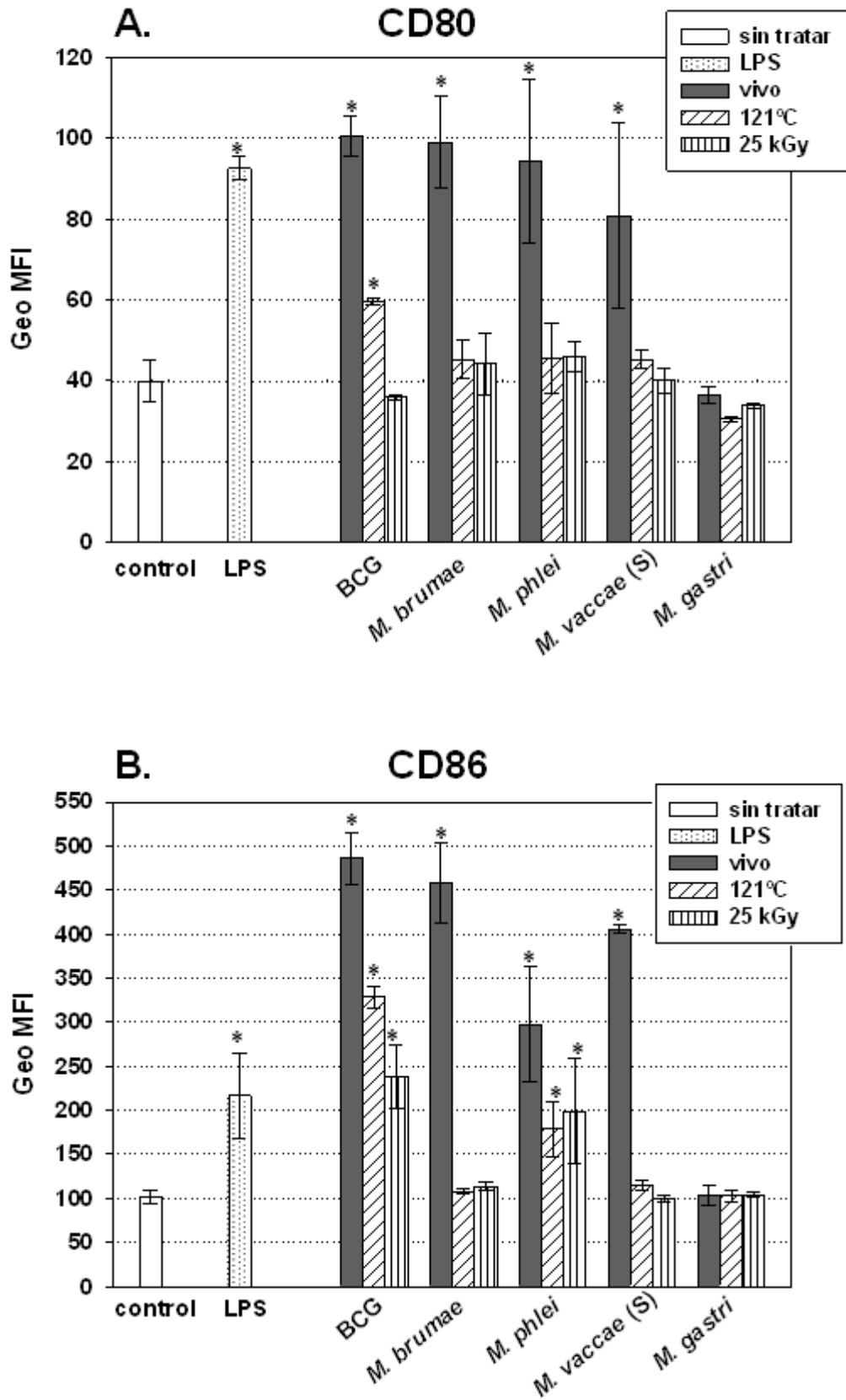


FIGURA 9 (cont.)

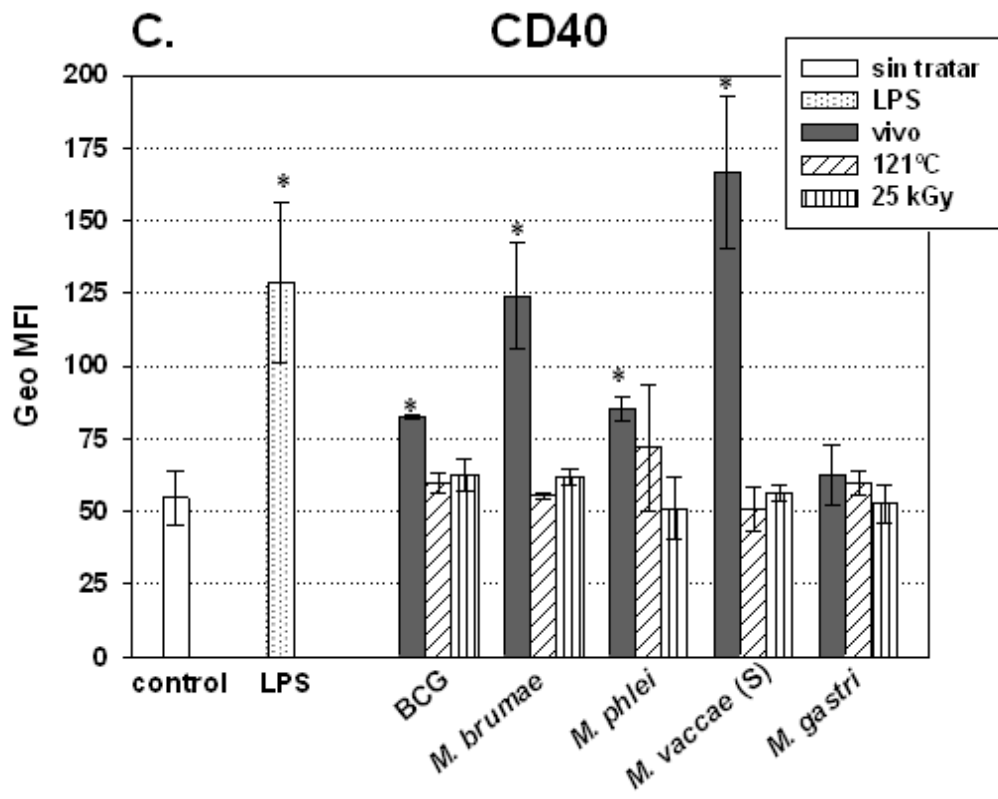


FIGURA 10

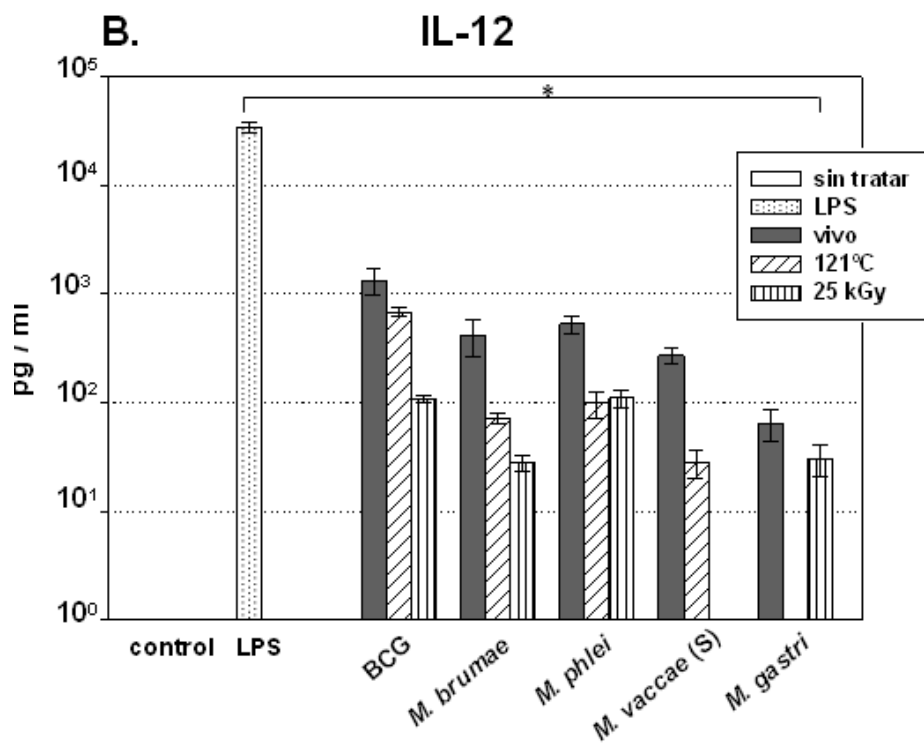
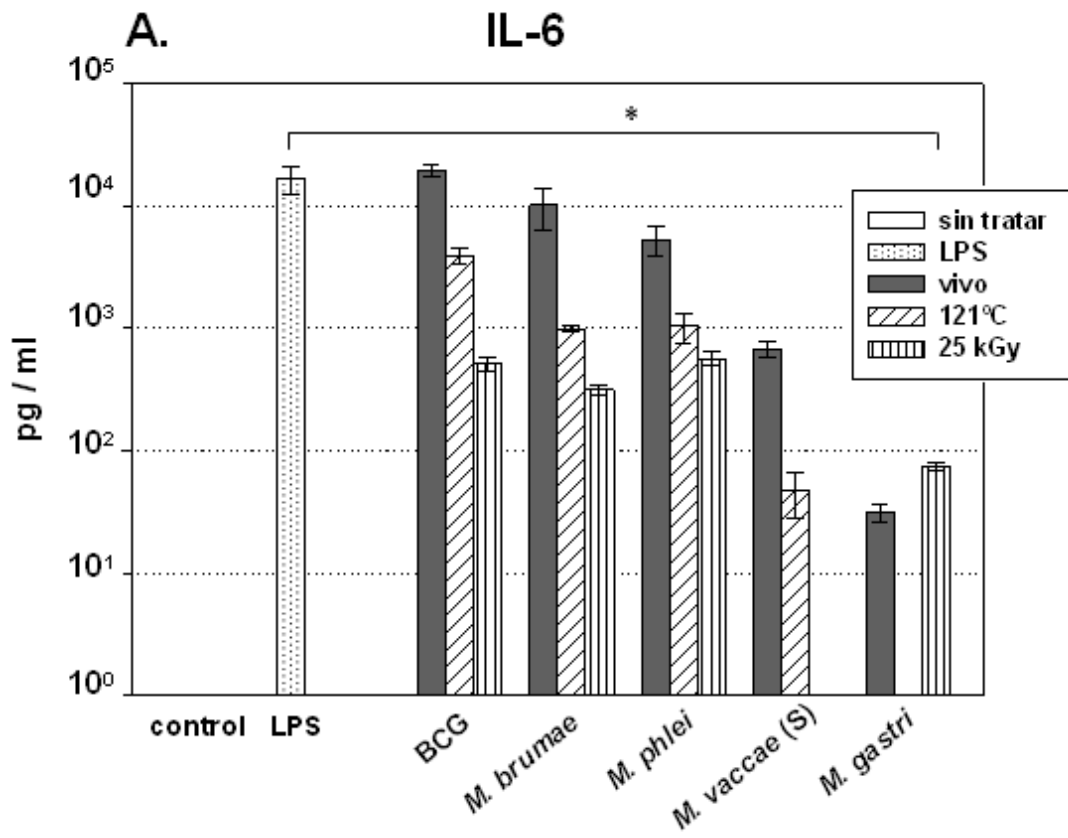


FIGURA 11

	Control	BCG	<i>M. spp.</i>	<i>M. gastri</i>
IL-10	430 ± 247	2814 ± 946 [*]	1848 ± 22 ^{*&}	362 ± 120 ^{&}
IL-12	594 ± 19	2043 ± 681 [*]	12648 ± 2052 ^{*&}	806 ± 185 ^{&}
TNF-α	93 ± 14	2633 ± 390 [*]	1592 ± 641 [*]	252 ± 25 ^{*&}
IL-6	169 ± 2	14655 ± 315 [*]	15991 ± 1461 [*]	355 ± 32 ^{&}
KC	372 ± 18	23432 ± 1347 [*]	6212 ± 295 ^{*&}	735 ± 43 ^{*&}
RANTES	875 ± 45	14743 ± 1588 [*]	57347 ± 6939 ^{*&}	4718 ± 704 ^{*&}
IP-10	233 ± 21	454 ± 81 [*]	2491 ± 163 ^{*&}	936 ± 70 ^{*&}

FIGURA 12

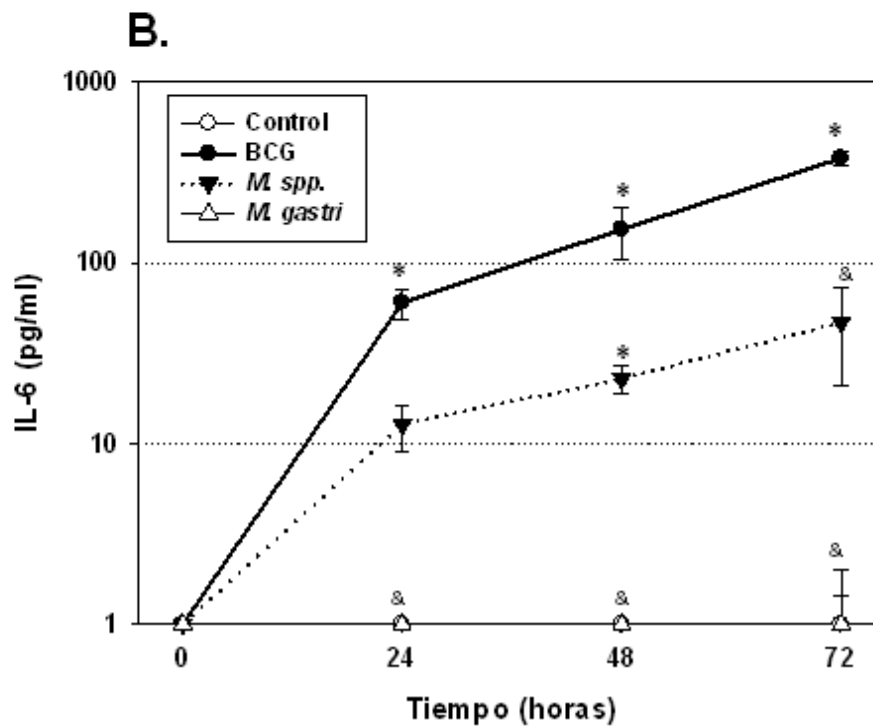
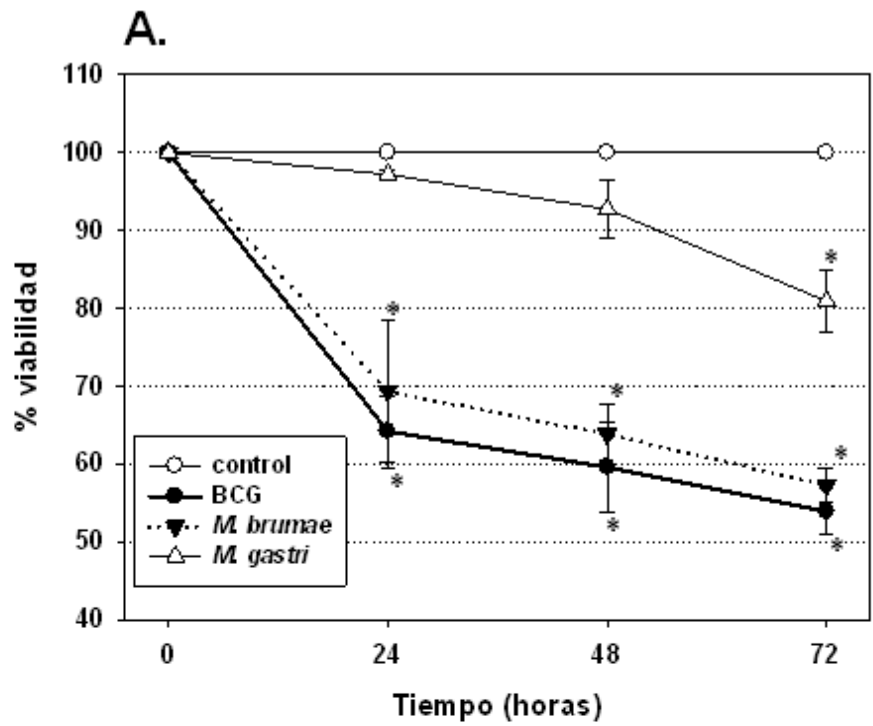


FIGURA 12 (cont.)

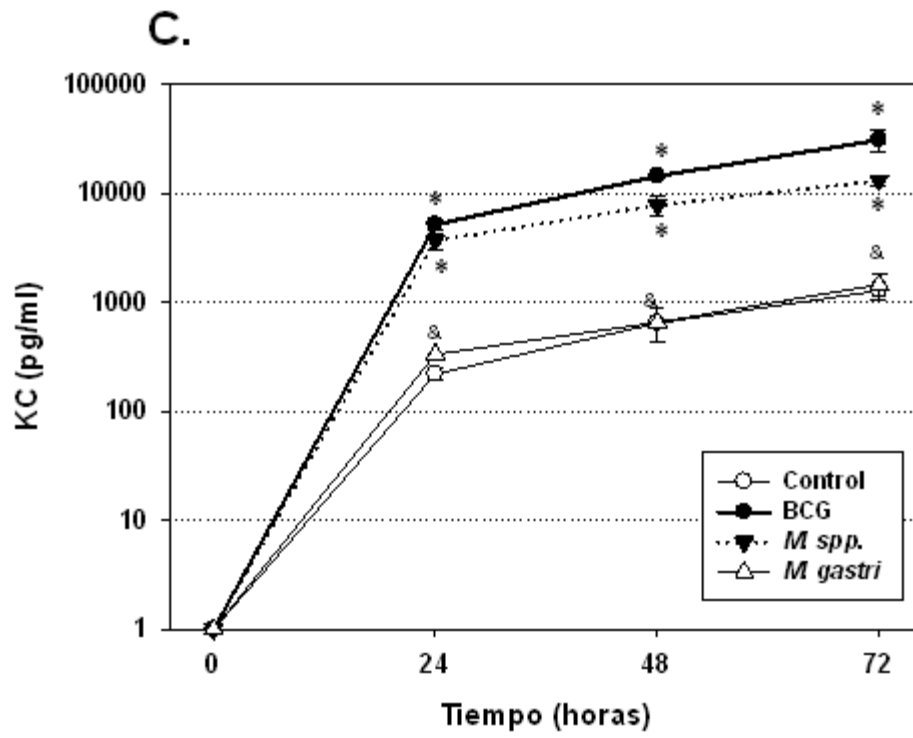


FIGURA 13

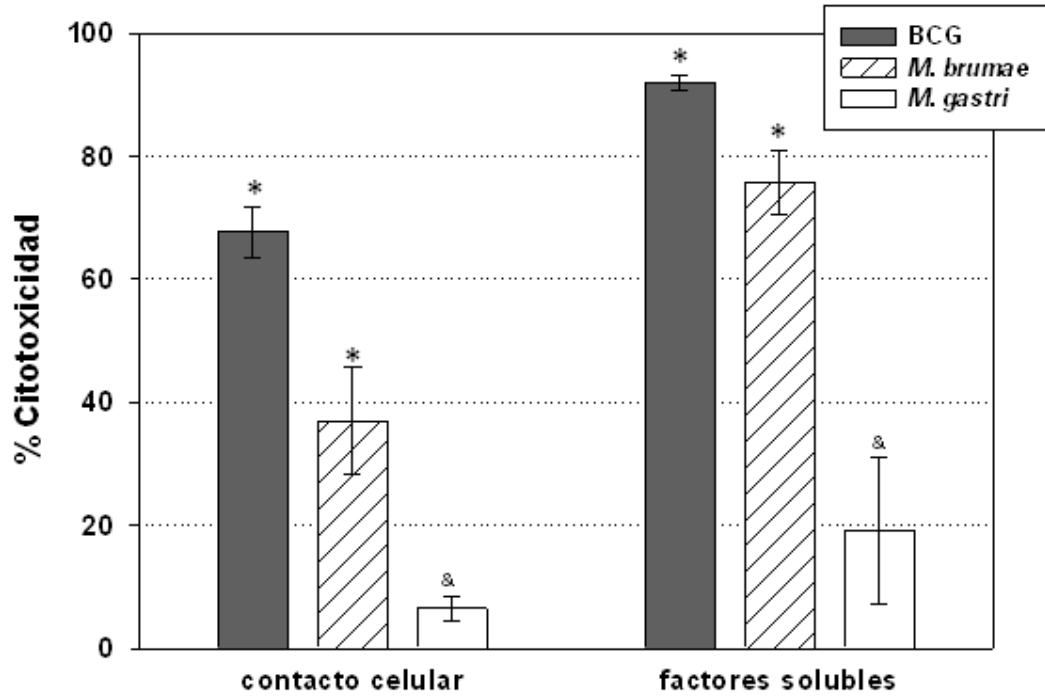


FIGURA 14

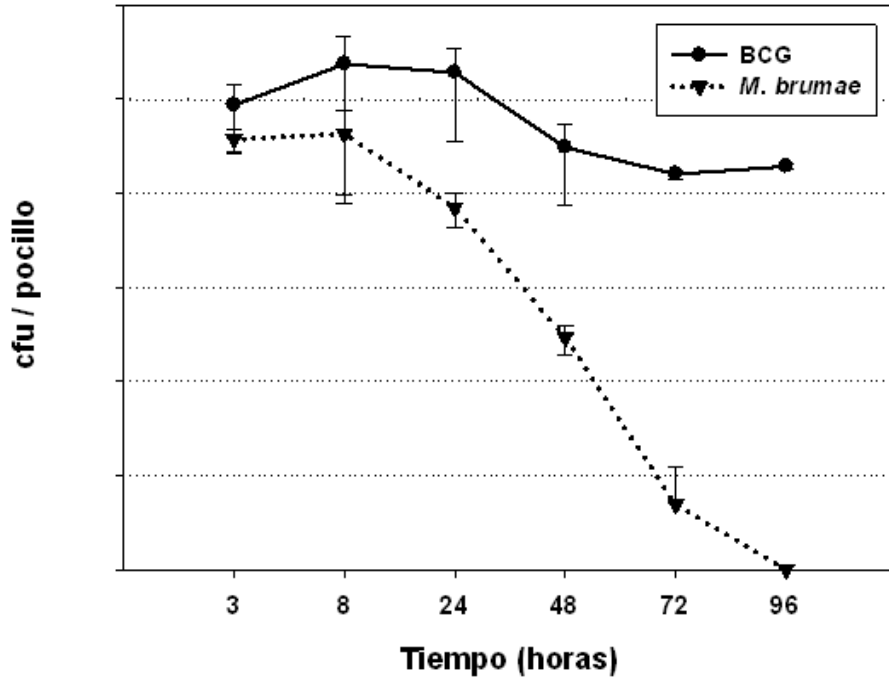
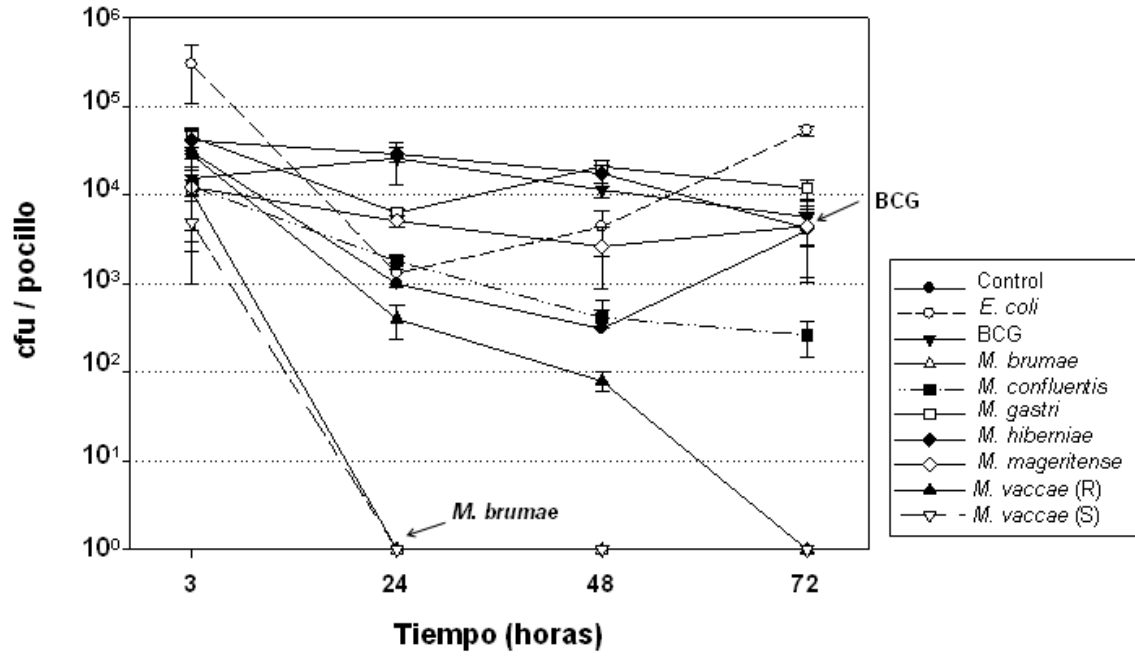


FIGURA 15



5

FIGURA 16

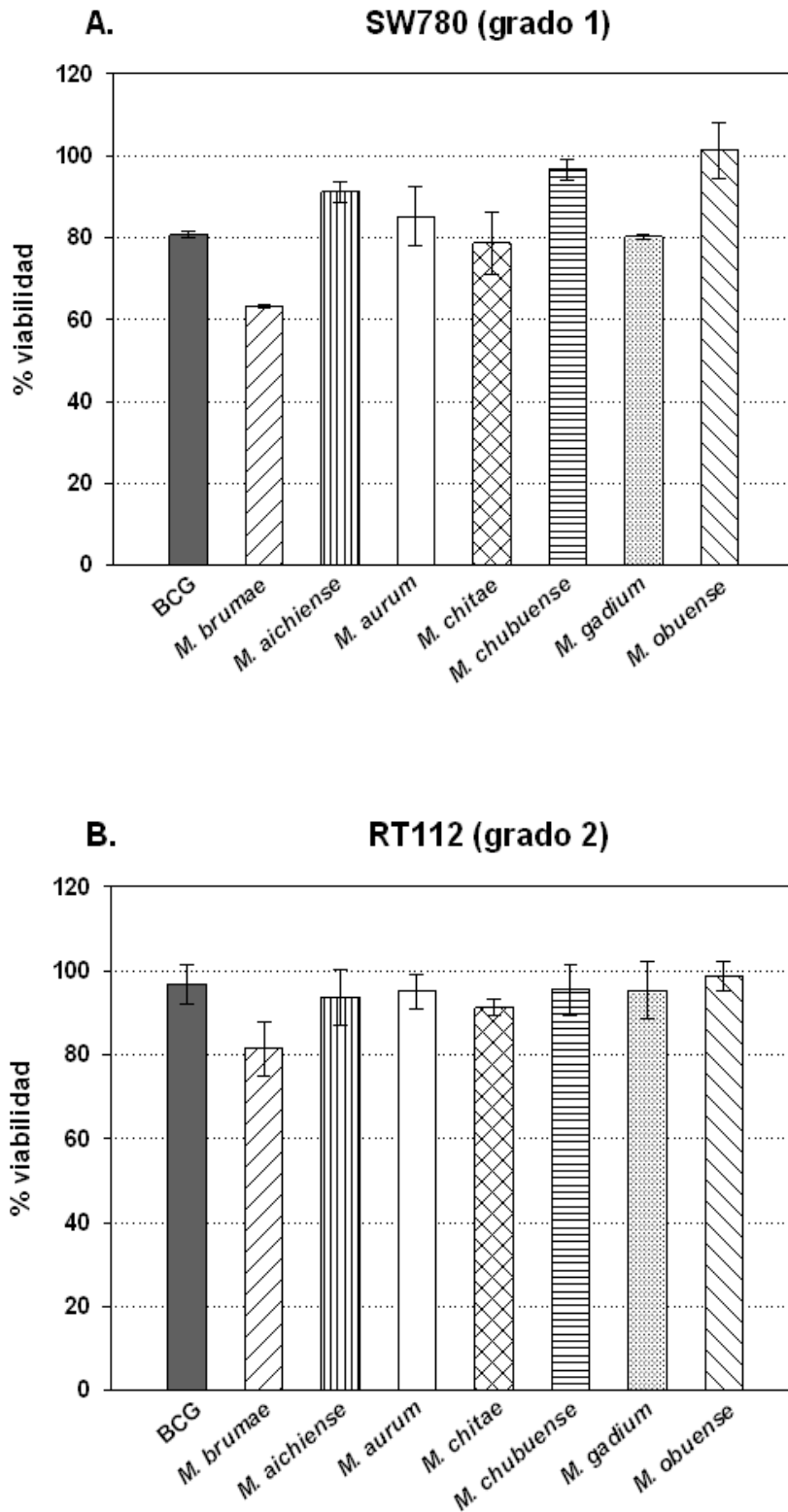
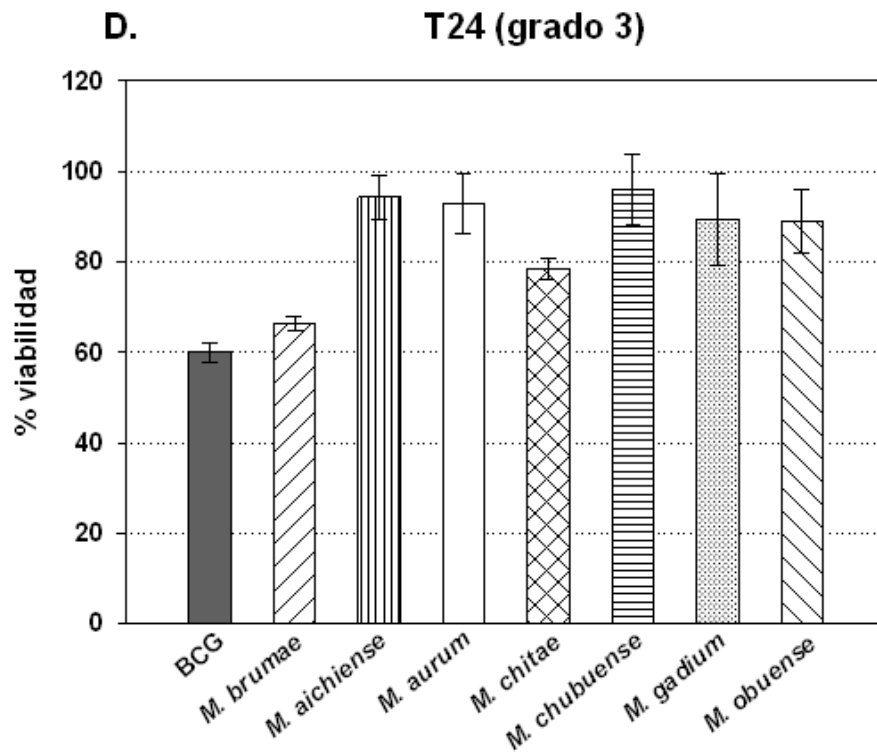
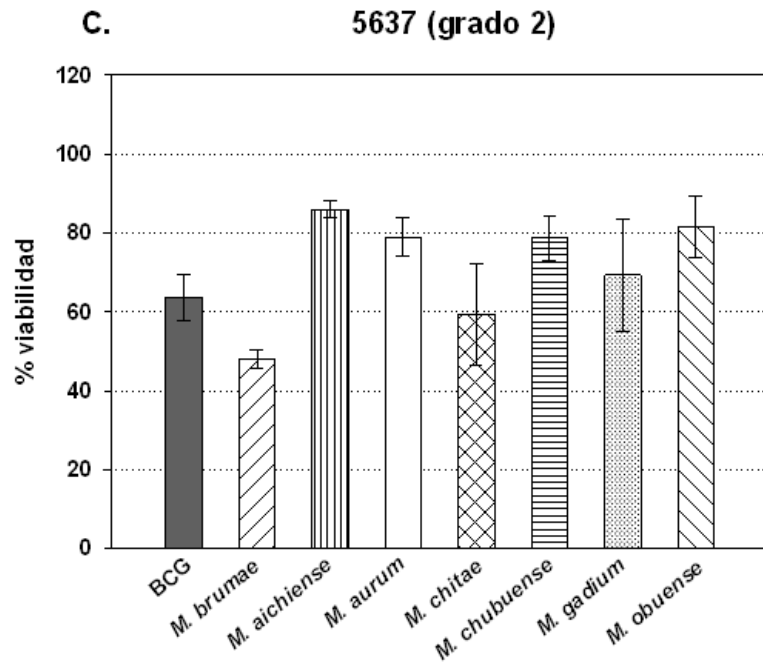


FIGURA 16 (cont.)





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201231202

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K35/74** (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	YUKSEL Z. S. et al. Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. J Mol Microbiol Biotechnol. 19.02.2011, Vol. 20 (1), páginas 24-28 (todo el documento)	1-4, 7, 10
X	MATSUSHIMA M. et al. Enhanced antitumor effect of combination intravesical mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin therapy in an orthotopic bladder cancer model. Oncology Letters. 2011, Vol. 2, páginas 13-19 (todo el documento)	5, 6, 8, 9, 11
X	SOLOWAY M. S. et al. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. The Journal of Urology. 04.2002, Vol. 167, páginas 1573-1583 (todo el documento)	5, 6, 8, 9, 11
X	RINTALA E. et al. Alternating mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin instillation therapy for carcinoma in situ of the bladder. The Journal of Urology. 12.1995, Vol. 154, páginas 2050-2053 (todo el documento)	5, 6, 8, 9, 11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.10.2012

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5,6,8,9,11	SI
	Reivindicaciones 1-4, 7,10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YUKSEL Z. S. et al. J Mol Microbiol Biotechnol. Vol. 20 (1), páginas 24-28	19.02.2011
D02	MATSUSHIMA M. et al. Oncology Letters. Vol. 2, páginas 13-19	2011
D03	SOLOWAY M. S. et al. The Journal of Urology. Vol. 167, páginas 1573-1583	04.2002
D04	RINTALA E. et al. The Journal of Urology. Vol. 154, páginas 2050-2053	12.1995

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto el uso de *Mycobacterium brumae* para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de vejiga (reivindicaciones 1 y 2) y, más concretamente, al tratamiento del cáncer de vejiga superficial no invasivo (reivindicación 3) en grado 1 y 2 de diferenciación (reivindicación 4) pudiendo combinarse tal tratamiento con un citostático (reivindicaciones 5 y 6). También tiene por objeto la composición farmacéutica que comprende la micobacteria *Mycobacterium brumae* sola o en combinación con un citostático (reivindicaciones 7 a 11).

D01 expone que la administración intravesical del bacillus de Calmette-Guérin es ampliamente utilizado en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga.

D02 explica que la terapia intravesical con el bacillus de Calmette-Guérin (BCG) es muy útil en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer de vejiga no músculo-invasivo.

D03 revisa la información existente en relación al carcinoma de vejiga de estadio T1 que afecta a la lámina propia y está asociado con una elevada recurrencia.

D04 tiene como objetivo comprobar si alternar quimioterapia e inmunoterapia mejora la eficacia y reduce la toxicidad en pacientes con carcinoma de vejiga.

NOVEDAD

D01 expone que la administración intravesical del bacillus de Calmette-Guérin es ampliamente utilizado en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga aunque, debido a su patogenicidad y efectos secundarios, se están investigando otras alternativas entre 88 variedades de micobacterias. De ellas, se seleccionaron 12 para el tratamiento de tumores superficiales de vejiga una de las cuales es *Mycobacterium brumae*.

En consecuencia, las características de las reivindicaciones 1-4, 7 y 10 ya son conocidas por lo que esas reivindicaciones no se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica ni, por tanto, presentan actividad inventiva.

ACTIVIDAD INVENTIVA

D02 explica que la terapia intravesical con el bacillus de Calmette-Guérin (BCG) es muy útil en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer de vejiga no músculo-invasivo aunque, debido al elevado número de tumores recurrentes, se están explorando otras posibilidades. Así, examina el efecto antitumoral de la administración intravesical combinada y simultánea de BCG con mitomicina C (MMC) dando como resultado un efecto antitumoral mayor que BCG solo y con dosis muy inferiores.

D03 revisa la información existente en relación al carcinoma de vejiga de estadio T1 que afecta a la lámina propia y está asociado con una elevada recurrencia. El tratamiento inicial consiste en una completa resección transuretral y posterior administración intravesical de BCG. La administración inmediata de mitomicina C disminuye el riesgo de recurrencia. También la resección completa seguida de la administración inmediata de mitomicina C primero y de BCG después durante 6 semanas da como resultado una baja recurrencia y progresión.

D04 tiene como objetivo comprobar si alternar quimioterapia e inmunoterapia mejora la eficacia y reduce la toxicidad en pacientes con carcinoma de vejiga. Para ello 40 pacientes fueron tratados con mitomicina C y 28 con mitomicina C y BCG de forma alterna. Se concluyó que la terapia combinada es más efectiva que el tratamiento con mitomicina C sólo y, comparado con la monoterapia con BCG, presenta menos efectos secundarios.

Así pues, es sobradamente conocido en el estado de la técnica el uso combinado de *Mycobacterium* junto con mitomicina C en el tratamiento del cáncer de vejiga superficial no invasivo y, por tanto, las reivindicaciones 5,6,8,9,11 no presentan actividad inventiva.