



(19) **UA** (11) **75 322** (13) **C2**  
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2000020976, 23.07.1998

(24) Дата начала действия патента: 17.04.2006

(30) Приоритет: 25.07.1997 EP 97401800.4

(46) Дата публикации: 15.04.2006A61K 39/00  
20060101CFI20060101RHUA A61K  
48/00 20060101CLI20060101RHUA  
C12N 5/10  
20060101CLI20060101RHUA A61P  
37/02 20060101ALI20060101RHUA

(86) Заявка PCT:  
PCT/EP98/04621, 19980723

(72) Изобретатель:  
Трибель Фредерик, FR

(73) Патентовладелец:  
ЭНСТИТЮ ГЮСТАВ РУССИ, FR,  
АППЛАЙД РИСЕРЧ СИСТЕМЗ АРС ХОЛДИНГ  
Н.В., AN

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЛИГАНДОВ МОЛЕКУЛ МНС КЛАССА II В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТОВ ДЛЯ ВАКЦИНАЦИИ И LAG-3 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

(57) Реферат:

Изобретением предусматривается применение лиганда МНС класса II, способного усиливать антигенспецифический иммунный ответ, для производства лекарственного средства, предназначенного для профилактики или лечения патологических состояний, связанных с антигенспецифическим иммунным ответом. В качестве лиганда используют CD4 или LAG-3, или же их производные, сохраняющие способность связываться с молекулой МНС класса II, с которой связывается CD4 или LAG-3. Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество антигена, способного индуцировать антигенспецифический

иммунный ответ, вместе с эффективным количеством лиганда МНС класса II, способного усиливать антигенспецифический иммунный ответ. При этом в качестве лиганда используют CD4 или LAG-3, или же их производные, сохраняющие способность связываться с молекулой МНС класса II, с которой связывается CD4 или LAG-3.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 4, 15.04.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 7 5 3 2 2 C 2

U A 7 5 3 2 2 C 2



(19) **UA** (11) **75 322** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF  
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL  
PROPERTY

**(12) DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2000020976, 23.07.1998

(24) Effective date for property rights: 17.04.2006

(30) Priority: 25.07.1997 EP 97401800.4

(46) Publication date: 15.04.2006A61K 39/00  
20060101CFI20060101RHUA A61K  
48/00 20060101CLI20060101RHUA  
C12N 5/10  
20060101CLI20060101RHUA A61P  
37/02 20060101ALI20060101RHUA

(86) PCT application:  
PCT/EP98/04621, 19980723

(72) Inventor:  
Triebel Frederic, FR

(73) Proprietor:  
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, FR,  
APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING  
N.V., AN

**(54) USE OF MHC CLASS II LIGANDS AS ADJUVANT FOR VACCINATION AND LAG-3 FOR CANCER IMMUNOTHERAPY**

(57) Abstract:

The present invention concerns a use of a MHC class II ligand, such as CD4 and LAG-3, for the manufacture of a medicament for preventing or treating pathological conditions involving an antigen specific immune response, as well as the use of LAG-3 in cancer immunotherapy. The invention also concerns a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an antigen able to induce an antigen-specific immune

response together with an effective amount of a MHC class II ligand wherein said MHC class II ligand is present as an adjuvant-like agent.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 4, 15.04.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 5 3 2 2 C 2

U A 7 5 3 2 2 C 2



(19) **UA** (11) **75 322** (13) **C2**  
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:  
2000020976, 23.07.1998

(24) Дата набуття чинності: 17.04.2006

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 25.07.1997 EP 97401800.4

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.04.2006A61K 39/00  
20060101CFI20060101RHUA A61K  
48/00 20060101CLI20060101RHUA  
C12N 5/10  
20060101CLI20060101RHUA A61P  
37/02 20060101ALI20060101RHUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:  
PCT/EP98/04621, 19980723

(72) Винахідник(и):  
Трієбель Фредерік , FR

(73) Власник(и):  
ЕНСТІТЮ ГЮСТАВ РУССІ, FR,  
АППЛАЙД РЕЗЕЧ СИСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ  
Н.В., AN

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЛІГАНДІВ МОЛЕКУЛ МНС КЛАСУ II В ЯКОСТІ АД'ЮВАНТІВ ДЛЯ ВАКЦИНАЦІЇ І LAG-3 В ЛІКУВАННІ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

(57) Реферат:  
Винаходом передбачено застосування ліганду МНС класу II, здатного посилювати антигенспецифічну імунну відповідь, вибраного з групи, що складається з CD4, LAG-3, і похідного CD4 або LAG-3, яке зберігає здатність зв'язуватись з молекулою МНС класу II, з якою зв'язується CD4 або LAG-3 для виробництва лікарського засобу, призначеного для профілактики або лікування патологічних станів, пов'язаних з антигенспецифічною імунною

відповіддю. Також винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить ефективну кількість антигену, здатного індукувати антигенспецифічну імунну відповідь, разом з ефективною кількістю ліганду МНС класу II, здатного посилювати антиген-специфічну імунну відповідь, вибраного з групи, що складається з CD4, LAG-3 і похідного CD4 або LAG-3, яке зберігає здатність зв'язуватись з молекулою МНС класу II, з якою зв'язується CD4 або LAG-3.

UA 75322 C2

UA 75322 C2

## Опис винаходу

5 Цей винахід стосується застосування LAG-3 і CD4, а в загальнішому сенсі -лігандів молекул МНС класу II або МНС-II-подібних лігандів в якості ад'ювантів для вакцин, з метою бустингу антиген-специфічної імунної відповіді, так само як і застосування LAG-3 в якості терапевтичного засобу в імунотерапії злоякісних пухлин.

В даний час встановлено, що білки, які кодується ділянкою МНС (головний комплекс гістосумісності) класу II, втягнуті в багато напрямків імунних реакцій, включно взаємодію між різними типами лімфоїдних клітин, таких, як лімфоцити і антиген-презентуючі клітини. Різні дослідження також продемонстрували, що й інші механізми, не пов'язані з участю молекул CD4, беруть участь у прояві ефекторної функції Т-хелперів.

10 Ген активації лімфоцитів-3 (LAG-3), експресований CD-4 і CDS-позитивними активованими Т-клітинами людини, так само як і інактивованими клітинами NK, кодує поліпептид, що складається з 503 амінокислот і відноситься до мембранних білків I типу, і має чотири позаклітинних імуноглобуліно-подібних домени (IgSF) [1], що є лігандом молекул МНС класу II [2]. Аналіз цієї амінокислотної послідовності дозволив виявити виразні сегменти ідентичності в порівнянні з амінокислотними послідовностями, які виявляються у відповідних ділянок CD4, хоча загальний рівень гомології амінокислотних послідовностей CD4 і LAG-3 людини практично не перевищує контрольний рівень (приблизно 20%-на ідентичність послідовностей поліпептидів). Також є кілька внутрішніх ділянок гомології послідовностей в молекулі LAG-3 між доменами 1 (D1) і 3 (D3), так само як і між доменами 2 (D2) і 4 (D4): це підтверджує, що LAG-3 еволюціонував так само, як і CD4, шляхом дуплікації відповідних генів, при тому, що предковою була структура з двома доменами IgSF [1]. Крім того, гени LAG-3 і CD4 локалізовані дуже близько один до одного в дистальній частині короткого плеча хромосоми 12 [3]. Таким чином, гени (і білки) LAG-3 і CD4 можуть бути визначені як "двоюрідні брати" в складі суперсімейства імуноглобуліно-подібних білків [2].

25 Як і CD4, LAG-3 людини має Ig-подібні позаклітинні домени, при тому, що в доменах 2 і 4 є мотиви WxC; однак відмінністю від CD4 є присутність додаткової випетленої послідовності в складі 1-го домену (що розпізнається моноклональним антитілом 17B4) і цитоплазматичного багатого проліном мотиву (Er-повтори) в складі LAG-3 людини (hLAG-3). Недавно ген активації лімфоцитів-3 миші (mLAG-3) був клонований і було виявлено приблизно 70%-ний рівень гомології з hLAG-3: зокрема, є той самий багатий проліном цитоплазматичний "хвіст".

30 Антиген-специфічна стимуляція CD4-позитивних Т-клітинних клонів в присутності моноклонального антитіла проти LAG-3 приводить до посилення клітинної проліферації і вироблення цитокінів [5]. Була підтверджена регуляторна роль hLAG-3 в активації CD4-несучих Т-лімфоцитів за рахунок перехресного зв'язування молекул МНС класу II, експресованих Т-клітинами, з химерними білками LAG-3/Ig [6]. Взаємодія між LAG-3 і молекулами МНС класу II придушує сигнали, передані молекулами МНС класу II, що експресуються CD4-позитивними Т-лімфоцитами (ослаблення проліферації клітин і вироблення цитокінів): це підтверджує, що і LAG-3, і МНС класу II є ефекторними молекулами механізму негативної регуляції імунних відповідей, опосередковуваних Т-хелперними лімфоцитами. Для химерного білка hLAG-3/Ig було показано зв'язування чужорідних молекул МНС класу II (миші і мавпи). Крім того, передбачається, що mLAG-3 опосередковує позитивний сигнал в ефекторних клітинах: на це вказує те, що трансгенні миші, які несуть нульову мутацію в гені LAG-3, характеризуються порушенням в пулі клітин NK [7].

40 Лінії пухлинних клітин мишей, методами генної інженерії змінених таким чином, щоб експресувати мембранні (B7.1, B7.2, CD95L і ін.) або секретувати молекули (інтерлейкин-2, інтерлейкин-12 та ін.), часто використовують в дослідженнях імунних відповідей або протипухлинних проявів. Такий підхід показує, що багато пухлинних клітин є потенційно антигенними [9] і стають імуногенними тоді, коли вони експресують які-небудь молекули. Отримані в експерименті у мишей пухлини класифікують як імуногенні тоді, коли після однієї ін'єкції сингенним мишам клітинних вакцин, що не реплікуються, ці миші виробляють ефективну імунну відповідь проти наступних летальних впливів. Пухлини, що не забезпечують збереження такої залишкової імуногенності, визначаються як слабоімуногенні або неімуногенні.

50 Протипухлинні імунні відповіді в першу чергу опосередковуються Т-лімфоцитами [12]. Недавні дослідження підтвердили дефіцит в презентуванні антигенів і прилігрованні Т-клітин, що створює проблеми для практичного втілення ідеї універсальної протипухлинної вакцини. Дійсно, було встановлено, що трансфекція пухлинних клітин генами, що кодуєть різні цитокіни, такі як IL-2, IL-4, IL-12 або GM-CSF, або генами, що кодуєть ко-стимуляторні молекули, такі, як B7, не тільки приводить до первинного відторгнення модифікованих клітин, але і часто забезпечує захисний імунітет проти наступних впливів немодифікованими пухлинними клітинами [13].

55 Функціональні антиген-презентуючі клітини (APC) здатні приймати, процесувати і презентувати антиген Т-лімфоцитам у контексті ко-стимуляторних сигналів, необхідних для активації Т-лімфоцитів, що приводить до оптимального презентування антигену. Зокрема, вірогідно встановлено, що позитивні за молекулами МНС класу II дендритні клітини відіграють принципову роль у процесуванні і презентуванні антигенів в імунній системі. Заявники висловили гіпотезу, згідно з якою пухлинна імуногенність повинна зростати, якщо пухлину вдається модифікувати так, щоб вона безпосередньо направляла APC організму-хазяїна, такі, як макрофаги і дендритні клітини. Дійсно, було повідомлено про те, що перехресне зв'язування молекул МНС класу II, специфічно експресованих такими клітинами, з використанням моноклонального антитіла або суперантигену, опосередковує сигнали, що приводять до вироблення TNF $\alpha$  і IL-12 [14, 15]. Раніше було повідомлено, що ген активації лімфоцитів-3 (LAG-3), що входить в склад локуса CD4 [1,6], кодує білок, що зв'язується з молекулами класу II головного комплексу гістосумісності людини і миші з великим рівнем афінності в порівнянні з CD4 [17,6].

Заявники цього винаходу досліджували, чи може експресія hLAG-3, CD4 людини (hCD4) і mLAG-3 на трьох МНС класу II-позитивних пухлинах миші (слабоімуногенна саркома MCA-205 і неімуногенна аденокарцинома TS/A+RENCA) опосередкувати імунну відповідь таким чином, щоб відторгати пухлину в миші з індукуванням системного імунітету.

В результаті заявники встановили, що LAG-3 людини або миші у випадку його експресії у вигляді мембранного білка в лінії клітин солідної пухлини або у випадку його інокуляції мишам у вигляді розчинного білка індукує формування імунітету до найбільш злоякісних пухлин миші. Імунітет виявився залежним від Т-лімфоцитів і антиген-специфічним.

Автори також дослідили роль CD4 і виявили, що CD4 людини (hCD4) також індукує системну протипухлинну відповідь.

Індукований імунітет, як було встановлено, опосередковується Т-лімфоцитами, оскільки таку саму протипухлинну відповідь було виявлено у мутантних мишей лінії "nude", у яких через аплазію гіпофізу відсутні Т-лімфоцити.

Протипухлинний ефект був також виявлений, коли були використані різні лінії пухлинних клітин, що виявляють різні варіанти власної імуногенності, так само як і різні лінії мишей, що експресують різні гени комплексу МНС.

Крім того, індуковані білками hLAG-3 і hCD4 ефекти були виявлені тоді, коли лінії пухлинних клітин, що експресують hLAG-3 і hCD4, були ін'єкційовані в ділянці, що відрізняється від місця вихідної інокуляції у лінії пухлинних клітин дикого типу.

Далі, системне введення розчинного hLAG-3 прямо індукує пригнічення росту пухлини *in vivo*.

Всі вказані вище результати показують, що LAG-3 і CD4 здатні обумовлювати антиген-специфічну, опосередковану Т-лімфоцитами імунну відповідь і можуть бути використані в імунотерапії з метою запобігання розвитку злоякісних пухлин в популяціях, що характеризуються відповідним ризиком або, в загальнішому змісті, для будь-яких імунотерапевтичних цілей, що ґрунтуються на антиген-специфічній, опосередкованій Т-клітинами імунній відповіді, а також показують, що LAG-3 також може застосовуватись в якості засобу для пригнічення росту пухлини *in vivo*.

Далі заявники продемонстрували, що розчинний LAG-3 у випадку введення одночасно з антигеном, стосовно якого виробляється імунна відповідь, здатний функціонувати в якості вакцинного ад'юванта.

Такий вияв може бути пояснений поліпшенням презентування даного антигену спеціальними APC (дендритними клітинами і макрофагами), розташованими під шкірою, що опосередковується молекулами МНС класу II.

Отже, оскільки, індукція CD8<sup>+</sup> -Т-клітинного імунітету втягнута у вірусні (наприклад, ВІЛ-СНІД, гепатит або герпес) і внутрішньоклітинні паразитарні і бактеріальні (наприклад, проказа, туберкульоз) інфекції і злоякісні пухлини, LAG-3 може бути, зокрема, використаний для терапевтичної вакцинації проти патогенних агентів, зв'язаних з цими захворюваннями, так само як і для лікування злоякісних пухлин.

У відповідності до одного з аспектів цей винахід стосується використання ліганду молекул МНА класу II і лігандів подібних молекул для виробництва лікарського засобу, призначеного для профілактики або лікування патологічних станів, що втягують антиген-специфічну імунну відповідь, переважно антиген-специфічну, опосередковану Т-лімфоцитами імунну відповідь.

В першому варіанті молекулою, що зв'язується з МНС класу II, є білок LAG-3, так само як і його похідні, здатні зв'язуватися з лігандом LAG-3, що входить в МНС.

В контексті цього винаходу під похідними LAG-3 маються на увазі мутанти, варіанти і фрагменти LAG-3, а саме розчинні фрагменти LAG-3, які зберігають здатність самого LAG-3 зв'язуватися з молекулами МНС класу II.

Таким чином, можуть бути використані такі форми LAG-3:

- повний білок LAG-3;

- розчинний фрагмент поліпептиду LAG-3, до якого входить принаймні один з чотирьох позаклітинних імуноглобуліно-подібних доменів, а саме розчинна частина LAG-3, до якого входить позаклітинний сегмент, що тягнеться від 23-ї амінокислоти до 448-ї амінокислоти послідовності LAG-3, наведеної [в заявці на видачу патенту Франції №90-00-12];

- фрагмент LAG-3, до якого входять по суті повні перший і другий домени;

- фрагмент LAG-3, до якого входять по суті повні перший і другий домени або всі чотири домени, такі, як визначені [в міжнародній патентній заявці WO 95/3075], такий фрагмент як:

- мутантний варіант розчинного LAG-3 або його фрагмент, до якого входять позаклітинні домени D1 і D2, до яких входить:

- заміна амінокислоти за одним з наступних положень:

73-є положення, в якому аргінін замінений на глутамінову кислоту;

75-е положення, в якому аргінін замінений на аланін або глутамінову кислоту;

76-е положення, в якому аргінін замінений на глутамінову кислоту; або поєднання однієї або кількох таких заміні;

30-е положення, в якому аспарагінова кислота замінена на аланін;

56-е положення, в якому гістидин замінений на аланін;

77-е положення, в якому тіразин замінений на фенілаланін;

88-е положення, в якому аргінін замінений на аланін;

103-е положення, в якому аргінін замінений на аланін;

109-е положення, в якому аспарагінова кислота замінена на глутамінову кислоту;

115-е положення, в якому аргінін заміненій на аланін; або делеція ділянки, що знаходиться між 54-м і 66-м положеннями, або поєднання двох або більшої кількості таких замінів.

Такі мутантні варіанти [описані в PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA - червень 1997] [4];

- або фізіологічний варіант LAG-3, до якого входять розчинний білок з молекулярною масою 52кДа за наявності в ньому доменів D1, D2 і D3.

У відповідності до другого варіанту цього винаходу білком, що зв'язується з МНС класу II, є CD4 або його похідна, здатна зв'язуватися з лігандом CD4 з складу молекул МНС класу II.

Похідні CD4 такі ж самі, як ті, що були визначені для похідних LAG-3. Тобто вони є мутантними, варіантами і фрагментами CD4, а саме розчинними (не зв'язаними з мембраною) фрагментами CD4, що зберігають здатність CD4 зв'язуватися з молекулами МНС класу II.

LAG-3 і CD4, а саме, hLAG-3 і hCD4 або їх похідні, такі, як були визначені вище, можуть бути введені в якості рекомбінантних складових, що експресують такі молекули, наприклад, в складі трансфікованих клітин або рекомбінантних вірусів.

Цей винахід стосується також пухлинних клітин, трансфікованих молекулою ДНК, що кодує принаймні один ліганд молекул МНС класу II, такий, як CD4 або LAG-3, або їх похідні.

Ще одним об'єктом цього винаходу є використання клітин, таких, як пухлинні клітини, трансфікованих молекулою ДНК, що кодує принаймні один ліганд молекул МНА класу II, такий, як CD4 або LAG-3, або їх похідні, для виробництва лікарського засобу, переважно лікарського засобу, призначеного для профілактики або лікування патологічних станів, пов'язаних з антиген-специфічною імунною відповіддю, такою, як антиген-специфічна, опосередкована Т-лімфоцитами імунна відповідь, або для лікування таких патологій, як злоякісні пухлини.

Трансфіковані клітини переважно є клітинами ссавців, а, зокрема, - пухлинними клітинами ссавців.

У відповідності до одного із своїх аспектів, цей винахід стосується способу одержання клітин, трансфікованих молекулою ДНК, що кодує принаймні один ліганд молекул МНС класу II, такий, як CD4 або LAG-3, або їх похідні, до яких відноситься виділення клітин у пацієнта (донора), трансфекція згаданих клітин молекулою ДНК, що кодує принаймні один ліганд молекул МНС класу II, такий, як CD4 або LAG-3, або їх похідні, і виділення трансфікованих клітин.

Для одержання пухлинних клітин у відповідності до цього винаходу, даний спосіб може бути здійснений на матеріалі виділених у пацієнта (донора) пухлинних клітин.

Однак, у відповідності до варіанту, якому слід надати перевагу, білок, що зв'язується з молекулами МНС класу II, а саме CD4 або LAG-3, або їх похідні, вводять у вільному вигляді, а саме в розчинній формі, шляхом системного введення, наприклад, за допомогою підшкірної, внутрішньом'язової або внутрішньовенної ін'єкції.

Лікарський засіб у відповідності до цього винаходу може бути використаний в якості вакцини для профілактики захворювань, пов'язаних з антиген-специфічною імунною відповіддю, перевагу слід надавати опосередкованій Т-лімфоцитами імунній відповіді.

У цьому випадку його вводять разом з відповідним наповнювачем з одним або кількома антигенами, проти якого (яких) формується дана імунна відповідь. Антиген може бути інактивованим або ослабленим інфекційним початком або очищеним антигеном, наприклад, отриманим методами конструювання рекомбінантних білків, таким, як антиген інфекційного агента або пухлинний антиген, які переважно здатні обумовлювати опосередковану Т-лімфоцитами імунну відповідь.

Вакцина може бути використана для запобігання виникнення у суб'єкта інфекційного захворювання, такого, як вірусне, бактеріальне або паразитарне захворювання, якщо відповідний інфекційний агент обумовлює формування специфічної імунної відповіді, перевагу слід надати імунній відповіді, опосередкованій Т-лімфоцитами.

Вакцина може бути використана для лікування пацієнта від інфекційного захворювання, такого, як згадувалося вище, пов'язаного з опосередкованим Т-лімфоцитами імунною відповіддю, а саме імунною відповіддю, опосередкованою СО8-позитивними Т-клітинами.

Приклади захворювань, пов'язаних з формуванням опосередкованої Т-лімфоцитами імунної відповіді, наведені нижче в таблиці.

Тип патогену	Збудник	Захворювання
Віруси	ВІЛ	ВІЛ-інфекція
	HBV, HCV	Гепатити
	HSV, CMV, HHV	Саркома Капоші, відторгнення при трансплантаціях
Внутрішнь-оклітинні бактерії	Listeria	Лістеріоз
	Mycobacteria	Проказа, туберкульоз
Внутрішньоклітинні паразити	Plasmodium	Малярія
	І т.д.	
	Онкогени	Більшість карцином,
І т.д.	меланом, лейкозов	

В цих випадках антиген розподіляється по клітинах і відповідні пептиди завантажуються на молекули МНС класу I і презентуються на поверхні таких клітин, де вони розпізнаються СD8-носними Т-клітинами. Дані,

отримані заявниками, які показують, що молекули LAG-3/Ig індують ефективну Т-клітинну імунну відповідь у тварин і стимулюють незрілі дендритні клітини і макрофаги *in vitro*, чітко підтверджують, що білок LAG-3 є ад'ювантом Т-клітин в ситуаціях, коли він взаємодіє з молекулами МНС класу II на спеціальних клітинах APC.

Вакцина може бути також використана для захисту суб'єкта від злоякісної пухлини, причому як солідної пухлини, так і лейкозу.

Вакцина також може бути використана для лікування пацієнта від злоякісної пухлини.

У цьому випадку білок, що зв'язується з молекулами МНС класу II, а саме LAG-3 або CD4, вводять суб'єкту (реципієнтові) підшкірно або внутрішньошкірно або у формі назального аерозолу разом з одним або кількома антигенами, здатними обумовлювати імунну відповідь; перевагу слід надавати імунній відповіді, опосередкованій Т-лімфоцитами. Антиген може бути пептидом, ліпопротеїном, рекомбінантним білком або молекулою ДНК, що кодує такі антигени.

Протипухлинна вакцина може прищиплюватись в популяціях, що характеризуються ризиками, які визначають генотипово (профілактична вакцина), або пацієнтам (лікувальна вакцина), у яких є пухлина або є високий ступінь ризику її рецидиву після хірургічного втручання.

Якщо вакцина використовується в якості стандартної (профілактичної) вакцини або лікувального препарату, вона може бути введена у вигляді "голої" плазмід [19], до якої входить послідовність ДНК, що кодує LAG-3 або CD4, перевагу слід надати вміщенню під контроль сильного промотора.

Також слід надати перевагу наявності у складі плазмід ДНК, що кодує антиген, стосовно якого формується імунна відповідь.

Наступним об'єктом цього винаходу, таким чином, є фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість ліганду молекул МНС класу II в поєднанні з ефективною кількістю антигену, здатного стимулювати імунну систему, перевагу слід надавати здійсненню цього по шляху формування Т-клітинної імунної відповіді.

Ще в одному своєму аспекті цей винахід стосується використання LAG-3 з якості лікарського засобу, призначеного для проведення протипухлинної імунотерапії в пацієнтів, у яких розвинулась злоякісна пухлина.

У цьому випадку надають перевагу введенню LAG-3 у вигляді вільного білка LAG-3 або його похідної разом із фармацевтично прийнятним наповнювачем, перевагу слід надавати у вигляді розчинної похідної у відповідності до того, як воно було охарактеризовано вище.

LAG-3 може бути введений шляхом внутрішньопухлинної ін'єкції або за допомогою системної ін'єкції, наприклад, підшкірно, внутрішньовенно або внутрішньом'язово.

Іншим об'єктом цього винаходу є спосіб генотерапії пухлин, в якому є такі етапи, як виділення частини пухлинних клітин пацієнта, трансфікування вказаних клітин молекулою ДНК, що кодує принаймні один ліганд молекул МНС класу II, такий, як CD4 або LAG-3, або їх похідні, і повторне введення трансфікованих клітин цьому ж пацієнту.

Нижченаведені приклади характеризують активність LAG-3 і CD4 у зв'язку з профілактикою або лікуванням патологічних станів, що втягають опосередковану Т-лімфоцитами імунну відповідь.

Для кращого розуміння цього винаходу можна звернутися до Фіг., що додаються, на яких:

Фіг.1 показує середній розмір пухлин у мишей C57BL/6, заражених пухлинними клітинами MCA-205 дикого типу (MCA WT), пухлинними клітинами MCA-205, трансфікованими hCD4 (MCA hCD4), пухлинними клітинами MCA-205, трансфікованими hLAG-3 (MCA hLAG-3);

Фіг.2 показує результати (середній розмір пухлин), отримані після повторної стимуляції тих самих мишей пухлинними клітинами MCA дикого типу в мінімальній пухлинорідній дозі;

Фіг.3 показує результати (середній розмір пухлин), отримані після повторної стимуляції тих самих мишей сторонньою лінією пухлинних клітин MC38;

Фіг.4 показує результати (середній розмір пухлин), отримані при використанні іншої лінії мишей (BALB/c) і іншої лінії пухлинних клітин (TS/A) як дикого типу (TS/A дикий тип), так і трансфікованих hCD4 (TS/A hCD4) або hLAG-3 (TS/A hLAG-3);

Фіг.5 показує результати (середній розмір пухлин), отримані на існуючих пухлинах, на які впливали різними дозами клітин MCA, що експресують hLAG-3;

Фіг.6 показує результати (середній розмір пухлин), отримані з використанням розчинного LAG-3, що вводиться разом з клітинами MCA (MCA wt. - дикий тип; MCA wt+25мкг LAG-3; і MCA wt+250мкг LAG-3);

Фіг. збоку від рамки фігури 6 показує частку мишей, у яких розвинулася пухлина;

Фіг.7 і 8 показують дані про експресію LAG-3 на мембрані лімфоцитів, що інфільтруються в пухлину (TILs) у п'ятерох пацієнтів (P1-P5), у яких є карцинома ниркових клітин (RCC);

Фіг.9 демонструє відторгнення hLaG-3-позитивних пухлинних клітин, опосередковане CDS-позитивними лімфоцитами.

A: FACS-аналіз (за допомогою клітинного флуоресцентного сортера) експресії CD8 лімфоцитами, що інфільтруються в пухлину (ЛІП) у контрольних мишей (MCA-205 дикого типу) у порівнянні з ЛІП мишей варіанту MCA-205+hLAG-3. B: CDS-позитивні Т-лімфоцити беруть участь у контролі росту пухлини TS/A hLAG-3. Мишам внутрішньочеревно шляхом ін'єкції вводили 200мкг очищеного CD4- або CD8-специфічного моноклонального антитіла в дні -3, -2, -1, +4 і +8. Пухлинні клітини TS/A дикого типу або TS/A hLAG-3 (MTD) були введені ін'єкцією підшкірно в 0-й день. Дані показані як середні  $\pm$  середнє квадратичне відхилення (s.e.) для 5 мишей у кожній групі окремого експерименту. Ці експерименти були проведені в двох повтореннях і були отримані подібні результати. C: Збільшена активність протипухлинних CTL у мишей, що виявляють відторгнення клітин hLAG-3/TS/A. Мишам вводили підшкірні трансплантати 50тис. клітин hLAG-3/TS/A, а потім проводили їх повторну стимуляцію на 30-й день з використанням 250 тисяч вихідних клітин TS/A. Селезінки були взяті на 60-й день

життя безпухлинних мишей, і спленоцити культивували протягом 6 днів з поміченими клітинами-мішенями, які були опромінені. Цитолітична активність стосовно помічених клітин-мішеней була протестована в стандартному 4-годинному тесті з виходом радіоактивного хрому-51 при різних співвідношеннях "ефектор:мішень" (Е:Т). Показано результати експерименту на двох особинах мишей. Ці експерименти були здійснені в двох повтореннях на 4 особинах і були отримані подібні результати;

Фіг.10 показує дані (середній розмір пухлини) для мишей (20 особин лінії C57BL/6), яким трансплантували клітини MTD, сингенні пухлинні клітинам MCA-20.5, яким проводили одноразове введення вакцини, що містить LAG-3/Ig. На 6-й день були сформовані 4 групи по 5 мишей, яким проводили одноразове підшкірне введення вакцини (200мкл). Антиген привносили жорстко опроміненіми (100Гр) клітинами MCA-205.

Експерименти, що ілюструють дані приклади, були проведені з використанням наступних матеріалів і методів.

Матеріали і методи

1. Лінії пухлинних клітин

Використані лінії пухлинних клітин, позитивні за класом I і негативні за класом II MHC, були такими: слабо імуногенна, індукована метилхолантреном лінія саркомних клітин MCA-205 (сингенна мишам лінії C57BL/6 H-2); імуногенна лінія клітин ниркової карциноми RENCA; і неімуногенна лінія клітин недиференційованої спонтанної аденокарциноми молочної залози TS/A (обидві сингенні мишам лінії BALB/c H-2<sup>d</sup>). Лінія клітин карциноми товстої кишки MC38 (сингенна мишам лінії C57BL/6) були використані в експериментах з повторної стимуляції в якості контрольної пухлини. Клітини підтримували при 37 °C у вологій атмосфері повітря при 10% CO<sub>2</sub> у повному середовищі (культуральне середовище RPMI-1640 з додаванням глутаміна, пірвата натрію, пеніциліну і стрептоміцину, 10% звільненої від ендотоксинів навколоплідної сироватки теляти і 0,05мМ 2-В-меркаптоетанолу). Для експериментів по імуному фарбуванню й в експериментах in vivo клітини відбирали з відповідних культуральних ємностей з фосфатним буфером, що містить 1мМ ЕДТА. Перед проведенням підшкірної ін'єкції клітини промивали тричі холодним фосфатним буфером (1x) і ресуспендували в тому ж буфері. Клітини не культивували протягом більш двох тижнів.

2. Миші

Самки мишей лінії C57BL/6 у віці 6 або 8 тижнів були придбані у фірми IFFRA-CREDO Lab. (Льон, Франція). Самки мишей лінії BALB/c у віці 4 або 8 тижнів були придбані у фірми JANVIER Lab. (Франція). Всі миші утримувались в умовах, вільних від конкретних патогенів. Самки мишей лінії "nude" були придбані в віварії Institut Gustave Roussy і утримувались в захищеному мкросередовищі.

3. Генетичні конструкції

кДНК hLAG-3, mLAG-3 і hCD4 були клоновані у вектор, що несе ген гігроміцинової резистентності (сайтами, що клонують, були XbaI-сайт для hLAG-3 і hCD4 і XhoI-сайт для mLAG-3), уміщаючи під контроль промотора SRa [18]. В якості негативного контролю використовували клонування кДНК hLAG-3 в протилежній орієнтації. Всі лінії пухлинних клітин (2,5млн. клітин) використовували для трансфекції шляхом електропорації з використанням пристрою Eurogentec (Бельгія): клітини MCA-205 при 200 В, клітини TS/A і RENCA при 300 В, при опорі 1500мкФ і необмеженому опорі шунта. Трансфектантів селектували в присутності гігроміцину-В (Sigma); трансфектанти MCA-205 при концентрації 100мкг/мл, а трансфектанти клітин RENCA і TS/A при 200мкг/мл. Резистентні клітини, що експресували трансфіковані молекули, були ідентифіковані з використанням цитофлуориметра Elite (Coulter, Hiialeah, FL, США) і клоновані шляхом обмежуючого розведення. В даному аналізі використовували кращий клон для кожної з конструкцій у випадку кожної лінії пухлинних клітин.

4. Цитофлуориметричний аналіз

Резистентні клітини, що експресують трансфіковані молекули, були забарвлені шляхом непрямої імунофлуоресценції з використанням насичуючих кількостей очищених або взятих з асцитиної рідини моноклональних антитіл. Спочатку клітини інкубували з моноклональними антитілами: 17B4 (антитіло, специфічне стосовно hLAG-3) [2], ОКТ4 (антитіло, специфічне стосовно hCD4), в якості негативного контролю використовувалась преімуна сироватка кролика (позначалася як PIS) і імуна сироватка кролика до mLAG-3 (позначена як IS). Експресія молекул класів I і II MHC миші на пухлинах виявляли з використанням наступних моноклональних антитіл: 34-1-2S - у відношенні H-2 K<sup>d</sup> і D<sup>2</sup>; 28-8-6S - у відношенні H-2 K<sup>b</sup> і D<sup>b</sup>; 14-4-4S (у відношенні E<sup>d</sup>; M50114 (у відношень IA і IE).

Потім клітини промивали і інкубували з поєднаною з FITC

(флуоресцинізотіоціанат) козячою антимишиною сироваткою (GAM Coulter) або поєднаною з FITC козячою антикролячою сироваткою (GAR Southern Biotechnologies Inc.). Для аналізу присутності клітин, що інфільтруються, або заповнення клітин на периферії пухлини деякі миші були забиті, а їх пухлини розмацеровані. Клітини забарвлювали шляхом прямої імунофлуоресценції з використанням 17B4-FITC або наступних моноклональних антитіл (Pharmingen): анти-mCD4-PE (L3T4), анти-mCD8 (Ly-2 і Ly3.2), анти-mNK (2B4) і анти-mCD22 (Lyb-8.2). Клітини відсортовували з використанням цитофлуориметра Elite (Coulter).

Позитивні клітинні лінії потім клонували шляхом обмежуючого розведення LaG-3-позитивних або CD4-позитивних клонів, а отримані клони були заморожені для проведення подальшого аналізу.

Для створення розчинних молекул LAG-3 позаклітинні домени в складі hLAG-3 і mLAG-3 були приєднані до Fc-сегментів імуноглобулінів hlgG1 і mlgG2a, відповідно, згідно з описаним раніше [6]. Кінцеві рекомбінантні білки - hLAG-3/Ig і mLAG-3/Ig - були отримані в клітинах CHO й очищені на колонках з протеїном А.

5. Експерименти з пухлинами in vivo

5.1. Досягнення росту пухлин і вакцинація

Впровадження ліній пухлинних клітин було здійснено підшкірно з використанням мінімальної пухлинохідної

5 дози (МОД) - 20 тисяч клітин на 1 мишу для лінії MCA-205, 50 тисяч клітин для лінії TS/A і 100 тисяч клітин для лінії RENCA, - або з використанням 5-кратної МОД. Мишам, у яких не розвивалась пухлина протягом 30 днів після проведення ін'єкції, проводили повторну стимуляцію вихідною лінією пухлинних клітин (5-кратна МОД). Клітини MC38 (карцинома товстої кишки) були використані в кількості 100 тисяч для індукції контрольної пухлини в мишей лінії C57BL/6, які відторгали пухлину TS/A. Пухлинні клітини вводили ін'єкцією узгодженим за віком мишам лінії C57BL/6 і BALB/c, які раніше не піддавались яким-небудь подібним діям.

10 Ріст пухлин контролювали 2-3 рази в тиждень шляхом вимірювання двох лінійних параметрів пухлини (перпендикулярних один до одного) з використанням штангенциркуля. В день проведення аналізу пухлини *in vivo* клітини аналізували цитофлуориметрично і ставили тест на проліферацію *in vitro*.

#### 5.2. Моделі лікування пухлин

15 В 0-й день лінії пухлинних клітин дикого типу були інокульовані підшкірно в лівий бік (МОД) . В 0-й, на 3-й або 6-й день LaG-3-позитивні пухлинні клітини вводили ін'єкцією в правий бік (МОД або 5-кратна МОД) з метою визначення протипухлинної дії на нетрансфіковані клітини, розташовані у віддаленій частині тіла. Ріст пухлин контролювали так само, як це було описано вище.

20 5.3. Для цитометричного аналізу мишей інокульовали підшкірно 5-кратною МОД пухлинних клітин у відповідності до описаного вище. На 8-й день пухлини розмецеровували і тестували з використанням моноклональних антитіл CD3-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD80-FITC, CD86-FITC, 2B4-PE (клітини NK), CD22-PE (В-клетки) або hLAG-3-FITC з використанням цитофлуориметра Elite (Coilteer).

25 5.4. Для виснаження лімфоцитів мишам внутрішньочеревинно вводили 200мкг очищеного [18] анти-СБ4 (YTS 191.1.2) або анти-СО8 (YTS 169.4.2.1) моноклонального антитіла в дні -3, -2, -1, +4 і +8. Пухлинні клітини дикого типу або hLAG-3-TS/A були інокульовані підшкірно на 0-й день (МОД). Цитофлуориметричний аналіз контрольних мишей, що одержували такі дози моноклональних антитіл, показав більш ніж 95%-ную редукцію маркерної мішені в селезінці (дані в заявку не внесено).

#### 6. Дослідження *in vitro*

30 Для тестування цитотоксичності були сформовані пухлино-специфічні короточасні культури CTL на основі змішаної лімфоцитарної культури пухлинних клітин. Коротше, 30млн. спленоцитів були відібрані на 30-й день у мишей, які відторгнули пухлини, які у них утворилися. Ці клітини були простимульовані 3млн. опромінених вихідних пухлинних клітин у повному середовищі протягом 4 днів, а потім додавали 50од./мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини (Cetus) на 2 дні. Ефекторні функції спленоцитів були протестовані на 6-й день в рамках стандартного 4-годинного тесту на вихід радіоактивного хрому-51 (при співвідношенні "ефектор:мішень" від 25:1 до 200:1) проти відмічених клітин-мішеней, аутологічних пухлинних клітин, сторонньої саркомної лінії H-2<sup>d</sup> WEHI-164 і NK-чутливої клітинної лінії YAC. Ефективність лізису в трьох повторах була підрахована як  $\frac{\{[різниця шкідливих експериментального і спонтанного випромінювань в імр/хв.]\}}{[різниця середніх максимального і спонтанного випромінювань в імр/хв.]} \times 100$ . Автори визначали лізис як специфічний тоді, коли був лізис мишачих спленоцитів, що відторгали пухлинні клітини, за відрахуванням лізису позаекспериментальних спленоцитів миші.

#### Результати

##### Приклад 1

40 Поверхнева експресія hCD4, hLAG-3, mLAG-3 і молекул МНС в лініях пухлинних клітин

45 Трансфіковані пухлинні клони були забарвлені у відповідності до описаного в розділі 2.2 і проаналізовані з метою порівняння рівнів експресії hCD4, hLAG-3 і mLAG-3. В даному аналізі використовували для кожної з конструкцій по одному клону, який показав найкращі результати. Серед ліній пухлинних клітин найвищий рівень молекул МНС класу I експресували клітини TS/A, а найменший рівень експресії молекул МНС класу I - клітини MCA-205. Які-небудь істотні відмінності в рівні експресії молекул МНС класу I при порівнянні вихідних і трансфікованих клонів пухлинних клітин виявлено не було.

##### Приклад 2

Формування пухлинних моделей і вакцинація: порівняння дії hCD4 і hLAG-3

50 Дані експерименти були проведені з метою визначення пухлинорідності клітин після їх трансфікування: клітинами MCA-205, TS/A, як показано на Фіг.1 і 4 і RENCA. Індукція протипухлинного імунітету LaG-3-позитивної пухлини порівнювали з вихідними лініями пухлинних клітин.

55 Клітини MCA-205, TS/A і RENCA дикого типу ефективно проліферували у випадку, коли їх підшкірно імплантували або сингенним мишам ліній C57BL/6 і BALB/c, або мутантним мишам nude/nude. Пухлинні клітини, що виявляли стабільну трансфікованість клонами hLAG-3 в зворотній орієнтації, визначену в процесі гігроміцинового добору, характеризувалися подібними параметрами росту.

Тварини, яким вводили MCA-LAG-3, відторгали пухлину. Тварини, яким вводили MCA-CD4, виявляли низьку інтенсивність росту пухлини в порівнянні з тваринами, яким вводили клітини MCA дикого типу. Дві особини (з 5) повністю відторгали пухлину (Фіг.1).

Подібні результати були отримані в аналізі mLAG-3 (дані в заявку не внесено).

60 Ці результати вказують на те, що ектопічна експресія hLAG-3, mLAG-3 і hCD4 підвищує імуногенність лінії саркомних клітин MCA і запобігає утворенню пухлини в MCA-трансфектанта, тобто вона обумовлює формування імунітету проти злоякісної пухлини в миші.

Подібні результати були отримані в аналізі пухлинних клітин TS/A у мишей лінії BALB/c (Фіг.2).

Подібні результати також були отримані при аналізі пухлинних клітин RENCA у сингенних мишей лінії BALB/c.

65 Таким чином, протипухлинна дія виявляється:

- в різних лініях мишей, що експресують різні гени головного комплексу гістосумісності (МНС);

- при використанні різних ліній пухлинних клітин (що виявляють різний рівень власної імуногенності - TS/A<MCA).

Миші лінії "nude" (nu/nu) були інокульовані пухлинними клітинами MCA дикого типу, MCA hLAG-3 і MCA hCD4: ріст трансфектантів характеризувався подібними параметрами.

Це підтверджує той факт, що системний, довгостроковий, пухлино-специфічний, обумовлений молекулами hLAG-3 або hCD4 імунітет є опосередкованим Т-лімфоцитами [які відсутні в мишей "nude"].

Мишам, які раніше були інокульовані клітинами MCA дикого типу, MCA pLAG-3 і MCA hCD4 і через 30 днів не характеризувалися розвитком пухлини, проводили повторну стимуляцію (1-разову) 5-кратною дозою МОД пухлинних клітин або сторонньої лінії клітин MC38 карциноми товстої кишки.

Отримані результати показані на Фіг.2 і 3.

Після повторної стимуляції ріст MCA дикого типу виявився уповільненим у тварин, які виживали і яким вводились клітини MCA LAG-3 і клітини MCA CD4 (Фіг.2).

Жодного з цих ефектів не було виявлено у мишей, повторно простимульованих сторонніми пухлинними клітинами MC38 (Фіг.3).

Це вказує на те, що ектопічна експресія і hLAG-3, і hCD4 має ад'юванто-подібну дію і індукує довготривалий антиген-специфічний імунітет стосовно вихідного немодифікованого типу пухлини.

Приклад 3

Лікування пухлин MCA-205 дикого типу в мишей C57BL/6 з використанням MCA hLAG-3

В цьому експерименті були використані три групи по п'ять особин у кожній з них.

Кожну групу інокульовали в один бік клітинами MCA дикого типу, а через 3 дні - або клітинами MCA дикого типу (група 1), клітинами MCA hLAG-3 в кількості 200 тисяч клітин (група 2), або клітинами MCA hLAG-3 в кількості 1 млн. клітин (група 3).

Розмір вихідної пухлини вимірювали в кожній групі осіб протягом 30 днів. Дані наведені на Фіг.5.

Ін'єкція клітинами MCA hLAG-3 затримувала ріст пухлини в дозозалежному режимі.

Цей експеримент підтверджує наявність системного ефекту LAG-3 стосовно росту пухлини і вказує на те, що LAG-3 є лікарським засобом, що справляє дію на пухлини щільних тканин.

Приклад 4

Лікування пухлин MCA-205. дикого типу в мишей C57BL/6 з використанням розчинного LAG-3

Три групи по п'ятеро мишей в кожній були одночасно інокульовані клітинами MCA дикого типу, суспендованими або у фосфатному буфері (група 1), або у фосфатному буфері, що містить розчинний білок LAG-3 людини (shLAG-3 D1D4) в кількості або 25мкг (група 2), або 250мкг (група 3).

Розмір пухлин вимірювали в кожній групі протягом 30 днів.

Отримані дані наведено на Фіг.6.

Введення hLAG-3 D1D4 індукувало уповільнення росту пухлини в залежному від дози режимі.

Отримані дані показують, що системне введення розчинного hLAG-3 прямо обумовлює пригнічення росту пухлини *in vivo*.

Приклад 5

Експресія LAG-3 *in vivo* на поверхні пухлинних лімфоцитів (TIL) людини, що інфільтруються в карциному ниркових клітин (RCC)

В організмі людини LAG-3 експресується в тканинах (наприклад, в запалених вторинних лімфоїдних органах), але не на поверхні моноядерних клітин циркулюючої крові (PBMC) [3], причому навіть таких, як активовані *in vivo* PBMC, позитивні за антигенами CD25 і CD69. На вищому рівні LAG-3 експресований на поверхні активованих, обмежених по класу I MHC, CD8-позитивних клітинах в порівнянні з обмеженими по класу II MHC, CD4-позитивними клітинами [3], а індукція експресії LAG-3 інтерлейкином-12 або ще потужнішим поєднанням інтерлейкинів [IL2+IL12] виявляється істотною на клітинах CD4+ у порівнянні з клітинами CD4+. Білок LAG-3 є активаційним антигеном, що слабо експресується як *in vitro*, так і *in vivo*, і іноді буває важко оцінити кількісно і якісно параметри флуоресцентного мічення свіжоприготовлених пухлинних тканин. Оскільки LAG-3 може взаємодіяти з антиген-презентуючими клітинами пухлин людини, позитивними за молекулами MHC класу II, заявники оцінювали його експресію в групі пухлин, для яких відома асоційованість з Т-лімфоцитами, з застосуванням імуногістохімічних методик (процедура АРААР). Експресія LAG-3 була виявлена у всіх тестованих пухлинних лімфоцитів, що інфільтруються, (TIL), включно 5 меланом, 10 ниркових аденокарцином і 7 В-клітинних лімфом.

Вісім пацієнтів були обстежені щодо експресії LAG-3 в пухлинних лімфоцитах, що інфільтруються, у випадках наявності карциноми ниркових клітин.

В експериментах з цитофлуориметричним тестуванням були використані розмацеровані пухлинні тканини. Експресія LAG-3 була досліджена в популяції лімфоцитів, визначеній за її розмірами і ступенем гранулярності. Загиблі клітини були виключені з аналізу після їх виявлення за допомогою фарбування йодистим пропідієм. Клітини TIL позитивно забарвлювались моноклональним антитілом 17B4, специфічним стосовно епітопу в складі позаклітинної петлі поліпептиду LAG-3.

Отримані результати подані на Фіг.7 для пацієнтів P1-P3, і на Фіг.8 для пацієнтів P4 і P5.

Для всіх пацієнтів цієї групи було виявлено зсув піку флуоресценції, що вказує на зв'язування антитіла 17B4 на поверхні цих лімфоцитів.

Таким чином, у всіх пацієнтів клітини TIL дійсно експресували LAG-3 за наявності істотної частки (30%) RCC-TIL у незалежних пацієнтів.

В усіх вибірках для CD3-позитивних Т-лімфоцитів було виявлено експресування LAG-3 (в межах 11%-48%) за

більшого рівня експресії і Т-лімфоцитів CD8+.

З іншого боку, моноядерні клітини периферійної крові були негативними щодо LAG-3 в цих самих пацієнтів: це показує, що експресія LAG-3 на поверхні лімфоцитів є процесом, спорідненим Т-клітинній активації в пухлинах.

Більше того, при використанні тесту ТІФА (твердофазний імуоферментний аналіз) було показано, що високі концентрації (біля 1нг/мл) розчинного LAG-3 виявляються в крові ракових хворих.

Ці дані показують, що білок LAG-3 є молекулою, втягнутою в протипухлинну відповідь, що природно зустрічається у людини, і, відповідно, підтверджує застосування LAG-3 в бустингу імунологічного контролю за пухлинними клітинами у людини.

#### Приклад 6

Опосередкування первинного відторгнення CD8-позитивними Т-лімфоцитами

Відторгнення трансфектантів MCA-205 hLAG-3 і TS/A hLAG-3 було залежним від Т-лімфоцитів, оскільки відторгнення зовсім не спостерігалось у дефіцитних за Т-клітинами ("безтимусних") мишей nu/nu. Після ін'єкції 5-кратної МОД таких клітин пухлини по 10мм у діаметрі утворювалися на 8-й день: розмацеровані пухлинні клітини і лімфоцити, що інфільтруються в пухлину, аналізували методом FACS. Пухлини дикого типу, так само як і трансфектанти по LAG-3, що виявляються початково негативними за антигенами CD80 і CD86, зберігали негативність за цими поверхнево-клітинними маркерами після інокуляції, у той час як LAG-3 стабільно виявлявся в пухлинах hLAG-3 при використанні моноклонального антитіла 17B4, специфічного стосовно LAG-3 (дані в заявку не внесено). В 8-денних пухлинах-експлантатах частка CD8-позитивних клітин склала приблизно 31% в пухлинах MCA-205 hLAG-3 в порівнянні з 4% в пухлинах MCA-205 (Фіг.9а), в той час як ніяких відмінностей не було виявлено при аналізі наборів клітин CD4+, B або NK. Подібні результати були отримані при аналізі пухлин TS/A (дані в заявку не внесено). Нарешті, відносний внесок CD4- і CD8-позитивних Т-лімфоцитів в формування протипухлинної відповіді був проаналізований шляхом виснаження мишей за цими клітинними комплексами. Як показано на Фіг.9b, введення CD8-специфічного моноклонального антитіла в момент інокуляції дозою МОД hLAG-3/TS/A запобігає відторгненню пухлинних клітин hLAG-3/TS/A. Участь CD4-позитивних хелперних Т-лімфоцитів підтверджується конкретним ефектом, що спостерігається при використанні моноклонального антитіла, специфічного стосовно CD4 (Фіг.9b).

#### Приклад 7

Посилення пухлино-специфічної CTL-відповіді дією hLAG-3

Для подальшого з'ясування механізму протипухлинної активності LAG-3 автори оцінювали вплив цього білка на утворення цитотоксичних Т-лімфоцитів (клітин CTL), здатних знищувати неімуногенні клітини TS/A. Спленоцити були зібрані у мишей, яким імплантували пухлину hLAG-3/TS/A і які були здатні відторгати пухлинні клітини дикого типу при 5-кратній дозі МОД в експерименту за повторної стимуляції, і були повторно простимульовані in vitro на 6 днів опроміненими клітинами TS/A. Активність клітин CTL була визначена в спленоцитах мишей, яким були імплантовані пухлинні клітини hLAG-3 (Фіг.9c), у той час як спленоцити тварин, які ще взагалі не втягувались в експеримент, не виявляли цитотоксичної активності зовсім (дані в заявку не внесені). Активність CTL, мабуть, виявляється селективною стосовно неімуногенних клітин TS/A, оскільки сингенні саркомні клітини WENI, так само як і NK-чутливі клітини YAC, не лізувалися (Фіг.9c).

#### Приклад 8

Лікування сформованих пухлин

Автори винаходу показали, що контроль росту пухлини може бути забезпечений шляхом використання розчинної молекули LAG-3, що береться в якості вакцинного ад'юванта. Однократна ін'єкція суміші антигену (опромінені пухлинні клітини) разом з бустерним чинником (mLAG-3/Ig - 1мкг або 0,1мкг) виявляється ефективною (Фіг.10).

Передбачається, що in vivo молекули розчинного LAG-3 можуть передавати сигнал клітинам острівців Лангерганса (або будь-яким антиген-презентуючим клітинам, що знаходяться у вакцинному сайті) через молекули класу II головного комплексу гістосумісності (MHC) про ефективне "включення" CDS-позитивних Т-лімфоцитів.

#### Бібліографія

- [1]. Triebel et al., 1990, J. Exp. Med., 171, 1393-1405.
- [2]. Baixeras et al., 1992, J. Exp. Med., 176, 327-337.
- [3]. Huard et al., 1994, Immunogenetics, 39, 213.
- [4]. Huard et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5744-5749.
- [5]. Huard et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24, 3216-3221.
- [6]. Huard et al., 1996, Eur. J. Immunol., 26, 1180-1186.
- [7]. Miyazaki et al., 1996, Science, 272, 408.
- [8]. Angevin et al., 1997, Intern., J. Cancer,...
- [9]. Lurquin et al., 1992, Cell, 71, 1093.
- [10]. Takebe et al., 1988, J. Mol. Cell. Biol., 8, 466.
- [11]. Cosgrove et al., 1991, Cell., 66, 1051.
- [12]. Restifo N.P. & Wunderlich J.R., 1995, "Biology of Cellular Immune Responses: Biological Therapy of Cancer", eds. V.DeVita, S.Hellman & S.Rosenberg, Lippincott, Philadelphia, pp.3-37.
- [13]. Pardoll D.M., 1995, Annu. Rev. Immunol., 13, 399-415.
- [14]. Wade W.F., Davoust J., Salamero J., Andre P., Watts T.H., Cambier J.C., 1993, Immunol. Today, 14, 539-542.
- [15]. Koch F., Stanzl U., Jennewein P., Janke K., Heufler C, Kampgen E., Romani N, Schuler G., 1996, J.

Exp. Med., 184, 741-746.

[16]. Bruniquel D., Borie N., Triebel F., 1997, Immunogenetics, 47, 96-98.

[17]. Huard B., Prigent P., Tournier M., Bruniquel D., Tribel F., 1995, Eur. J. Immunol., 25, 2718-2721.

[18]. McKinney M.M. & Parkinson A., 1987, J. Immunol. Methods, 96, 271-273.

[19]. Tighe H, Corr M., Roman M., Raz E., 1998, Immunol. Today, 19, 89-96.

## Формула винаходу

1. Застосування ліганду МНС класу II, здатного посилювати антиген-специфічну імунну відповідь, вибраного з групи, що складається з CD4, LAG-3, і похідного CD4 або LAG-3, яке зберігає здатність зв'язуватись з молекулою МНС класу II, з якою зв'язується CD4 або LAG-3 для виробництва лікарського засобу, призначеного для профілактики або лікування патологічних станів, пов'язаних з антигенспецифічною імунною відповіддю.

2. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що вказана антигенспецифічна імунна відповідь є опосередкованою Т-клітинами імунною відповіддю.

3. Застосування за п. 1 або 2, яке відрізняється тим, що вказане похідне LAG-3, яке зберігає здатність зв'язуватись з молекулою МНС класу II, з якою зв'язується LAG-3, являє собою мутант або розчинний фрагмент LAG-3.

4. Застосування за п. 3, яке відрізняється тим, що розчинний фрагмент LAG-3 вибраний з групи, яка складається з фрагментів D1-D2 і D1-D4 LAG-3.

5. Застосування за п. 3 або 4, яке відрізняється тим, що антигенспецифічна імунна відповідь являє собою опосередковану CD8+ Т-клітинами імунну відповідь.

6. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що лікарський засіб містить ліганд МНС класу II у формі трансфікованих клітин, що експресують ліганд, або у формі розчинної молекули зазначеного ліганду.

7. Застосування за п. 1 або 2, яке відрізняється тим, що лікарський засіб являє собою вакцину для профілактики патологічного стану або лікування патологічного стану у разі його виникнення.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, яке відрізняється тим, що ліганд МНС класу II вводиться в комбінації з антигеном, проти якого формується імунна відповідь.

9. Застосування за п. 8, яке відрізняється тим, що антиген вибраний з групи, яка складається з вірусних, бактеріальних і паразитарних антигенів.

10. Застосування за п. 8, яке відрізняється тим, що антиген являє собою пухлинний антиген.

11. Застосування за п. 7, яке відрізняється тим, що вакцина містить ліганд МНС класу II у вигляді голої плазмиди, яка включає послідовність ДНК, що кодує LAG-3 або CD4

12. Застосування за п. 11, яке відрізняється тим, що гола плазмідна додатково містить послідовність ДНК, яка кодує антиген, проти якого формується імунна відповідь.

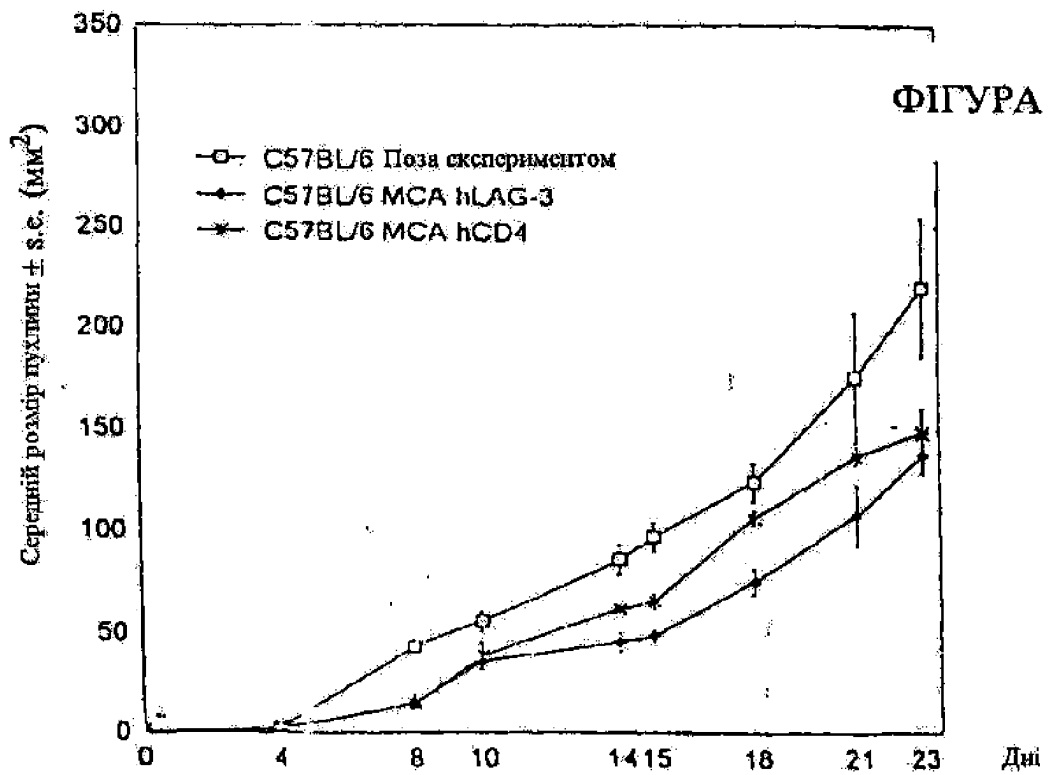
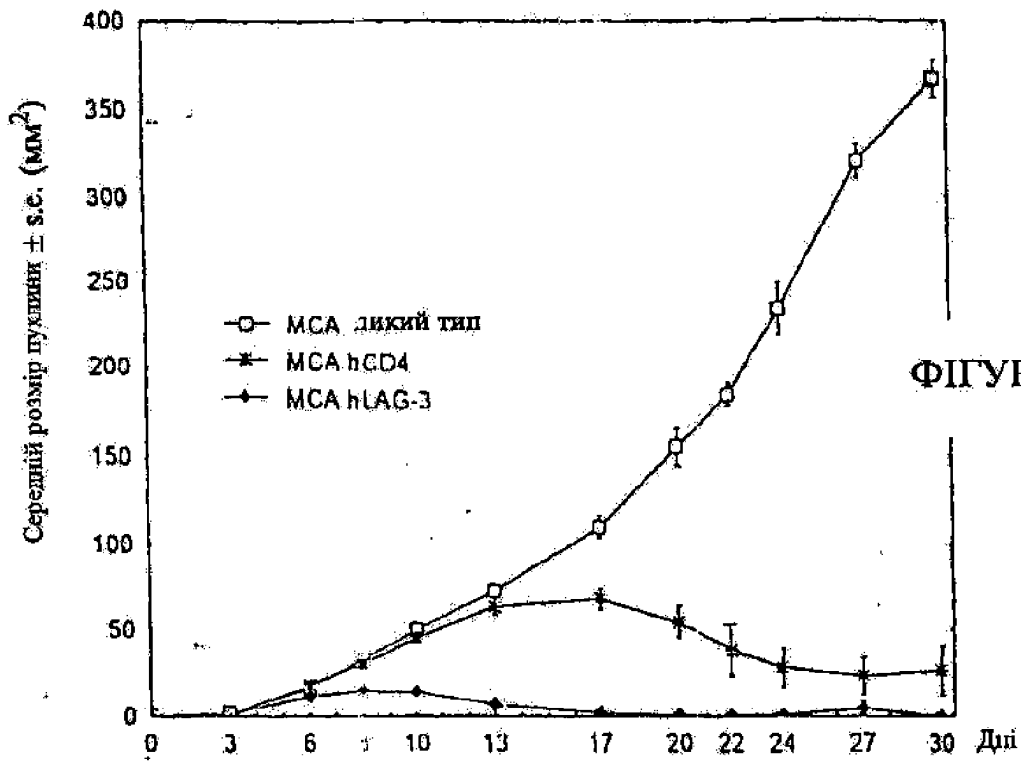
13. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, яке відрізняється тим, що патологічний стан являє собою злоякісну пухлину.

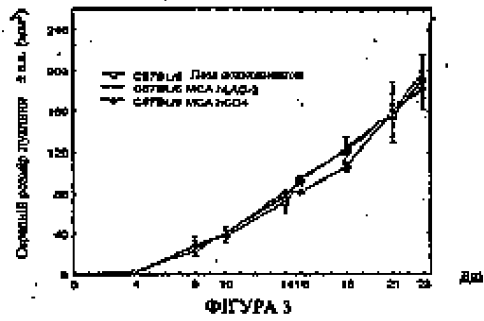
14. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, яке відрізняється тим, що патологічний стан являє собою інфекційне захворювання.

15. Застосування розчинного фрагменту LAG-3 за п. 4 або 5 для виробництва лікарського засобу, призначеного для протипухлинної імунотерапії або імунотерапії при інфекційних захворюваннях.

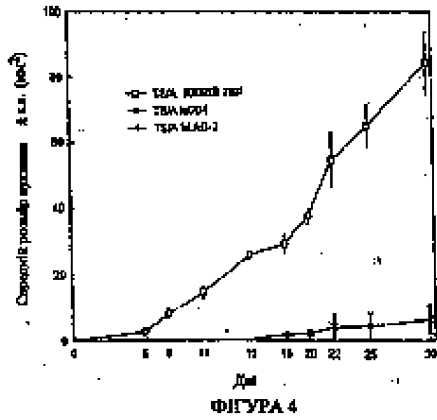
16. Фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість антигену, здатного індукувати антигенспецифічну імунну відповідь, разом з ефективною кількістю ліганду МНС класу II, здатного посилювати антигенспецифічну імунну відповідь, вибраного з групи, що складається з CD4, LAG-3 і похідного CD4 або LAG-3, яке зберігає здатність зв'язуватись з молекулою МНС класу II, з якою зв'язується CD4 або LAG-3.

17. Фармацевтична композиція за п. 16, яка відрізняється тим, що ліганд МНС класу II являє собою LAG-3 або похідне LAG-3, яке зберігає здатність зв'язуватись з молекулою МНС класу II, з якою зв'язується LAG-3.

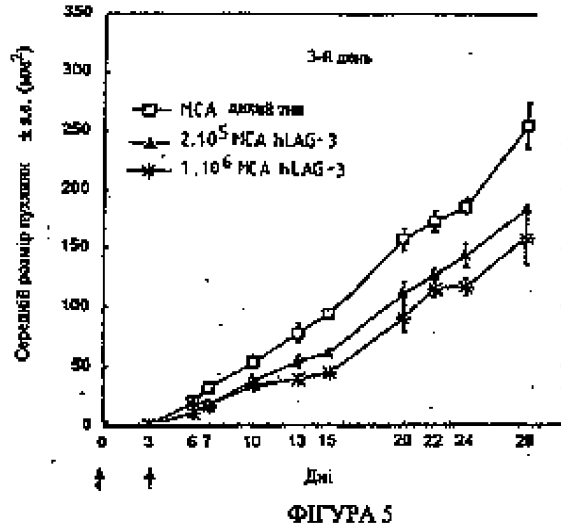




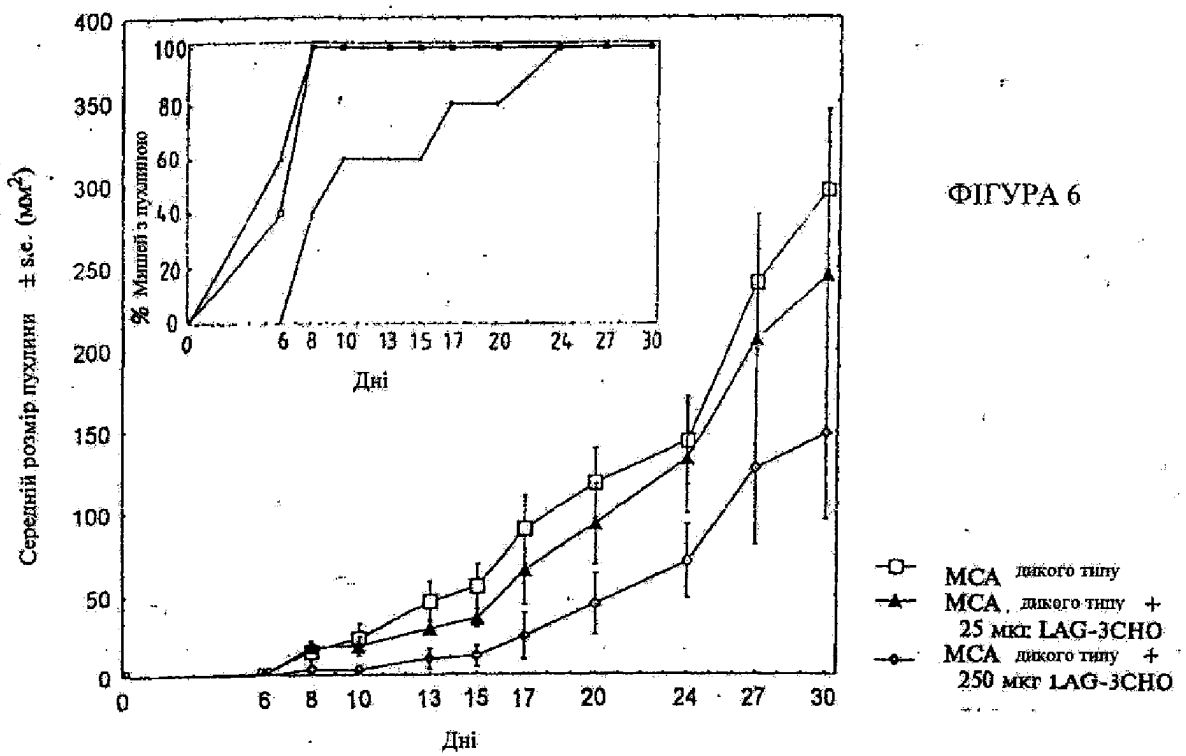
ФІГУРА 3



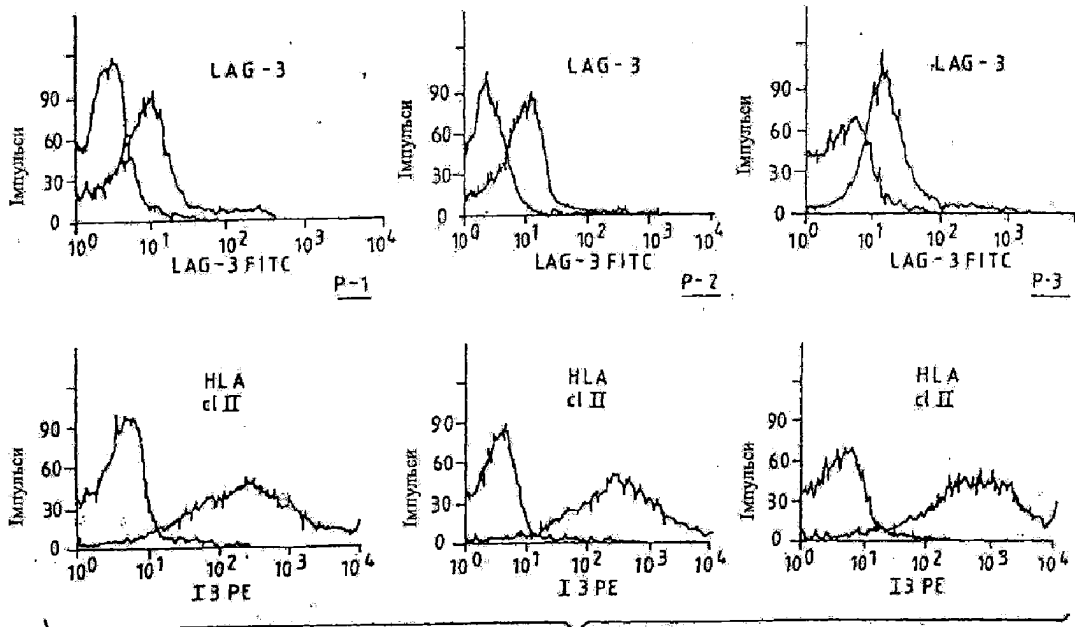
ФІГУРА 4



ФІГУРА 5



ФІГУРА 6

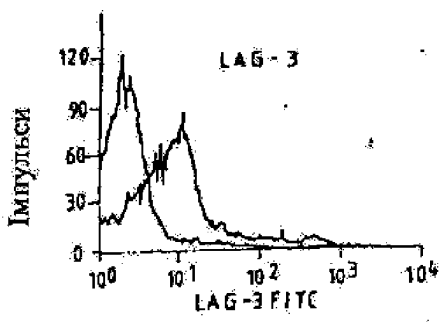


ФІГУРА 7

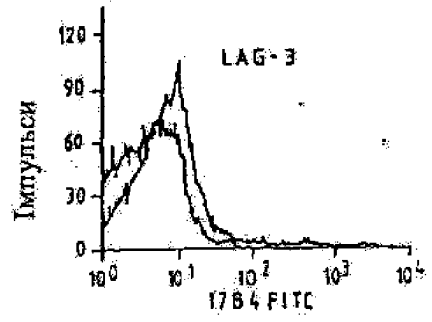
UA 75322 C2

UA 75322 C2

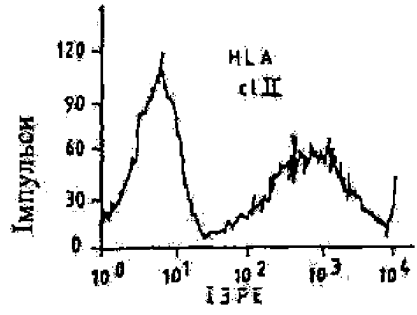
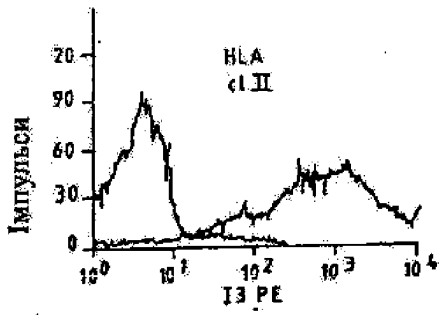
UA 75322 C2



P-4

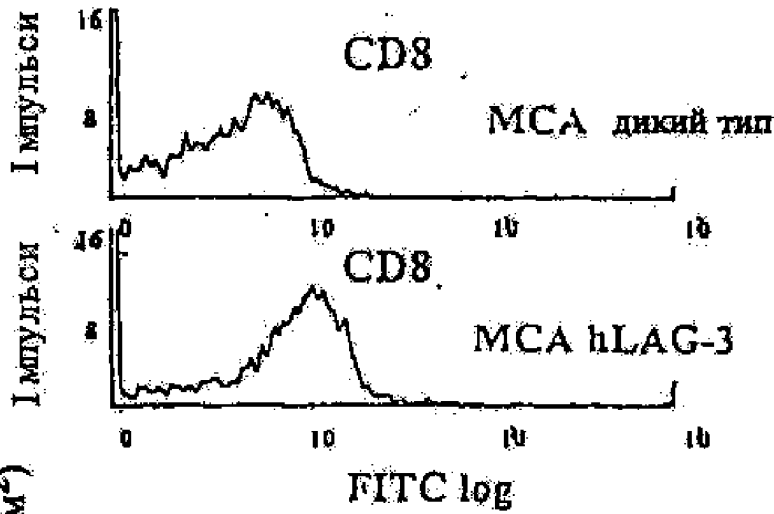


P-5



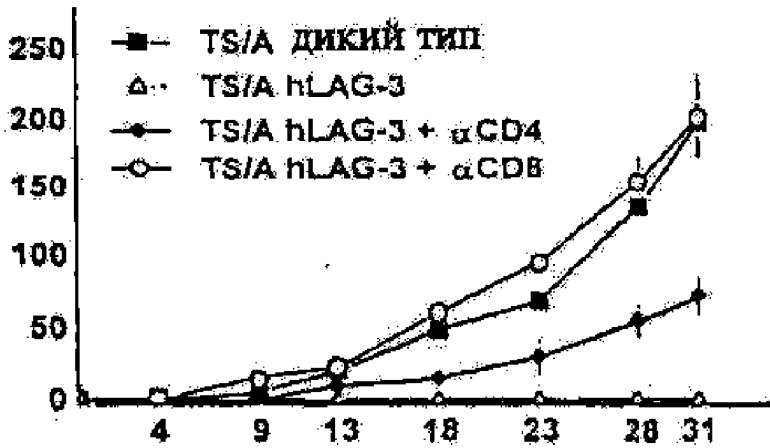
ФІГУРА 8

UA 75322 C2



ФІГУРА 9А

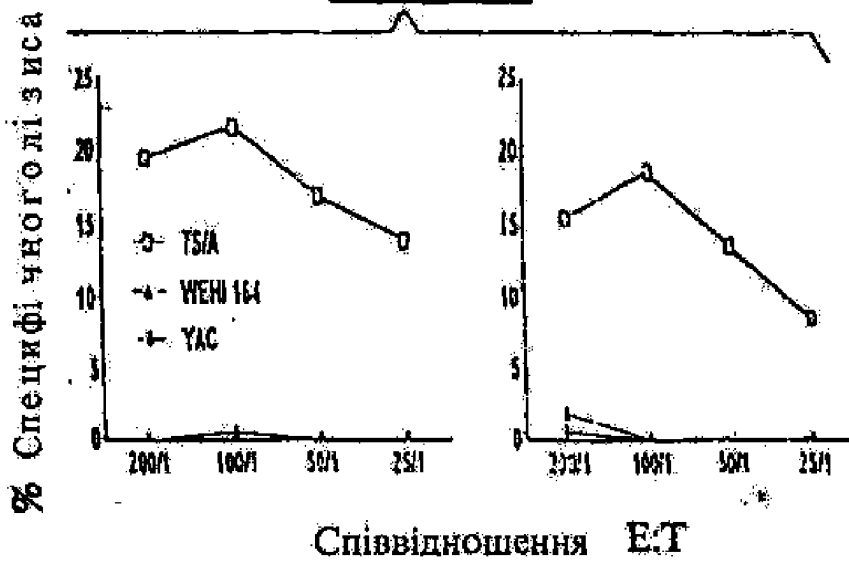
Середній розмір пухлини ± s.e. (мм<sup>2</sup>)

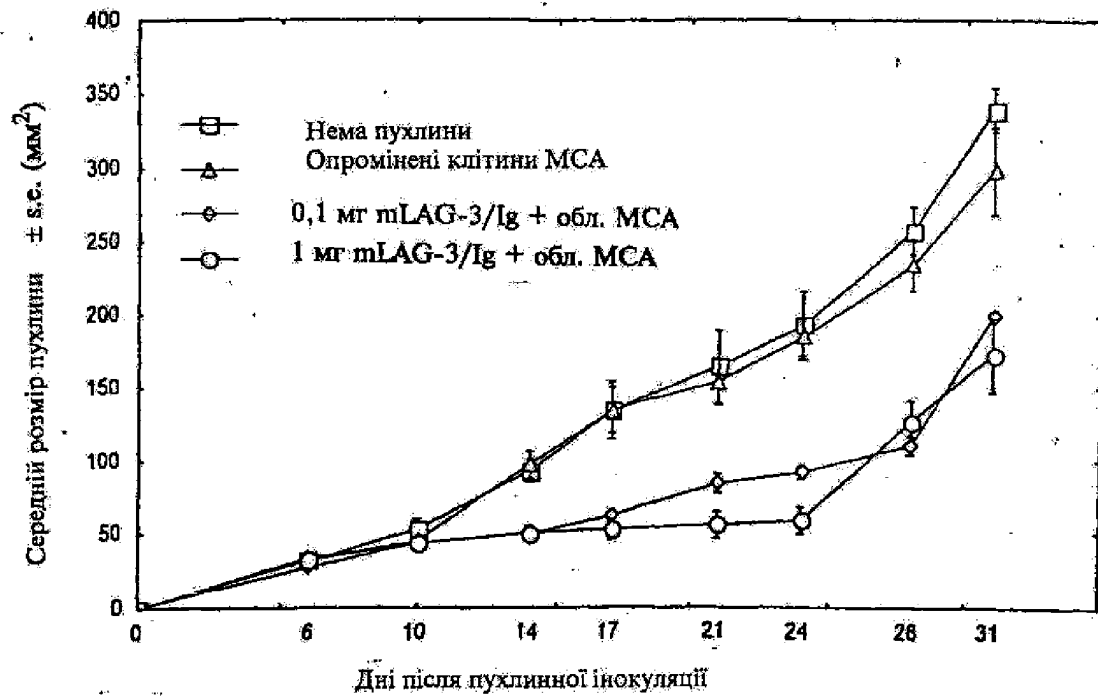


ФІГУРА 9В

Дні після інюкуляції пухлинних клітин TS/A

ФІГУРА 9С





ФІГУРА 10

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 4, 15.04.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

UA 75322 С2

UA 75322 С2