

Дана заявка стосується способів попередження відторгнення трансплантованих органів, тканин або клітин, а зокрема, способів, що передбачають конструювання такого типу клітин, які експресують білок LAG-3 при трансплантації хазяїну. Більш конкретно, даний винахід стосується продукування універсальної клітини-хазяїна для генної терапії, що експресує білок LAG-3 на своїй поверхні.

Ген активації лімфоцитів (LAG-3) є членом надродини імуноглобулінів, і селективно транскрибується в активованих Т-клітинах як у CD4⁺, так і у CD8⁺ і в NK-клітинах людини (Triebl et al., 1990). Дані про послідовність гена, порівняння його екзон/інтронної структури, і хромосомної локалізації виявили, що білок LAG-3, є близькостороннім CD4 (Baixeras et al., 1992). Крім того, близьке споріднення між LAG-3 і CD4 було наочно продемонстровано тим, що обидва ці білки мають той самий загальний ліганд, тобто, молекули MHC класу II (Baixeras et al., 1992). Проте, на противагу CD4, білок LAG-3 не зв'язується з др120 вірусу імунодефіциту людини (Baixeras et al., 1992). Експресія LAG-3 *in vivo* не була виявлена ні в первинних лімфоїдних органах, таких як, селезінка, ні в лімфоїдній тканині, асоційованій із слизуватою, ні в нормальних лімфатичних вузлах. Проте, цей білок легко виявлявся в збуджених піднебінних мигдалинах, або в лімфатичних вузлах із фолікулярною гіперплазією, що підтверджує ту точку зору, що навіть *in vivo*, LAG-3 експресується після активації (Huard et al., 1994A). Антиген-специфічна стимуляція Т-клітинних клонів в присутності моноклонального антитіла (mAb) проти LAG-3 призводить до підвищеного включення тимідину, до підвищеної експресії маркера активації CD25, і до збільшення продукування цитокінів (Huard et al., 1994B).

Відповідно до цього, додавання розчинної рекомбінантної форми LAG-3 інгібувало проліферацію антиген-специфічних Т-клітин, що дало підставу припустити регуляторну роль LAG-3 в активації CD4⁺ Т-лімфоцитів (Huard, 1996) і його участь у гальмуванні діючих імунних реакцій. Недавно було вказано, що LAG-3 також діє як корецептор для NK-клітин, і визначає різні механізми знищення пухлинних клітин, контрольованого незмінною імунною системою (Miyazaki et al., 1996).

Механізми, за допомогою яких розвивається Т-клітинна відповідь до чужорідного (алогенного або ксеногенного) білка або до клітини або до органа, поки ще не досить ясні. Антигенпрезентуючі клітини (АПК) мають хемотаксис до ділянок запалення або ушкодження (які можуть бути індуковані хірургічною трансплантацією). Популяція Т-клітин на периферії здійснює постійний "нагляд" за тканинами з метою виявлення патогенів або присутності чужорідної (ало- або ксеногенної) тканини. Після розпізнавання сигналів, "тривоги", МНС захоплюють цей білок, гідролізують його, і презентують його імунній системі хазяїна.

Були сконструйовані алогенні або сингенні пухлинні клітини, що експресують вірусний IL-10, що індукує локальну толерантність до пухлин. Таке лікування не впливає на відторгнення нетрансдукованої пухлини на віддаленій ділянці (Suzuki et al., 1995). Очевидно, що IL-10, що поставляється локально, індукує зрушення популяції Т-клітин, які є реактивними стосовно трансплантованих клітин, убік фенотипу T_H2, який не є цитолітичним і може навіть бути протективним.

Клітини, які у нормі експресують Fas-ліганд, були трансплантовані крізь алогенні або екзогенні бар'єри без імуносупресії. Нагляд хазяйських Т-клітин за ділянкою імплантації призводив до їх знищення при контакті з Fas-лігандом (Bellgrau et al., 1995). Більш того, відторгнення алотрансплантата панкреатичних острівців запобігалось котрансплантацією сингенних міобластів, генетично сконструйованих для експресії Fas-ліганда (Lau et al., 1996).

Імунна система має здатність швидко ідентифікувати чужорідну, патологічну або збуджену тканину, і швидко руйнує її. Це явище завжди створювало великі перешкоди для трансплантації тканини, органа або клітини, а також для генної терапії. Головні проблеми пов'язані, в основному, з хронічною імуносупресією, інкапсулюванням або імуноізоляцією. Небажаними побічними ефектами хронічної імуносупресії є підвищена сприйнятливості до умовно-патогенної інфекції і утворенню пухлини.

Можливість домогтися тривалої приживлюваності трансплантованої тканини у відсутності безперервної імуносупресії давно є давньою метою дослідників в області медицини людини.

Цитування будь-якого документа в даному описі не означає, що заявник вважає цей документ прототипом, або вважає розглянутий матеріал патентоспроможним згідно з будь-яким із заявлених пунктів формули винаходу даної заявки. Будь-яка вказівка на вміст або дату будь-якого документа заснована на інформації, відомої заявнику в момент подання заявки, і не повинна розглядатися як підтвердження точності такої вказівки. Короткий опис винаходу.

Згідно з даним винаходом було виявлено, що трансплантація клітин, які експресують білок LAG-3 на своїй поверхні, призводить до захисту трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна.

Таким чином, даний винахід стосується генетично сконструйованої клітини, яка може бути частиною трансплантованої тканини або трансплантованого органа, і яка включає ДНК, що кодує трансмембранний білок LAG-3 на своїй поверхні, що призводить до захисту трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна; при цьому, зазначеною ДНК є геномна ДНК або «ДНК. Зазначена ДНК може бути екзогенною, або, у конкретному варіанті здійснення винаходу, ендогенною ДНК, експресія якої активується або модифікується шляхом спрямованої інсерції регуляторної послідовності або ампліфікуемого гена за допомогою гомологічної рекомбінації. Білок LAG-3 являє собою білок, який розпізнається антитілами, спрямованими проти LAG-3.

У тому випадку, коли клітина є частиною трансплантуємої тканини або трансплантуємого органа, трансфекція LAG-3-ДНК може бути здійснена безпосередньо в тканині або органі, який підлягає трансплантації.

Зокрема, ця клітина являє собою універсальну клітину-хазяїна для генної терапії, яка є відповідною, наприклад, для будь-якого виду соматичної або *ex vivo* генної терапії.

У конкретному варіанті здійснення винаходу, клітина-хазяїн для генної терапії, крім того, включає екзогенну ДНК, що кодує потрібний терапевтичний агент; і ці генетично сконструйовані клітини використовують в якості терапевтичного агента. Термін "терапевтичний", використовуваний у даному описі, стосується лікування та/або профілактики.

У ще одному варіанті здійснення винаходу, ген, який кодує потрібний терапевтичний агент, є присутнім у геномі клітини, і ця клітина, крім того, включає екзогенну ДНК, що кодує регуляторну послідовність, або ген, що

ампліфікує, для активації або модифікації експресії потрібного ендогенного гена.

Генетично сконструйована клітина даного винаходу може, так чи інакше, містити тільки екзогенну LAG-3-ДНК, що може бути використана в суміші з іншими клітинами-хазяїнами для генної терапії, що містять потрібну терапевтичну ДНК.

Клітину даного винаходу переважно, вибирають із міобластів, фібробластів, гемопоетичних стовбурових клітин, ембріональних стовбурових клітин, фетальних гепатоцитів, ендотеліальних клітин пуповинної вени, і клітин CHO.

Клітини, зазначені вище, що походять від трансгенних тварин, також входять в об'єм даного винаходу.

Іншою метою даного винаходу, є використання трансмембранного білка LAG-3, включаючи його мутанти і варіанти, експресовані на поверхні клітин, у приготуванні лікарських засобів для індукування захисту трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна.

Крім того, даний винахід стосується використання клітин, які містять ДНК, що кодує трансмембранний білок LAG-3, що експресується на поверхні цієї клітини, у виготовленні лікарських засобів для індукування захисту трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна.

В об'єм даного винаходу також входить використання зазначеної клітини, що експресує LAG-3 на своїй поверхні, у виготовленні лікарського засобу, що змішується з клітинами, тканинами або органами, що експресують, для індукування захисту трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна. Короткий опис малюнків

Фіг.1 - Цитотоксична активність спленоцитів стосовно клітин LH-CHO, де зазначені спленоцити були отримані від миші, примованої клітинами LAG-3-CHO або LH-CHO. Наводяться середні значення (\pm ст. відхил.) для 5 мишей, як зазначено в написі до малюнка; були також оцінені 2 інтактні миші.

Фіг.2 - цитотоксична активність спленоцитів стосовно клітин LAG-3-CHO, де зазначені спленоцити були отримані від миші, примованої клітинами LAG-3-CHO, або LH-CHO. Наводяться середні значення (\pm ст. відхил.) для 5 мишей, як зазначено в написі до малюнка; були також оцінені 2 інтактні миші.

Фіг.3 - Карта вектора, що експресує, Да ссавця. Використовувані скорочення: DHFR, одиниця транскрипції дегідрофолатредуктази (Subramani et al., 1981); pML, похідне pBR322 (Lusky & Botchan, 1981); hAIVSA, фрагмент від інтрона A α -субодиниці глікопротеїнових гормонів людини (Fiddes & Goodman, 1981); MMT-1, промотор мишиного металотіонеїна 1 (Hamer & Walling, 1982). Докладний опис винаходу

Щороку сотні тисяч людей вмирають від серцевої недостатності, ниркової недостатності, печінкової недостатності, дихальної недостатності, або від недостатності функції підшлункової залози. Єдиним найбільш ефективним лікуванням є трансплантація.

Лікування, зв'язане з трансплантацією клітин, тканин або органів, індукує загальний імунотективний стан в організмі хазяїна стосовно імплантованих клітин, тканин або органів. Бажано забезпечити специфічний захист трансплантата від його відторгнення імунною системою хазяїна, зокрема, при алогенній трансплантації, ксеногенній трансплантації і генній терапії. При цьому, також бажано інгібувати толерантність до пухлинних тканин або яким-небудь іншим способом забезпечити реакцію імунної системи хазяїна на пухлинну тканину.

Відповідно до цього, даний винахід стосується усіх вищеописаних способів використання виявленого факту, що трансплантація клітин або тканин, що експресують трансмембранний білок LAG-3, сприяє захисту трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна.

У даному винаході використані тільки що відкритий ген і білок, LAG-3, який звичайно експресується на активованих Т-клітинах і активованих NK-клітинах.

Термін трансмембранний білок LAG-3, використовуваний у даному описі, означає трансмембранний білок, який містить екстрацитоплазматичний домен LAG-3, його солі, функціональні похідні, попередники, і активні фракції, а також його активні мутанти і його активні варіанти, кожний із яких експресується на поверхні клітини.

Цей термін також означає трансмембранний білок, який експресується в його природному стані, або який може бути гібридизований, наприклад, методами генної інженерії, з іншим білком, таким як глікозилфосфатиділінозит-вміщуючий "якір", або з будь-якими відповідними фрагментами іншого трансмембранного білка, наприклад, TNF-рецептора, M_pL-ліганда або трансмембранного імуноглобуліну.

Термін "солі", використовуваний у даному описі, означає солі карбоксильних груп і солі функціональних аміно-груп сполук, одержуваних добре відомими способами. Солі карбоксильних груп включають неорганічні солі, наприклад, солі натрію, калію, кальцію, і солі, утворені з органічними основами, наприклад, з амінами, такими як, триетаноламін, аргінін або лізин. Солі аміногруп включають, наприклад, солі неорганічних кислот, таких як соляна кислота, і солі органічних кислот, таких як, оцтова кислота.

Термін "функціональні похідні", використовуваний у даному описі, означає похідні, які можуть бути отримані відомими методами з функціональних груп, які присутні на бічних ланцюгах амінокислотних молекул або на кінцевих N- або C-групах, і які входять в об'єм даного винаходу, за умови, що вони є фармацевтично прийнятними, тобто не порушують активності білка або токсично не впливають, входячи до складу фармацевтичних композицій. Такими похідними є, наприклад, складні ефіри або аліфатичні амідні карбоксильних груп і N-ацильні похідні вільних аміногруп або O-ацильні похідні вільних гидроксильних груп, і похідні, утворені ацильними групами, наприклад, алканойльними або ароїльними групами.

Термін "попередники" означає сполуки, що перетворюються в LAG-3 в організмі людини або тварини.

Термін "активні фракції" білка даного винаходу означає будь-який фрагмент або попередник поліпептидного ланцюга самої сполуки, узятий окремо або в комбінації із зв'язаними з ним родинними молекулами або залишками, наприклад, із залишками цукру або фосфатів; або агрегати поліпептидних молекул, за умови, що такі фрагменти або попередники, використовувані з якості лікарського засобу, мають активність, аналогічну активності LAG-3.

Термін "активні фракції", переважно, означає розчинні фракції позаклітинної частини білка LAG-3, включаючи один або декілька з чотирьох доменів D1, D2, D3, D4, позаклітинного домена LAG-3

Термін "активні мутанти", використовуваний у даному описі, означає інші білки або поліпептиди, де одна або декілька амінокислот цієї структури делетовані або замінені іншими амінокислотами, або де одна або

декілька амінокислот додані до даної послідовності з одержанням поліпептидів або білків, які мають активність, аналогічну активності LAG-3. Так, наприклад, Arg 73 та/або Arg 75 та/або Arg 76 можуть бути замінені іншою амінокислотою, переважно, Glu.

Термін "активні варіанти" LAG-3 означає альтернативно сплайсовані варіанти, а також усі первинні генні транскрипти, які виникають в результаті механізмів альтернативного сплайсингу в різних сайтах розщеплення генів. Кращими варіантами є розчинні або трансмембранні білки, що не мають доменів D3 та/або D4 у позаклітинній частині LAG-3, і які необов'язково вміщують декілька додаткових амінокислот після домена D2 або D3.

Експресія трансмембранного білка LAG-3 на поверхні клітин підтверджується імунореактивними методами. Трансмембранний білок розпізнається, наприклад, антитілами 11E3 проти LAG-3 (№ депозиту CNCM 1-1612), 17B4 (№ депозиту CNCM 1-1240) або 15A9 (№ депозиту CNCM 1-1239).

Даний винахід також стосується суміші поліпептидів і похідних, зазначених вище.

Термін "LAG-3", "білок LAG-3" або "молекула LAG-3", використовуваний в описі і формулі винаходу у виразі "експресія LAG-3, білка LAG-3 або молекули LAG-3", означає природні, синтетичні і рекомбінантні форми поліпептиду, а також усі визначення, описані вище.

Клітини даного винаходу можуть бути відібрані з первинних або вторинних клітин. Використовуваний у даному описі термін "первинна клітина" означає клітини, що є присутніми у суспензії клітин, виділених із джерела тканини хребцевих (перед тим, як вони були засіяні, тобто, зв'язані із субстратом культури тканини, таким як чашка або колба); клітини, що є присутніми в експлантаті, отриманому з тканини; клітини обох із вищевказаних типів, засіяних першим разом; і клітинні суспензії, отримані з цих засіяних клітин. Термін "вторинна клітина" або "клітинний штам" стосується клітин у всіх наступних стадіях культивування. Таким чином, першим разом посіяна первинна клітина видаляється з культурального субстрату і засівається знову, і така клітина іменується в даному описі вторинною клітиною, як і всі клітини в наступних пасажах. Вторинними клітинами є клітинні штами, що складаються із вторинних клітин, які були пасивовані один або декілька разів. Клітинний штам складається з вторинних клітин, які: 1) були посіяні один або декілька разів; 2) мають обмежену кількість середніх подвоєнь популяції в культурі; 3) мають здатність до контакт-інгібованого субстрат-залежного росту (ріст на субстраті не застосовується до клітин, які розмножуються в суспензійній культурі); і 4) не є іморталізованими. Термін "клональний клітинний штам" означає клітинний штам, який походить від одиначної стовбурової клітини. Термін "гетерологічний клітинний штам" означає клітинний штам, який походить від двох або декількох стовбурових клітин.

Даний винахід стосується первинних і вторинних соматичних клітин, таких як, фібробласти; кератиноцити, епітеліальні клітини; ендотеліальні клітини; гліальні клітини; нервові клітини; формені елементи крові; м'язові клітини; інші соматичні клітини, які можуть бути культивовані; і попередники соматичних клітин, де всі зазначені клітини є трансфікованими екзогенною ДНК, стабільно інтегрованою в їх геном, або епісомально експресованою у клітинах. Отримані клітини називаються, відповідно, трансфікованими первинними клітинами і трансфікованими вторинними клітинами.

Якщо ген, що кодує молекулу LAG-3, вводять у клітини ссавців, і ці клітини трансплантують алогенному або ксеногенному хазяїну, то вони впізнаються імунною системою хазяїна, але при цьому, імунна відповідь не виробляється.

Імунна система хазяїна стає нездатною відторгати клітини, які, у протилежному випадку, тобто у випадку, якщо вони не були б сконструйовані так, щоб вони експресували на своїй поверхні молекули LAG-3, повинні були б відторнутися. LAG-3 може також експресуватися на клітинній поверхні клітин не родинного типу, і може бути змішаний із трансплантованими клітинами або тканинами, що призводить до результатів, аналогічних описаним вище. Таким чином, даний винахід стосується трансплантації клітин, тканин або органів, в основному, без індукування загальної імуносупресії.

Ці клітини, тканини або органи трансплантують з метою введення білків або індукування деяких функцій, необхідних для лікування деяких захворювань. Вони можуть приживлятися в організмі хазяїна шляхом використання механізму, за допомогою якого білок LAG-3 презентується імунній системі хазяїна.

Профілактика відторгнення трансплантованих специфічних клітин, тканин або органів у реципієнта може бути також досягнута шляхом спільного введення фібробластів або інших первинних або вторинних клітин, що були сконструйовані так, що вони експресують LAG-3. Цей протективний статус може бути обумовлений локальним або загальним інгібуванням механізмів, що опосередують імунні відповіді. Зазначений протективний статус може бути обумовлений анегією, делецією, несприйнятливістю, толерантністю або попередженням клітинно-опосередкованої цитотоксичності. Після встановлення протективного статусу, він продовжується протягом тривалого періоду часу, або навіть триває безперервно, що обумовлено таким явищем, як інфекційна толерантність (Qin et al., 1993).

Даний винахід може бути використаний для трансплантації клітин, тканин, органів або клітин-хазяїв для доставки генів або генних продуктів, необхідних для різних медичних цілей.

Експресія гена LAG-3 може бути індукована за допомогою стандартної техніки рекомбінантних ДНК або техніки з використанням гомологічної рекомбінації для активації ендогенного гена LAG-3. Ці типи клітин можуть бути отримані від трансгенних тварин, які мають ген LAG-3, який експресується у специфічних тканинах або в неродинних клітинах, будь-яким методом. Потім ці клітини можуть бути змішані з клітинами, у яких було б бажано забезпечити захист від відторгнення трансплантата. Це дає підставу припустити, що локальна секреція імунопротективної молекули LAG-3 не має системної дії. LAG-3-трансдуковані нетрансформовані фібробласти дають аналогічну відповідь *in vivo*. Імунопротективні ефекти інокулята LAG-3-трансдукованих фібробластів є дозозалежними, але не залежать від джерела молекули LAG-3.

Спільне введення клітин LaG-3, що експресують, призводить до інактивації донорних Т-клітин, і, у той же час, до запобігання атакуючої дії імунної системи хазяїна. Це введення індукує специфічну анегію, толерантність або будь-який інший захист від клітинно-опосередкованої цитотоксичності у реципієнта, яка може потім призводити до тривалої зміни в імунному мікрооточенні, забезпечуючи захист проти ауто реактив

них Т-клітин. Це може бути досягнуто шляхом спільного введення невеликої кількості алогенних клітин кісткового мозку від здорового донора разом з алогенними клітинами людини, які були сконструйовані так, що вони експресують LAG-3. Це призводить до зниження кількості аутореактивних Т-клітин за допомогою розвитку мікрохімеризму (DeLANEY et al., 1996).

Люди із специфічними захворюваннями або дефіцитними станами можуть вилікуватися завдяки алогенній трансплантації безлічі різних клітин, тканин або органів. Так, наприклад, звичайно трансплантуються такі органи як, печінка, нирки, серце, підшлункова залоза, тонка кишка; і відповідними для трансплантації є такі клітини, як острівкові клітини, нервова тканина для лікування хвороби Паркінсона або вогнищевої епілепсії, гемопоетичні стовбурові клітини для лікування станів при хіміотерапії або променевої терапії, нормальні гепатоцити для лікування гіперхолестеринемії, клітини серцевої тканини для лікування інфаркту міокарда, і м'язові клітини для лікування м'язової дистрофії.

Введення алогенних трансплантатів кісткового мозку є досить важким завданням із ряду причин. Такими причинами є: відторгнення трансплантата; інфікування, обумовлене умовно-патогенною інфекцією в результаті контамінації трансплантата або імуносупресорних лікарських засобів; або інші причини. Відторгнення трансплантата може бути обумовлене резистентністю реципієнта до приживлення кісткового мозку донора, і тенденцією компетентних імунних клітин до індукування імунної відповіді у реципієнта, тобто, до індукування реакції "трансплантат проти хазяїна" (РТПХ). РТПХ може регулюватися шляхом виснаження Т-клітин у трансплантата, або шляхом спільного введення імуносупресорних лікарських засобів. При елімінації Т-клітин, імовірність приживлення трансплантата знижується.

В результаті елімінації Т-клітин, ризик відторгнення трансплантата зростає. Очевидно, ці клітини можуть грати важливу роль у приживленні трансплантата, таку як, вироблення цитокінів (KERNAL et al., 1987).

Було вказано, що тільки невелика кількість алогенних, але здорових клітин кісткового мозку може знижувати або навіть попереджати виникнення аутоімунних захворювань в експериментальних моделях. Проте, лікування таких хвороб призводить до індукування реакції "трансплантат проти хазяїна".

Трансплантація кісткового мозку була також використана в якості методу знищення деяких пухлин. Це може бути досягнуто завдяки здатності алогенних Т-клітин розпізнавати і знищувати пухлинну тканину, наприклад, при трансплантаційному лейкозі.

В усіх вищевказаних випадках, загальну імуносупресію можна запобігти шляхом створення призначених для трансплантації клітин або органів, які містили би ген, що кодує LAG-3, так, щоб при їх трансплантації хазяїну, експресувався білок LAG-3, і забезпечувався захист трансплантата.

Перша проблема, що виникає, при алогенній трансплантації, полягає в нестачі тканини людини необхідної для трансплантації тканини людини і у сильно зрослому в даний час попиті на постачання органів. Хоча ксенотрансплантація розглядається поки ще як експериментальна процедура, проте, вона є реальною альтернативою до алотрансплантації. В якості донорів клітин або органів в даний час використовуються тварини, такі, як свині або павіани. Захист від відторгнення трансплантата може мати важливе значення для успішного використання органів від різних видів тварин. Резистентність хазяїна може бути переборена, принаймні, частково. Наприклад, з використанням антитіл проти CD4, CD8, NK-клітин, або шляхом мікроінкапсулювання клітин тварин, призначених для трансплантації. Згідно з даним винаходом, тварини можуть бути трансгенно модифіковані, так, щоб у їх клітинах деяких типів, подібно острівковим клітинам, експресувався ген LAG-3, що може бути здійснено шляхом використання промотора гена інсуліну і системи доставки, або специфічної маркерної системи від інших тканин.

Очевидно, що експресія LAG-3 на пухлинній тканині грає важливу роль у резистентності до клітинно-опосередкованої реакції імунної системи хазяїна, спрямованої на пухлинні тканини. Відповідно до конкретного варіанта свого здійснення, даний винахід стосується використання генної терапії або ex vivo-обробки невеликої кількості пухлинної тканини і її реімплантації, причому, зазначена пухлинна тканина може бути модифікована так, щоб вона експресувала антигенові молекули LAG-3 або рибозими, специфічні до транскрипту LAG-3. Це повинно індукувати реакцію імунної системи на дану тканину, і "навчити" імунну систему руйнувати цю тканину. Невелика кількість пухлинної тканини може бути також оброблена антитілом проти LAG-3 для попередження LAG-3-індукованого інгібування Т-клітин, і продукування клітинної і гуморальної імунної відповіді проти цієї пухлини.

Генна терапія є в даний час найкращою для лікування ряду захворювань, включаючи, але не обмежуючись ними, дефіцит аденозиндезамінази (АДА), серпоподібноклітинна анемія, таласемія, гемофілія, цукровий діабет, дефіцит альфа-антитрипсину, порушення функцій головного мозку, такі як, хвороба Альцгеймера, і інші захворювання, такі як, порушення росту, і серцево-судинні захворювання, які викликаються змінами в шляху метаболізму холестерину, і порушення імунної системи.

Для трансплантації індивідуумам, які потребують такої трансплантації, можуть бути використані різні клітини, наприклад, міобласти для доставки дистрофіну; клітини, що секретують такий матеріал, як TPO, GH, EPO, фактор IX, або інші фактори; клітини крові для лікування не спадкових хвороб крові; і інші первинні клітини людини або тварин, такі як, ендотеліальні клітини, епітеліальні клітини, клітини сполучної тканини, фіброblastи, мезенхімальні клітини, мезотеліальні клітини, і паренхіматозні клітини.

Результати генної терапії були не зовсім вдалимими, що обумовлено рядом проблем. Навіть при найбільш успішних випробуваннях, в яких молода дівчина проходила курс лікування з використанням гена аденозиндезамінази (АДА), пацієнтці усе ще щотижня вводили ін'єкцію ПЕГ-АДА через побоювання, що одна генна терапія виявиться неефективною.

Один із недоліків існуючих на сьогоднішній день схем генної терапії полягає в тому, що вона вимагає індивідуального продукування клітин-хазяїв для попередження відторгнення клітини імунною системою хазяїна. Генна терапія повинна бути здійснена індивідуально для кожного окремого пацієнта. Крім того, було встановлено, що експресія трансгенів є, звичайно, короточасною, що обумовлено експресією інших вірусних білків, які "відволікають на себе" імунну систему хазяїна навіть при використанні аутологічних клітин для генної терапії.

Були використані атенювані аденовірусні вектори, але у цьому випадку виникають проблеми, пов'язані з іншими вірусними білками, які експресують, і які продукують імунну відповідь. Великі концентрації вірусу, навіть ослабленого, стимулюють запальну реакцію і імунну відповідь. Клітини імунної системи хазяїна "запам'ятовують" вірусний вектор, в результаті чого, наступні введення будуть менш ефективними.

Звичайно, у схемах генної терапії використовуються дефектні по реплікації аденовіруси, у яких був делетований вірусний білок E1. На жаль, вони володіють лише короточасною дією в дорослих імунотропних хазяїнів, що, мабуть, обумовлено імунною відповіддю, спрямованою проти аденовірусних або рекомбінантних білків (Kozarsky & Wilson, 1993; Barr et al., 1992; Stratford et al., 1992; Rosenfeld et al., 1992; Lemarchand et al., 1992). Тому існує крайня необхідність у розробці нових векторів, які не є такими імунотропними, або в розробці методів, що забезпечують імунологічний захист генетично сконструйованих клітин.

Ці вектори були отримані з високим титром, що має аж до 10^{11} колонієутворюючих одиниць на один мл, і вони інфікують багато клітин, які реалізуються і які не реплікуються. Дефектні по реплікації аденовіруси використовують для доставки фізіологічних рівнів рекомбінантного білка в систему кровообігу. Ген LAG-3 знаходиться, переважно, під транскрипційним контролем конститутивно активного клітинного промотора EF1a і енхансера 4F2HC (Tripathy et al., 1994).

Були зроблені спроби уникнути цієї проблеми шляхом інкапсулювання клітин і шляхом індукування імуносупресії хазяїна.

У методах, описаних в даній заявці, ксеногенні або алогенні клітини можуть бути використані в якості хазяїнів для генної терапії, що експресують молекулу LAG-3 на своїй поверхні, в результаті чого буде забезпечуватися захист трансплантата від відторгнення імунною системою хазяїна. Такими клітинами є, наприклад, міобласти, фібробласти, гемопоетичні стовбурові клітини, ембріональні стовбурові клітини, фетальні гепатоцити, ендотеліальні клітини пуповинної вени, або клітини СНО. Клітини-хазяї для генної терапії можуть бути також сконструйовані так, щоб вони експресували ген тимідинкінази вірусу простого герпесу. Такі клітини можуть бути специфічно зруйновані шляхом додавання ганцикловіру.

Клітинні, сприйнятливі до tk-ганцикловіру мають перевагу перед несприйнятливими клітинами, що полягає в тому, що вони можуть бути видалені в будь-який час (Bi et al., 1993).

Універсальна клітина-хазяїн, отримана згідно з даним винаходом, експресує ген LAG-3 і ген Hsv-tk на своїй поверхні, що дозволяє, тим самим, генерувати універсальні клітини-хазяї для генної терапії, які можуть бути імплантовані без індукування імуносупресії, і які можуть бути зруйновані в будь-який час, коли їх активність більше не потрібна.

Алогенні або ксеногенні клітини-хазяї для генної терапії даного винаходу, які експресують трансген та/або ген LAG-3, можуть бути сконструйовані будь-якими методами переносу гена, такими як, але не обмежуючись ними, метод із використанням дефектних по реплікації вірусів, аденоасоційованого вірусу, ретровірусу високої ефективності; пряма ін'єкція ДНК у кістковий, мозок; електропорація, трансфекція з використанням фосфату кальцію; мікроін'єкція;

інкапсуляція в ліпосоми або "тіні" еритроцита. Клітини, що експресують LAG-3, такі як, міобласти, або клітини СНО, можуть бути введені разом із клітинами, що експресують потрібний білок, для тривалого приживлення. Якщо досить короточасного впливу LAG-3, то LAG-3-трансфіковані міобласти або клітини СНО можуть містити ген "-самогубця", такий як, ген tk, згаданий вище, так, щоб вони могли бути видалені після введення ганцикловіру.

Цей метод може бути використаний для відновлення нормальної функції при введенні гена або генного продукту, або для видалення або інактивації гена, який небезпечний для організму (такий як, онкоген). Ця мета може бути також досягнута шляхом імплантації клітин, які доставляють рибозими або антизмістову «ДНК для інгібування продукування небажаного білка, такого як, білки ВІЛ або чинники росту. Цей метод може бути використаний для корекції стану дефіциту ферментів, такого як, короба Гоше або дефіцит АДА.

Відповідно до іншого варіанта свого здійснення, даний винахід стосується способу генної терапії, що передбачає: (i) введення в обрані клітини людини або тваринного гена, необхідного для цієї терапії, і гена, що кодує молекулу LAG-3; і (ii) введення пацієнту клітин, отриманих у стадії (i). Альтернативно, вищевказані гени можуть бути введені в тканину або орган пацієнта *in vivo* шляхом прямої трансфекції генів як таких, або в носії, який доставляє ці гени в таку тканину або орган.

Так, наприклад, заявлена система експресії дозволяє робити ін'єкцію "оголений" ДНК або вірусному вектору безпосередньо в клітини визначеного типу, такі як, м'язові клітини, або вводити їх безпосередньо в дихальні шляхи (наприклад, для лікування кістозного фіброзу). Ця конструкція містить не тільки потрібний ген (такий як, ген-регулятор провідності (кДНК CFTR), але також і ген LAG-3, призначений для коекспресії на клітині зазначеного типу з метою попередження можливої гуморальної імунної відповіді, наприклад, проти капсидних аденовірусних білків, яка може обмежувати ефективність повторного введення. Для усунення побічної дії, яка полягає в супресії імунних клітин, що швидко діляться, яка викликається хіміотерапією, може бути використаний перенос гена в гемопоетичні стовбурові клітини з метою введення генів резистентності до декількох лікарських засобів. Для стимуляції розподілу стовбурових клітин можуть бути використані ретровірусні вектори в комбінації з цитокінами, такими як, фактор Steel, ліганд з готового набору, IL-3, GM-CSF, IL-6, G-CSF, LIF, IL-12.

Обрані клітини можуть бути котрансфіковані, крім гена LAG-3, генами, що кодують інші імуносупресорні агенти, такі як, IL-10, TGF- β , Fas-ліганд.

У конкретному варіанті здійснення даного винаходу, вищезазначені способи використовуються для лікування реципієнта з використанням невеликої кількості клітин, що являють інтерес, сконструйованих так, що вони експресують ген LAG-3, який повідомляє хазяїну толерантність до наступного введення клітин, тканин або органів, які обумовлені толерантністю до цієї інфекції імунною системою хазяїна.

Більш докладно, даний винахід описаний нижче з посиланнями на наступні ілюстративні приклади:

Приклад 1

Методи

Генерування клітин CHO, що експресують трансмембранний LAG-3

кДНК LAG-3 вирізували у вигляді 1650 п.о.-Xho-фрагмента з плазмін pCDMS (Invitrogen San Diego CA) і очищали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі

Фрагмент субклонували у вектор ссавця, що експресує

pCLN3AXSV2DHFRhαIVSA (Da) (Фіг.3), гідролізований ферментом Xho Клітини CHO-DUKX (DHFR) трансфекували з використанням конструкції DaLAG-3 методом осадження CaPO₄. Трансфековані клітини культивували у середовищі для відбору (у середовищі MEM без дезокси- і рибонуклеотидів +10% діалізованої фетальної бичачої сироватки + 1% L-глутаміну + 0,02мкм метотрексата). Експресію LAG-3 оцінювали за допомогою Вестерн-блотінгу на лізованих препаратах клітинних мембран, і періодично оцінювали шляхом проведення проточної цитометрії з використанням моноклонального антитіла 17B4 проти LAG-3.

Трансплантація клітин CHO мишам

Клітини ячок китайського хом'ячка (CHO), або нетрансфековані (дикого типу), або трансфековані повнорозмірні LAG-3 людини або «ДНК LH людини, були відділені від пластикових колб, і суспендовані у мінімальному підтримуючому середовищі, модифікованого способом Дульбекко (DMEM), при концентрації 1,75 x 10⁷ клітин/мл. 26 самок 7-9 тижневих мишей C57BL/6 розділяли на 7 груп, як зазначено в Таблиці 1, і 200 мл зазначеної клітинної суспензії, що містить 3,5 x 10⁶ клітин, робили ін'єкцію підшкірно кожній тварині у правий бік. У групах 3,6 і 7, тим же мишам у правий бік робили ін'єкцію LaG-3-трансфекованими клітинами, а в інший бік робили ін'єкцію контрольними клітинами (LH-трансфековані або нетрансфековані). Через чотири дні після ін'єкції, мишей умертвляли шляхом інгаляції CO₂ і шкіру в місці ін'єкції розтинали для огляду ділянки ін'єкції.

Таблиця 1

Експериментальні групи

Група	№ миші	ідентифікація мишей	клітини CHO, яким робили ін'єкцію в правий бік	клітини CHO, яким робили ін'єкцію в лівий бік
1	5	1-5	дикого типу	-
2	5	6-10	LAG-3	-
3	5	11-15	LAG-3	дикого типу
4	2	16 і 17	LH	-
5	5	18-22	LAG-3*	
6	2	23 і 24	LAG-3	дикого типу
7	2	25 і 26	LAG-3	LH

Оцінка цитотоксичності проти клітин CHO

П'яти самкам мишей C57BL/6 на кожну групу підшкірно (s.c.) робили ін'єкцію 4 x 10⁵ клітинами CHO, трансфекованим або людським LH, або кДНК людського LAG-3. Через 14 днів мишей умертвляли, і видаляли селезінку для одержання суспензії спленоцитів. Суспензії спленоцитів (ефектори) розводили в культуральному середовищі (RPMI 1640 + 10% фетальної бичачої сироватки + антибіотики) при щільності 10⁷ клітин/мл, і засівали в потрібних дублікатах із різними розведеннями з метою одержання різних співвідношень ефектор/мішень; для кожної суспензії приготувляли 2 планшети. У ці планшети (один для кожної мішені) додавали клітини-мішені (або LH-, або LAG-3-трансфековані клітини) при концентрації 5 x 10³ клітин/100мкл, мічені ⁵¹Cr. Після 20-годинного культивування при 37°C, із кожної лунки брали 20мкл супернатанту, і оцінювали вивільнення ⁵¹Cr за допомогою рідинного сцинтилятора. Цитотоксичне активність обчислювали як відсоток лизису у відповідності з наступною формулою:

$$\% = \frac{(\text{число імп./мін.зразок} - \text{число імп./мін.спонт.})}{(\text{число імп./мін.макс} - \text{число імп./мін.спонт.})} \times 100$$

де: "спонт" і "макс" відносяться до лунок, що містять культуральне середовище (спонтанне вивільнення Cr із клітин-мішеней) і 1% Тритон X (максимальне вивільнення Cr), замість суспензії ефектора, відповідно.

Результати

Трансплантація клітин CHO мишам

У більшості мишей, яким були введені LaG-3-трансфековані клітини, виявлялися білі вузликові потовщення у місці ін'єкції, які не спостерігалися в мишей, оброблених клітинами CHO дикого типу, або в мишей, оброблених LH-трансфекованими клітинами CHO. У більшості мишей, ін'єкція клітин CHO дикого типу викликала появу дифузійної геморагії в місці ін'єкції. Це явище було менше виражено у тварин, яким робили ін'єкцію LH-трансфекованих клітин. У мишей, яким робили ін'єкцію як клітинами дикого типу, так і LaG-3-трансфекованими клітинами CHO в різні ділянки, ці вузликові потовщення спостерігалися тільки в місці ін'єкції у випадку клітин дикого типу, тоді як, геморагії спостерігалися в місці іншої ін'єкції (Таблиця 2).

Гістологічний аналіз, здійснений раніше в аналогічному експерименті, виявив присутність гетерологічних клітин в вузликових потовщеннях. Результати цього експерименту вказані в малюнках, що додаються, (див. Таблицю 1 для ідентифікації мишей) і систематизовані в Таблиці 3

Таблиця 2

клітини, робили ін'єкцію	№ миші	Частота (число позитивних даних/загальне число ділянок, яким робили ін'єкції геморагія вузликове потовщення)	
LAG-3 дикого типу	10 5	1/10 3/5	9/10 0/5
LH	2	1/2	1/2
LAG- + типу*	7	0/7(a) 5/7(c)	7/7(a) 1/7(c)
дикого LAG-3+ LH*	2	0/2(б) 1/2(a)	0/2(б) 2/2(a)

*Клітинам кожного типу були зроблені ін'єкції окремо в один бік

(a) = ділянка, в яку вводили LAG-3

(b) = ділянка, в яку вводили LH

(c) = ділянка, в яку вводили WT

Таблиця 3

Клітини, яким робили ін'єкції	Частота число позитивних робили ін'єкції геморагія	даних/загальне число ділянок, яким вузликове потовщення
CHO дикого типу	8/12 (67%)	0/12 (0%)
LHCHO	1/4 (25%)	1/4 (25%)
LAG-3 CHO	2/19(11%)	16/19(84%)

Цитотоксичність проти клітин CHO

Експресія LAG-3 на поверхні клітин CHO не впливає на здатність мишей до імунологічного примовання проти ксеногенних клітин. Дійсно спленоцити мишей, яким були зроблені ін'єкції клітини LAG-3-CHO, лізували обидва типи клітин-мішеней так само ефективно, як і клітини мишей, примованих клітинами LHCHO і більш ефективно, ніж клітини непримованих мишей. Проте, експресія LAG-3 на клітинній поверхні асоціювалася з більш низькою сприйнятливістю до цитотоксичної активності, індукованої шляхом імунізації мишей, стосовно клітин-мішеней, як можна бачити з порівняння відсотка лізису на Фіг.1 і Фіг.2. При цьому, "природна" цитотоксичність, індукована спленоцитами від непримованих мишей, не знижувалася при експресії LAG-3 на поверхні клітини. Це свідчить про те, що експресія LAG-3 на поверхні клітини сприяє зниженню активності еферентної гілки цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ). ЦТЛ являють собою один із типів ефektorних клітин, які грають важливу роль у відторгненні трансплантованих органів (G. Berke, 1993), а тому інгібування їх функції може подовжити життя алотрансплантатів.

REFERENCES

1. Triebel et al, J Exp Med., 171: 1393, 1990
2. Baixeras et al., J. Exp. Med., 176: 327, 1992
3. Huard et al., Immunogenetics, 39: 213, 1994A
4. Huard et al., Eur. J. Immunol., 24: 3216, 1994 B.
5. Huard et al., Eur. J. Immuno, 26: 1180-1186/1996.
6. Miyazaki, et al. Science, 272: 405-408, 1996
7. Susuki et al.. J. Exp. Med., 182: 477-486, 1995
8. Bellgrau et al.. Nature, 377: 630-632, 1995
9. Lauetal. Science, 273: 109-112, 1996
10. Subramani et al., Mol. Cell. Biol., 1: 854-864, 1981
11. Luskiand Botchan, Nature 293: 79-81, 1981
12. FicJdes and Goodman, J. Mol. Appl. Genetic 1: 3-18, 1981
13. Hamerand Walling, J Mol. Appl. Genetic 1. 273-288, 1982
14. Qin et al., Science, 259' 974, 1993
15. Delaney et al., J. Clin. Inves., 97: 217-225, 1996
16. Kernan et al.. Transplantation, 43: 842, 1987
17. Kozarsky and Wilson, Current Opinions Genet. Dev., 3: 499, 1993
18. Barretal., Gene Therapy, 1.51, 1992
19. Stratford et al.. J. Clin. Inves., 90: 626, 1992
20. Rosenfeld et al.. Cell 68: 143, 1992
21. Lemarchand et al., PNAS, 89: 6482, 1992
22. Tripathyetal., PNAS, 91. 11557, 1994
23. Bi et al., Human Gene Therapy 4'725, 1993

