



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **324378**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

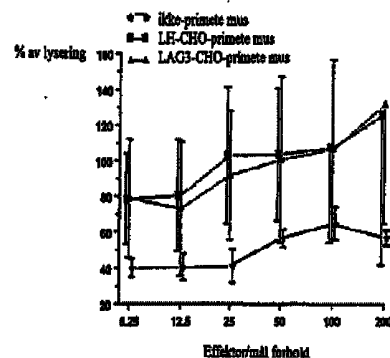
A61K 38/19 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19992569	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.11.29 PCT/EP96/05280
(22)	Inng.dag	1999.05.27	(85)	Videreføringsdag	1999.05.27
(24)	Løpedag	1996.11.29	(30)	Prioritet	
(41)	Alm.tilgj	1999.05.27			
(45)	Meddelt	2007.10.01			
(73)	Innehaver	Applied Research Systems ARS Holding NV, Pietermaai 15 CURACAO, AN			
(72)	Oppfinner	Mauro Biffoni, Roma, IT Ruben Papoian, Ariccia, IT			
(74)	Fullmektig	Protector Intellectual Property Consultants AS, Postboks 5074 Majorstua, 0301 OSLO			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av en genetisk konstruert celle for fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse			
(56)	Anførte publikasjoner	Analytical Biochemistry 241, 93-102, 1996 J. American S. Nephrology, vol. 7, no. 9, Sep. 1996, A3252, J. Strehlau et al. J. Exp. Med. Vol. 176, Aug. 1992, side 327-337 Løselige LAG-3 fragmenter til bruk i terapeutiske sammensetninger for å undertrykke immunforsvaret. WO 91/10682			
(57)	Sammendrag				

Det blir beskrevet en fremgangsmåte for å hindre podingsforkastelse av transplanterte celler, vev eller organer uten generell immunundertrykking. Fremgangsmåten benytter et nylig oppdaget protein, LAG-3. Når allogene eller xenogene celler blir konstruert til å uttrykke LAG-3 på sin overflate og transplantert, blir immunødeleggelse av celle, vev eller organ forhindret, mens vertens immunsystem forblir funksjonelt. En spesiell anvendelse av denne metoden tillater preparering av en universell genterapi vertscelle som uttrykker LAG-3 på sin overflate for beskyttelse mot podingsforkastelse av vertens immunsystem.



Foreliggende oppfinnelse er rettet mot anvendelse av en genetisk konstruert celle, omfattende DNA som er stabilt integrert i cellen og koder for et transmembran LAG-3 protein på sin overflate, i fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en vertes immunsystem. Mer spesifikt angår oppfinnelsen

5 anvendelse av en universal gen terapi vertcelle som uttrykker LAG-3 proteinet på sin overflate.

Lymfocytaktiverende gen (LAG-3) er et medlem av immunoglobulin superfamilien, og blir selektivt transkribert i humant aktiverte T (både CD4⁺ og CD8⁺) og NK celler

10 (Triebel et al, 1990). Sekvensdata, sammenliknet exon/intron organisering, og kromosomal lokalisering avslørte at LAG-3 er nært beslektet med CD4 (Baixeras et al, 1992). Det nære slektskap mellom LAG-3 og CD4 ble ytterligere styrket ved demonstrasjonen at begge delte samme ligand, det vil si MHC klasse II molekyler (Baixeras et al, 1992). I motsetning til CD4, binder imidlertid LAG-3 ikke til humant

15 immunsvikt virus gp120 (Baixeras et al, 1992). *In vivo* ble LAG-3 ekspresjon verken funnet i primære lymfoide organer, slik som milt, mukosa-assosiert lymfoid vev eller normale lymfeknuter. Det ble imidlertid raskt påvist betente tonsiler, eller lymfeknuter med follikulær hyperplasi, og dette støtter det syn at selv *in vivo* blir LAG-3 uttrykt etter aktivering (Huard et al, 1994A). Antigen spesifikk stimulering av T-celle kloner i

20 nærvær av anti-LAG-3 monoklonalt antistoff (mAb) ledet til øket tymidin inkorporering, høyere ekspresjon av aktiveringsmarkør CD25 og forbedret/forsterket cytokin produksjon (Huard et al, 1994B).

Tilsetning av en oppløselig rekombinant form av LAG-3 hemmet således antigen-spesifikk T-celle proliferasjon, hvilket antyder en regulatorisk rolle for LAG-3 i CD4⁺ T-lymfocyt aktivering (Huard, 1996) og dens involvering i oppheving av pågående immun responser. I den senere tid har det blitt vist at LAG-3 også virker som en co-reseptor for NK celler og definerer forskjellige måter for tumor celledreping kontrollert av det naturlige immunsystemet (Miyazaki et al., 1996).

30

Mekanismen ved hvilken en T celle responderer til et fremmed (allogent eller xenogent) protein eller celle eller er montert er relativt godt forstått. Antigenpresenterende celler (APC) blir tiltrukket til områder med inflammasjon eller skade (som kan være indusert

av kirurgisk transplantasjon). Repertoaret til T celler i periferien overvåker konstant vev for evidens av patogener eller tilstedeværelse av fremmed (allo- eller xenogent) vev. Med en gang disse varslings-signalene blir gjenkjent, vil APC sluke proteinet, fordøye det og presentere det for vertens immunsystem.

5

Allogene og syngene tumorceller har blitt konstruert til å uttrykke viral IL-10 som induserer lokal anergi til tumorene. En slik behandling påvirket ikke forkastelsen av en ikke-transdusert tumor på et fjerntliggende sted (Suzuki et al, 1995). IL-10 levert lokalt antas å endre T celle repertoar reaktiviteten til den transplanterte cellen til en Th2

10 fenotype som ikke er cytolytisk og kan til og med være beskyttende.

Celler som naturlig uttrykker Fas liganden har blitt transplantert over allogene og immunogene barrierer uten immunundertrykking. Overvåking av implantasjonsstedet med vert T celler resulterte i dreping når de kom i kontakt med Fas liganden (Bellgrau et all., 1995). Forkastelse av allografter med pankreatiske øyer har blitt forhindret ved co-transplantasjon av syngeniske myoblaster genetisk konstruert til å uttrykke Fas liganden (Lau et al., 1996).

WO 95/90750 beskriver oppløselige polypeptid fraksjoner som består av hele eller deler av et immunoglobulin-type ekstracellulær LAG-3 protein domene, for behandling av patologier som krever immunsuppresjon.

Strehlau beskriver en studie av LAG-3 og TH1 cytokin ekspresjon i renale allograft biopsier ved sammenslikning av størrelsen på genekspresjon i akutt cellulær forkastelse. Det beskrives den spesielt høye oppreguleringen av transkriptene for LAG-3 i akutt cellulær forkastelse. (J. American S. Nephrology, vol 7, nr 9, Sep. 1996, A3252, J. Strehlau et al.)

Immunsystemet er godt utstyrt for raskt å identifisere fremmed, sykelig eller betent vev og raskt å ødelegge det. Dette har alltid vært en hovedbarriere ved vev, organ og celletransplantasjon så vel som genterapi. Hovedproblemene er generelt vært forbundet med kronisk immunsuppresjon, innkapsling eller immunisolering. De uventede

30

sideeffektene av kronisk immunsuppresjon innbefatter øket følsomhet overfor opportunistisk infeksjon og tumordannelse.

- Ønske om langtids akseptans av transplantert vev i fravær av sammenhengende immunsuppresjon er et langsiktig mål innenfor human medisin.

- Det har nå blitt funnet at transplantasjon av celler som uttrykker et LAG-3 protein på sin overflate resulterer i beskyttelse mot podingsforkastelse av vertens immunsystem. Foreliggende oppfinnelse skaffer således til veie en anvendelse av en genetisk konstruert celle, omfattende DNA som er stabilt integrert i cellen og koder for et transmembran LAG-3 protein på sin overflate, i fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en verts immunsystem.

- Denne DNA kan være exogen, eller i en spesiell utførelsesform av oppfinnelsen, endogent DNA, hvis ekspresjon blir aktivert eller modifisert gjennom målrettet innsetting av en regulatorisk sekvens og/eller et amplifiserbart gen ved homolog rekombinasjon. LAG-3 proteinet er et protein som blir gjenkjent av antistoffer rettet mot LAG-3.

- Når cellen er en del av vevet eller organet som skal bli transplantert, kan transfeksjon av LAG-3 DNA bli gjennomført direkte på vevet eller organet som skal bli transplantert. Særlig er cellen en universal genterapi vertscelle, og kan hensiktsmessig for eksempel være en hvilken som helst av somatisk eller "ex vivo" genterapi.

- I en spesifikk utførelsesform omfatter genterapi vertscellen videre exogent DNA som koder for det terapeutiske midlet som er aktuelt, og de genetisk konstruerte cellene blir benyttet som et terapeutisk middel. Begrepet "terapeutisk" slik det her blir anvendt, innbefatter behandling og/eller profylakse.

- I en annen utførelsesform er genet som koder for et aktuelt terapeutisk middel til stede i genomet av cellen og cellen omfatter videre exogent DNA som koder for en

regulatorisk sekvens eller et amplifiserbart gen for aktivering eller modifisering av ekspresjon av det aktuelle endogene genet.

5 Den genetisk konstruerte cellen i oppfinnelsen kan ikke på noen måte inneholde bare exogent LAG-3 DNA, som skal bli anvendt i en blanding av andre genterapi vertsceller som inneholder den terapeutiske DNA som er interessant.

Cellen i foreliggende oppfinnelse blir fortrinnsvis valgt fra myoblaster, fibroblaster, hematopoetiske stamceller, embryoniske stamceller, føtale leverceller, umbilikale vene
10 endotele celler og CHO celler.

Celler som over, som stammer fra transgene dyr, er også innenfor rekkevidden av foreliggende oppfinnelse.

Det er et ytterligere mål ved foreliggende oppfinnelse å anvende et transmembran LAG-
15 3 protein, innbefattende mutanter og varianter av disse, uttrykt på overflaten av cellene, ved fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en verts immunsystem.

Videre skaffer foreliggende oppfinnelse til veie anvendelse av en celle som omfatter
20 DNA som koder for et transmembran LAG-3 protein, uttrykt på overflaten av cellen, i fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en verts immunsystem.

Anvendelse av nevnte celle som uttrykker LAG-3 på sin overflate, i en fremstilling av et
25 medikament som skal bli blandet med celler, vev eller organer som skal bli transplantert, for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en verts immunsystem, er også innenfor rekkevidden av foreliggende oppfinnelse.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 - Cytotoksisk aktivitet versus LH-CHO celler av splenocytter fra mus primet med LAG-3-CHO eller LH-CHO celler. Gjennomsnittsverdi ($\pm$ SD) av 5 mus primet som angitt i tegnforklaringen; 2 ikke-primete mus ble også evaluert.

- 5 Figur 2 - Cytotoksisk aktivitet versus LAG-3-CHO celler av splenocytter fra mus primet med LAG-3-CHO eller LH-CHO celler. Gjennomsnittsverdi ($\pm$ SD) fra 5 mus primet som angitt i tegnforklaringen; 2 ikke-primete mus ble også evaluert.

Figur 3 - Kart av D α pattedyr ekspresjonsvektor.

- 10 Forkortelser som blir anvendt: DHFR, dehydrofolat transkripsjonsenhet (Subramani et al., 1981); pML, derivat av pBR322 (Luski and Botchan, 1981); hAIVSA, fragment fra intron A fra α subenheten av humane glykoprotein hormoner (Fiddes and Goodman, 1981); MMT-1, promoter fra mus metallothionein 1 (Hamer and Walling, 1982).

- 15 Hundre tusenvis av mennesker dør hvert år som et resultat av hjerte-, nyre-, lever-, lunge- eller pankreassvikt. Den enkleste og mest effektive terapien er transplantasjon.

Terapi som er forbundet med transplantasjon av celler, vev eller organer induserer en generell immun-beskyttende tilstand i verten relativt til den podete cellen, vevet eller

- 20 organet. Det er ønskelig å etablere en podingsspesifikk beskyttelse mot forkastelse av vertens immunsystem særlig i allogen transplantasjon, xenogen transplantasjon og genterapi. Det er således ønskelig å hemme toleranse til tumor vev eller på annen måte tillate vertens immunsystem å angripe tumorvevet.

- 25 Foreliggende oppfinnelse er følgelig rettet mot alle metoder som er beskrevet over og anvender det funn at transplantasjon av celler eller vev som uttrykker et transmembran LAG-3 protein resulterer i beskyttelse mot podingsforkastelse av vertens immunsystem.

Oppfinnelsen benytter det nylig oppdagede genet og proteinet LAG-3, som normalt

- 30 uttrykkes på aktiverte T celler og aktiverte NK celler.

Definisjonen av "transmembran LAG-3 protein" slik det her blir anvendt refererer til et hvilket som helst transmembran protein som inneholder ekstracytoplasmisk domene av LAG-3, dens salter, funksjonelle derivater, forløpere og aktive fraksjoner så vel som dens aktive mutanter og aktive varianter, som alle blir uttrykt på overflaten av en celle.

5

Definisjonen referer også til et transmembran protein uttrykt i sin naturlige tilstand eller som kan bli sammensmeltet, f. eks. ved genetisk engineering, til et annet protein, slik som et glykosyl fosfatidylinositol anker eller et hvilket som helst av relevante fragmenter av annet transmembran protein, for eksempel TNF-reseptor, MPL-ligand eller et transmembran immunoglobulin.

10

Definisjonen "salter" slik det her blir anvendt refererer her både til saltene av karboksylgruppene og saltene av aminfunksjonene til forbindelsene som er oppnåelige ved kjente metoder. Saltene av karboksyl-gruppene omfatter uorganiske salter som for eksempel natrium-, kalium-, kalsiumsalter og salter med organiske baser slik de som er dannet med amin som trietanolamin, arginin eller lysin. Saltene av aminogrupper omfatter for eksempel salter med uorganiske syrer som saltsyre og med organiske syrer som eddiksyre.

15

Definisjonen "funksjonelle derivater" slik det her blir anvendt, referer til derivater som kan bli fremstilt fra de funksjonelle gruppene som er tilstede på de laterale kjedene av aminosyredelene eller på de terminale N- eller C-gruppene i henhold til kjente metoder og er omfattet av oppfinnelsen når de er farmasøytisk akseptable, det vil si når de ikke ødelegger protein aktiviteten eller ikke gir toksisitet til de farmasøytiske sammensetningene som de er inneholdt i. Slike derivater innbefatter f.eks. estere eller alifatiske amider av karboksyl-gruppene og N-acyl derivater av frie aminogrupper eller O-acyl derivater av frie hydroksylgrupper og blir dannet med acyl-grupper, som f. eks. alcanoyl- eller aroylgrupper.

20

25

"Forløpere" er forbindelser som blir omdannet til LAG-3 i det menneskelige eller animalske legemet.

30

"Aktive fraksjoner" av proteinet i foreliggende oppfinnelse refererer til et hvilket som helst fragment eller forløper til polypeptid kjeden av forbindelsen selv, alene eller i kombinasjon med beslektede molekyler eller residier som er bundet til dem, for eksempel residier av sukker eller fosfater, eller aggregater av polypeptid molekylet når
5 slike fragmenter eller forløpere viser den samme aktiviteten av LAG-3 som medikamentet.

Foretrukkede "aktive fraksjoner" er oppløselige fraksjoner fra ekstracellulær del av LAG-3 proteinet, inkludert en eller flere av de fire domenene, D1, D2, D3 og D4 til
10 ekstracytoplasmisk domene av LAG-3.

Definisjonen "aktive mutanter" slik den her blir anvendt refererer til andre proteiner eller polypeptider der en eller flere aminosyrer i strukturen er eliminert eller substituert med andre aminosyrer, eller en eller flere aminosyrer er tilføyd til den sekvensen for å
15 oppnå polypeptider eller proteiner som har samme aktivitet som LAG-3. Arg 73 og/eller Arg 75 og/eller Arg 76 kan for eksempel bli substituert med en ulik aminosyre, fortrinnsvis med Glu.

De "aktive variantene" av LAG-3 er forskjellig spleisede varianter så vel som alle
20 primære gen transkripter, som er avledet fra alternative spleise mekanismer ved forskjellig kløyvingssteder i genet. Foretrukkede varianter er oppløselige eller transmembran proteiner som mangler D3 og/eller D4 domener av ekstracellulær del av LAG-3, eventuelt inneholdende noen få ytterligere aminosyrer etter D2 eller D3 domenen.

25

Ekspresjon av transmembran LAG-3 protein på overflaten av en celle blir verifisert med immunoreaktive metoder. Transmembran proteinet blir gjenkjent for eksempel av anti-LAG-3 antistoffene 11E3 (Deponering Nr. CNCM I-1612), 17B4 (Deponering Nr. CNCM I-1240) eller 15A9 (Deponering Nr. CNCM I-1239).

30

Foreliggende oppfinnelse refererer også til en blanding av polypeptider og derivater som nevnt over.

Når anvendt i foreliggende beskrivelse og krav, er uttrykkene "LAG-3", "LAG-3 protein" eller "LAG-3 molekyl" tiltenkt å innbefatte naturlige, syntetiske og rekombinante former av polypeptidet så vel som alle definisjonene som er beskrevet over.

Cellene i foreliggende oppfinnelse kan bli selektert fra primære eller sekundære celler. Slik det blir brukt her vil begrepet primære celler innbefatte celler som er tilstede i en suspensjon av celler isolert fra en vertebrat vev kilde (forut for at de blir pletert det vil si festet til et vevskultur substrat slik som en skål eller flaske), celler som er tilstede i et eksplantat avledet fra vev, både av tidligere typer av celler pletert for første gang, og cellesuspensjoner avledet fra disse pleterte cellene. Begrepet sekundær celle eller cellestamme referer til celler ved alle etterfølgende trinn i dyrkingen. Dette innebærer at første gang en pletert primær celle blir fjernet fra dyrkingssubstratet og pletert på nytt gjennomført, blir den her referert til som en sekundær celle, det samme gjelder celler i etterfølgende gjennomføringer. Sekundære celler er cellestammer som består av sekundære celler som er ført gjennom en eller flere ganger. En cellestamme består av sekundære celler som: 1) har blitt ført gjennom en eller flere ganger; 2) framviser et begrenset antall av gjennomsnittlige populasjonsdoblinger i kultur; 3) framviser egenskaper med kontakt-hemmet, ankringsavhengig vekst (anker-avhengighet kan ikke brukes på celler som er formert i suspensjonskultur); og 4) er ikke udødeliggjort. En "klonal cellestamme" er definert som en cellestamme som er avledet fra en enkel grunnleggende celle. En "heterogen cellestamme" er definert som en stamme som er avledet fra to eller flere grunnleggende celler.

Foreliggende oppfinnelse innbefatter primære og sekundære somatiske celler, slik som fibroblaster, keratinocytter, epitelceller, endotelceller, gliale celler, nerveceller, dannede elementer fra blodet, muskelceller, andre somatiske celler som kan bli dyrket og somatiske celleforløpere, som har blitt transfektert med exogent DNA som blir stabilt integrert i deres genomer eller uttrykt i cellene episomalt. De resulterende cellene blir referert til som henholdsvis som transfekterte primære celler og transfekterte sekundære celler.

Når genet som koder for et LAG-3 molekyl blir innsatt i pattedyr celler og cellene blir transplantert inn i en allogen eller xenogen vert, blir de gjenkjent av vertens immunsystem men en immunrespons blir ikke igangsatt.

5

Vertens immunsystem blir ute av stand til å forkaste cellene som ellers ville ha blitt forkastet dersom de ikke var blitt konstruert til å uttrykke LAG-3 molekylet på sin celleoverflate. LAG-3 kan også bli uttrykt på celleoverflaten av en ubeslektet celletype og blandet med cellene eller vevene som skal bli transplantert med tilsvarende resultater som de som er beskrevet over. Denne oppfinnelsen angår således transplantasjon av celler, vev eller organer uten generell immunsuppresjon.

10

Disse cellene, vevene eller organene blir transplantert for å skaffe til veie proteiner eller utføre visse funksjoner for å behandle visse sykdommer. De blir akseptert av verten ved anvendelse av en teknikk der LAG-3 blir presentert til vertens immunsystem.

15

Forhindring av podingsforkastelse av spesifikke celler, vev eller organer kan også bli oppnådd i mottagere ved co-administrering av fibroblaster eller andre primære eller sekundære celler, som har blitt konstruert til å uttrykke LAG-3. Denne beskyttende tilstanden kan skyldes lokal eller generell hemming av mekanismer som formidler immunresponsen. Denne beskyttende tilstanden kan skyldes anergi, delesjon, ikke-responsivitet, toleranse eller forhindring av celle-formidlet cytotoxiskitet. Med en gang den beskyttende tilstanden er etablert, varer den i lengre tidsperioder, til og med permanent på grunn av et fenomen som infeksjons toleranse (Qin et al., 1993).

20

25

Oppfinnelsen kan bli utnyttet for transplantasjon av celler, vev, organer eller vertceller for å levere gener eller genprodukter for en lang rekke human medisinske behov.

LAG-3 gen ekspresjon kan bli induisert med standard rekombinante DNA teknikker eller ved teknikker som benytter homolog rekombinasjon for å aktivere det endogene LAG-3 genet. Celletypene kan bli oppnådd fra transgene dyr som har LAG-3 genet uttrykt i spesifikt vev eller i ubeslektede celler ved en hvilken som helst metode. Slike celler kan

30

deretter bli blandet med celler der beskyttelse mot podingsforkastelse er ønskelig. Dette antyder at lokal sekresjon av det immun-beskyttende molekylet LAG-3 ikke virker systemisk. LAG-3 omformede, ikke-omdannede fibroblaster gir tilsvarende responser in vivo. De immunbeskyttende effektene av innoculum av LAG-3 omformede fibroblaster er doseavhengige, men uavhengige av kilden til LAG-3 molekylet.

Co-administrering av LAG-3 som uttrykker celler som inaktiverer donor T celler mens den samtidig forhindrer angrep fra vertens immun system. Denne behandlingen induserer spesifikk anergi, toleranse eller på annen måte beskyttelse mot celleformidlet cytotoxisitet i mottakeren hvilket kan deretter kan resultere i en langtids endring i immun mikromiljøet som muliggjør beskyttelse mot autoreaktive T celler. Dette kan bli gjort ved co-administrering av et lite antall allogene benmarg celler fra en frisk donor sammen med humane allogene celler som har blitt konstruert til å uttrykke LAG-3. Dette resulterer i en nedgang i autoreaktive T celler gjennom utvikling av mikrokimerisme (Delaney et al., 1996).

Mennesker med spesielle sykdommer eller mangler kan ha fordel av allogene transplantasjoner av mange forskjellige celler, vev eller organer. Organer som for eksempel lever, nyre, hjerte, pankreas, tynntarm blir vanligvis transplantert og celler som isletceller, nervevev for behandling av Parkinsons sykdom eller fokal epilepsi, hematopoetiske stamceller som en behandling for chemoterapi eller strålingsterapi, normale hepatocytter for å behandle hyperkolesterolemi, hjerteceller for myokardialt infarkt, muskelceller for muskulær dystrofi er egnet for transplantasjon.

Allogene benmargstransplantasjoner har vært vanskelig å utføre på grunn av et antall forskjellige årsaker. De innbefatter: podingsforkastelse, infeksjon på grunn av opportunistiske infeksjoner som et resultat av kontaminasjon av podingen eller immunsuppressive medikamenter, eller andre årsaker. Forkastelsen kan skyldes motstand hos resipienten mot benmargspodningen av donorer og tendensen til kompetente immun celler å angripe mottageren, det vil si (Transplantat-versus-vertsykdom, GVHD). GVHD kan kontrolleres ved uttømming av podingen av T celler eller co-administrering

av immunundertrykkende medikamenter. Podingen blir redusert når T cellene elimineres.

Som et resultat av T celle eliminering, er det en høyere forekomst av podingssvikt. Det
5 antas at de kan tilveiebringe en viktig funksjon for poding slik som utarbeiding av
cytokiner (Kernan et al., 1987).

Det har blitt vist at bare et lite antall allogene men friske benmargsceller kan redusere,
eller til og med forhindre forekomst av autoimmune sykdommer i forsøksmodeller.
10 Behandlinger slik som disse resulterer i poding-versus-vert sykdom.

Benmargstransplantasjon har også blitt anvendt som en metode for å fjerne visse
tumorer. Hensikten med dette skyldes evnen de allogene T cellene å gjenkjenne og
drepe tumorvev, for eksempel i poding-versus-leukemi.
15 I alle tilfellene over kan immunsuppresjon bli unngått dersom cellene eller organene
som skal transplanteres blir konstruert med et gen som koder for LAG-3, for å uttrykke
et LAG-3 protein når det er transplantert i en vert og induserer podings beskyttelse.

20 Det første problemet i allogen transplantasjon er mangel på transplanterbart humant vev
og dagens krav om fjernorgan tilgang. Selv om xenotransplantasjon fremdeles blir
betraktet som en eksperimentel prosedyre, blir den vurdert som et levedyktig alternativ
til allotransplantasjon. Dyr som griser og bavianer blir nå betraktet som organ- eller
celledonorer. Beskyttelse mot podingsforkastelse kan være essensielt for vellykket
25 klinisk bruk av organer fra forskjellige arter. Vertsresistens kan bli overvunnet, i det
minste delvis, for eksempel ved anvendelse av antistoffer mot humane CD4, CD8,
NKceller, eller mikroinnkapsling av dyrecellene som skal bli transplantert. Ifølge
foreliggende oppfinnelse kan dyrene bli transgent endret til å uttrykke LAG-3 genet i
visse celletyper som islet celler ved anvendelse av insulin genpromoter og målrettet
30 system eller annet vevsspesifikt markørssystem.

Ekspresjon av LAG-3 på tumorvev antas å spille en viktig rolle i resistens til celleformidlet angrep mot tumorvev fra vertens immunsystem.

5 Ifølge en spesiell utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, ved anvendelse av genterapi eller ex vivo behandling av en liten mengde av tumorvev og reimplantasjon, kan tumorvevet bli konstruert til å uttrykke antisens LAG-3 molekyler eller ribozymerspesifikke for LAG-3 meldingen. Den vil muliggjøre at immunsystemet reagerer til vevet og lære å ødelegge det. En liten mengde tumorvev kan også bli behandlet med et antistoff til LAG-3 for å hindre T celle hemming induisert av LAG-3 og tillate induksjon
10 av cellulær og humoral immunitet mot det.

Genterapi er meget ønskelig ved behandling av et antall forskjellige sykdommer som innbefatter, men er ikke begrenset til adenosin deaminase mangel (ADA), sigdcelleanemi, thalassemi, hemofili, diabetes, alfa-antitripsin mangel, hjerne forstyrrelser som
15 Alzheimers sykdom og andre sykdommer slik som vekstforstyrrelser og hjertesykdommer, for eksempel de som er forårsaket av endringer i måten som kolesterol blir metabolisert, og defekter i immunsystemet.

Forskjellige celler kan bli anvendt for transplantasjon i individer som trenger dette, for
20 eksempel myoblaster for dystrofin levering, celler som skiller ut materiale slik som TPO, GH, EPO, Faktor IX eller andre faktorer, blodceller for behandling av arvelige blodsykdommer og andre primære humane eller animalske celler, slik som endotel celler, epitel celler, bindevevsceller, fibroblaster, mesenchymale celler, mesotele celler og parenchymale celler.

25 Resultatene av genterapi har ikke vært tilfredsstillende på grunn av et antall problemer. Til og med de mest avanserte undersøkelsene der en ung pike har blitt behandlet med genet for adenosin deaminase (ADA), mottar pasienten ukentlige injeksjoner med PEG-ADA da man er redd for at genterapi alene er ineffektivt.

30 En av manglene ved genterapi protokollene i dag er kravet om individuell produksjon av vertsceller for å forsøke å hindre forkastelse av cellen med vertens immunsystem.

Gen terapi må bli gjennomført på individ til individ basis. Videre blir ekspresjon av transgener vanligvis funnet å være transient på grunn av at ekspresjon av andre virale proteiner som vil legge beslag på vertens immunsystem selv gjennom anvendelse av autologe celler for genterapi.

5

Ødelagte adenovirale vektorer blir anvendt men disse har problemer som skyldes at andre virale proteiner som uttrykkes og som fremkaller en immunrespons. Stor konsentrasjon av virus, til og med et ødelagt, stimulerer en inflammatorisk respons og et immunangrep. Vertcellens immunsystem vil huske den virale vektoren slik at fremtidige administreringer til og med vil være mindre effektive.

10

Viralt protein E1 slettet replikasjon defekt adenovirus blir rutinemessig benyttet i genterapiprotokoller. Uheldigvis er de bare forbigående effektive på voksne, immunkompetente verter sannsynligvis som et resultat av en immunrespons rettet mot adenovirus eller rekombinante proteiner (Kozarsky og Wilson, 1993; Barr et al., 1992; Stratford et al., 1992; Rosenfeld et al., 1992; Lemarchand et al., 1992). Det er derfor et stort behov for å utvikle nye vektorer som er ikke så immunogene eller metoder som tillater immunologisk beskyttelse av genetisk konstruerte celler.

15

Disse vektorene blir fremstilt ved høy titer opp til 10^{11} plakk dannende enheter per ml og infiserer mange replikerende og ikke-replikerende celler. Anvendelse av replikasjonsdefekt adenovirus for å levere fysiologiske nivåer av rekombinant protein til systemisk sirkulasjon. LAG-3 genet er fortrinnsvis under transkripsjonell kontroll av allestedsnærværende aktiv cellulær EF1 α promoter og 4F2HC forøker (Tripathy et al., 1994).

25

Forsøk har vært gjort for å unngå dette problem ved innkapsling av cellene ved immunundertrykking av verten.

Med de fremgangsmåtene som her er beskrevet, kan xenogene eller alloge celler bli anvendt som genterapi verter som uttrykker et LAG-3 molekyl på sin overflate for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av vertens immunsystem. De er for

30

eksempel myoblaster, fibroblaster, hematopoietiske stamceller, embryoniske stamceller, føtale leverceller, umbilikale vene endotel celler, eller CHO celler. Genterapi vertscellene kan også bli konstruert til å uttrykke herpes simplex tymidin kinase genet. Slike celler kan bli spesifikt ødelagt ved tilsetning av gancyclovir.

5

tk-gancyclovir sensitive celler har en signifikant fordel i forhold til ikke-sensitive celler, ved at de kan bli utelatt ved et hvilket som helst tidspunkt (Bi et al., 1993).

10

Den universelle vertscellen som blir fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse for å uttrykke LAG-3 og Hsv-tk genet på sin overflate tillater således generering av en universell genterapi vertcelle som kan bli implantert uten immunsuppresjon og kan bli ødelagt ved et hvilket som helst tidspunkt dersom det ikke lenger skulle være behov for dens aktivitet.

15

De allogene og xenogene genterapi vertcellene fra foreliggende oppfinnelse kan bli konstruert til å uttrykke et transgen og/eller LAG-3 genet ved anvendelse av en hvilken som helst metode for genoverføring, slik som, men ikke begrenset til replikasjonsdefekte virus, adenoassosiert virus, høy effektive retrovirus, direkte injeksjon av DNA inn i benmarg, elektroporering, kalsiumfosfat transfeksjon, mikroinjeksjon, innkapsling i liposomer eller erytrocytt ghosts. Celler som uttrykker LAG-3, slik som myoblaster eller CHO celler kan bli co-administrert med celler som uttrykker et interessant protein som skal bli permanent podet. Dersom transient LAG-3 eksponering er tilstrekkelig, kan LAG-3 transfekterte myoblaster eller CHO celler inneholde et suicid gen, slik som tk som angitt over, slik at de kan bli fjernet ved behandling med gancyclovir.

25

30

Denne fremgangsmåten kan bli anvendt for å gjenopprette normal funksjon ved administrering av et gen eller genprodukt eller fjerning eller inaktivering av et gen som er farlig for legemet (slik som et oncogen). Målet kan også nås ved implantering av celler som leverer ribozymmer eller antisens cDNA for å hemme produksjon av uventet protein slik som HIV proteiner eller vekstfaktorer. Fremgangsmåten kan bli anvendt til å korrigere enzym mangler slik som Gauchers sykdom eller ADA mangel.

- Ekspresjonssystemet i oppfinnelsen tillater for eksempel injeksjon av en naken DNA eller av en viral vektor direkte inn i en cellegruppe som muskelceller eller administrert direkte i luftveiene (for eksempel ved behandling av cystisk fibrose). Konstruksjonen inneholder ikke bare det interessante genet (slik som ledningsregulator CFTR cDNA)
- 5 men også LAG-3 genet som skal bli co-uttrykt på celletypen for å hindre mulige humorale immunresponser til f. eks. adenovirus kapsel proteiner som vil begrense effekten av gjentatte administreringer. Genoverføring inn i hematopoetiske stamceller kan bli anvendt for administrering av multi-medikament resistens gener til å bekjempe en av sideeffektene ved kjemoterapi-undertrykking av hurtig delende immun celler.
- 10 Retrovirale vektorer kan bli anvendt i kombinasjon med cytokiner slik som Steel faktor, kit ligand, IL3, GM-CSF, IL6, G-CSF, LIF, IL12 for å oppmuntre stamcellene til deling.

- De valgte cellene kan bli co-transfektet med gener som koder for andre
- 15 immunsuppressive midler som IL10, TGF β , Fas ligand, i tillegg til LAG-3 genet.

Oppfinnelsen vil som illustrasjon nå bli beskrevet med referanse til følgende eksempler:

EKSEMPEL 1

20 Metoder

Generering av CHO celler som uttrykker transmembran LAG-3

- LAG-3 cDNA ble tatt ut som et 1620 bp Xho fragment fra pCDM8 plasmid (Invitrogen San Diego CA) og renset ved agarose gel elektroforese.
- 25 Fragmentet ble subklonet inn i pCLH 3AXSV2DHFRh α IVSA (D α) pattedyr ekspresjonsvektor (Fig.3) spaltet med Xho. CHO-DUKX (DHFR⁻) celler ble transfektet med D α LAG-3 konstruksjon med CaPO₄ utfellingsmetoden. Transfektete celler ble dyrket i seleksjonsmedium (MEM medium uten deoksy- og ribonukleotider +
- 30 10 % dialysert føtalt bovint serum + 1% L-glutamin + 0,02 μ M metotreksat). Ekspresjon av LAG-3 ble undersøkt med western blotting på lyserte cellemembran

preparater og periodisk ved strøm cytometri analyse ved anvendelse av anti-LAG-3 monoklonalt antistoff 17B4.

Transplantasjon av CHO celler inn i mus.

5

Kinesiske hamster ovarieceller (CHO), enten utransfekterte (vill type) eller transfektert med full lengde human LAG-3 eller human LH cDNA, ble  sgjort fra plastflasker og suspendert i Dulbeccos modifikasjon av minimum essensielt medium (DMEM) ved en konsentrasjon på 1,75 x 10⁷ celler/ml. Tjuseks C57BL/6 hunlige mus ved alder 7-9

10

uker ble fordelt i 7 grupper som angitt i Tabell 1 og 200 av den angitte cellesuspensjonen, inneholdende 3.5 x 10⁶ celler, ble injisert subkutan i høyre side på hvert dyr. I grupper 3, 6 og 7 mottok samme mus LAG-3-transfekterte celler i høyre side og kontrollceller (LH-transfektert eller utransfektert) i den andre. Fire dager etter injeksjonen ble musene tatt livet av med CO₂ inhalering og huden ble åpnet for å

15

undersøke injeksjonsstedet.

Tabell 1 – Eksperimentelle grupper

Gruppe	Antall mus	Identifikasjon av mus	CHO celler injisert i høyre side	CHO celler injisert i venstre side
1	5	1 til 5	vill type	-
2	5	6 til 10	LAG-3	-
3	5	11 til 15	LAG-3	vill type
4	2	16 og 17	LH	-
5	5	18 til 22	LAG-3	-
6	2	23 og 24	LAG-3	vill type
7	2	25 og 26	LAG-3	LH

Evaluerings av cytotoxiskitet mot CHO celler

- Fem C57BL/6 hunnlig mus per gruppe ble injisert s.c. med 4×10^5 CHO celler transfektert enten med human LH eller LAG-3 cDNA. Etter 14 dager ble musene tatt
- 5 livet av og milten ble fjernet for å oppnå splenocyt suspensjoner. Splenocyt suspensjoner (effektorer) ble fortynnet i dyrkningsmedium (RPMI 1640 + 10 % føtalt bovin serum + antibiotika) ved 10^7 celler/ml og pletert i tre paralleller ved forskjellige fortynninger for å oppnå forskjellige effektor til mål forhold; 2 plater ble preparert for hver suspensjon. Målceller ved 5×10^3 celler/100µl (enten LH- eller LAG-3-
- 10 transfekterte celler), merket med ^{51}Cr , ble tilsatt platene (en plate for hvert mål). Etter 20 timer ved 37°C, ble 20 µl av supernatant tatt fra hver brønn og frigjøring av ^{51}Cr ble evaluert ved væske scintillasjon. Cytotoksisk aktivitet ble beregnet som prosentdel av lysing i henhold til følgende formel:

$$15 \quad \% = \frac{(\text{CPM}_{\text{prøve}} - \text{CPM}_{\text{spont}})}{(\text{CPM}_{\text{max}} - \text{CPM}_{\text{spont}})} \times 100$$

- der spont og max indikerer henholdsvis brønner med dyrkningsmedium (spontan Cr frigjøring fra målceller) og Triton X 1% (maksimum Cr frigjøring) ved erstatning av
- 20 effektor suspensjonen.

Resultater

Transplantasjon av CHO celler inn i mus

- 25 De fleste mus som mottok LAG-3 viste en hvit modul på injeksjonsstedet hvilken ikke kom til syne i dyrene behandlet med villtype CHO eller i de som mottok LH-transfekteerte CHO-celler. Injeksjon av villtype CHO celler sørget for tilsynkomst av en diffus blødning i injeksjonsstedet på musene. Dette fenomenet var mindre tydelig hos dyrene som mottok LH-transfekteerte celler. I musene injisert med både vill type og
- 30 LAG-3 transfekteerte CHO celler på forskjellige steder var denne nodulen tilsynelatende bare synlig på injeksjonsstedet med sistnevnte mens en blødning fremkom i det andre stedet (Tabell 2).

Histologiske analyser som tidligere var gjennomført i et tilsvarende forsøk viste tilstedeværelse av heterologe celler i nodulene. Resultatene av forsøket er vist i vedlagte figurer (se Tabell 1 for identifikasjon av mus) og oppsummert i Tabell 3.

5

Tabell 2

Injiserte celler	Antall mus	Frekvens (antall positive funn/totalt antall sider injisert):	
		blødning	nodul
LAG-3	10	1/10	9/10
vill type	5	3/5	0/5
LH	2	1/2	1/2
LAG-3 + vill type*	7	0/7(a) 5/7(c)	7/7(a) 1/7(c)
LAG-3 + LH*	2	0/2(b) 1/2(a)	0/2 (b) 2/2(a)

* Hver celletype alene ble injisert i en side

10(a) = LAG-3 side

(b) = LH side

(c) = WT side

Tabell 3

15

Injiserte celler	Frekvens (antall positive funn/totalt antall sider injisert):	
	Blødning	Nodul
CHO villtype	8/12 (67 %)	0/12 (0 %)
CHO LH	1/4(25 %)	1/4 (25 %)
CHO LAG-3	2/19(11 %)	16/19 (84 %)

Cytotoksitet mot CHO celler

Ekspresjon av LAG-3 på overflaten av CHO celler påvirket ikke musenes evne til å bli immunologisk primet mot xenogene celler. Faktum er at splenocytter fra mus injisert med LAG-3-CHO celler lyserte målceller like effektivt som de fra mus primet med LH-CHO celler og bedre enn ikke-primete mus. Ekspresjon av LAG-3 på celleoverflaten var imidlertid forbundet med en redusert sensitivitet til den cytotoksiske aktiviteten induisert ved immunisering av mus versus målet slik man kan se ved å sammenlikne prosentverdiene av lysering i Fig.1 og Fig. 2. "Naturlig" cytotoksitet som blir utøvd av splenocytene fra ikke-primete mus, blir ikke redusert ved overflate ekspresjon av LAG-3. Dette viser at LAG-3 overflate ekspresjon reduserer bortførelse forgrening av Cytotoksisk T lymfocytt (CTRL) aktivitet. CTRL er en av effektorene som spiller en hovedrolle i forkastelse av transplanterte organer (G. Berke, 1993) og således kan hemming av deres funksjon forlenge overlevelse av allografter.

15

20

25

30

REFERANSER

1. Triebel et al., J. Exp. Med., 171: 1393, 1990
- 5 2. Baixeras et al., J. Exp. Med., 176: 327, 1992
3. Huard et al., Immunogenetics, 39: 213, 1994A
- 10 4. Huard et al., Eur. J. Immunol., 24: 3216, 1994B
5. Huard et al., Eur. J. Immunol., 26: 1180-1186, 1996
6. Miyazaki, et al., Science, 272: 405-408, 1996
- 15 7. Susuki et al., J. Exp. Med., 182: 477-486, 1995
8. Bellgrau et al., Nature, 377: 630-632, 1995
- 20 9. Lau et al., Science, 273: 109-112, 1996
10. Subramani et al., Mol. Cell. Biol., 1: 854-864, 1981
11. Luski and Botchan, Nature 293: 79-81, 1981
- 25 12. Fiddes and Goodman, J. Mol. Appl. Genetic 1: 3-18, 1981
13. Hamer and Walling, J. Mol. Appl. Genetic 1: 273-288, 1982
- 30 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
- 35 17. Kozarsky and Wilson, Current Opinion Genet. Dev., 3: 499, 1993

18. Barr et al., Gene Therapy, 1: 51, 1992
19. Stratford et al., J. Clin. Inves., 90: 626, 1992
- 5 20. Rosenfeld et al., Cell 68: 143
21. Lemarchand et al., PNAS, 89: 6482, 1992
22. Tripathy et al., PNAS, 91: 11557, 1994
- 10 23. Bi et al., Human Gene Therapy 4: 725, 1993
24. Berke, The functions and mechanisms of action of cytolytic lymphocytes.
Kapittel 28, side 972-974 i: Fundamental Immunology forfattet av W. E. Paul,
15 New York, 1993.

P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av en genetisk konstruert celle, omfattende DNA som er stabilt integrert i cellen og koder for et transmembran LAG-3 protein på sin overflate, i fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en verts immunsystem.

2.

Anvendelse i følge krav 1, der DNA som koder for et LAG-3 protein er eksogent.

3.

Anvendelse i følge krav 1, der DNA som koder for et LAG-3 protein er endogent og dets ekspresjon blir aktivert eller modifisert ved målrettet innsetting av en regulator sekvens og/eller et amplifiserbart gen ved homolog rekombinasjon.

4.

Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, der cellen er en del av et vev eller organ som skal bli transplantert.

5.

Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, der cellen er en genterapi vertcelle.

6.

Anvendelse i følge krav 5, der genterapien er somatisk eller "ex vivo" genterapi.

7.

Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, der cellen videre omfatter et ytterligere immunsuppressivt middel, slik som IL-10, TGF β eller Fas Ligand.

8.

Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, der cellen videre omfatter tymidin kinase (tk) genet for å bli sensitiv til tk-gancyclovir suicid systemet.

9.

- 5 Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, der cellen er oppnådd fra transgene dyr.

10.

- 10 Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, idet cellen blir valgt fra myoblaster, fibroblaster, hematopoietiske stamceller, føtale leverceller, umbilikale vene endotel celler eller CHO celler.

11.

- 15 Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 5 til 10, idet cellen videre omfatter eksogent DNA som koder for et terapeutisk middel av interesse.

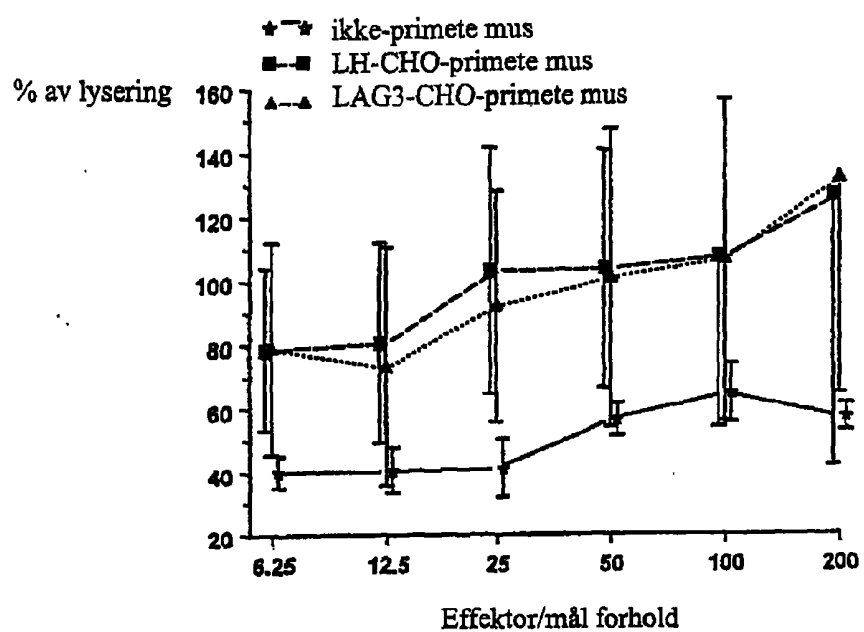
12.

- 20 Anvendelse i følge et hvilket som helst av kravene 5 til 10, idet cellen videre omfatter eksogent DNA som koder for en regulator sekvens og eller et amplifiserbart gen for aktivering eller modifisering av ekspresjonen av et endogent gen av interesse.

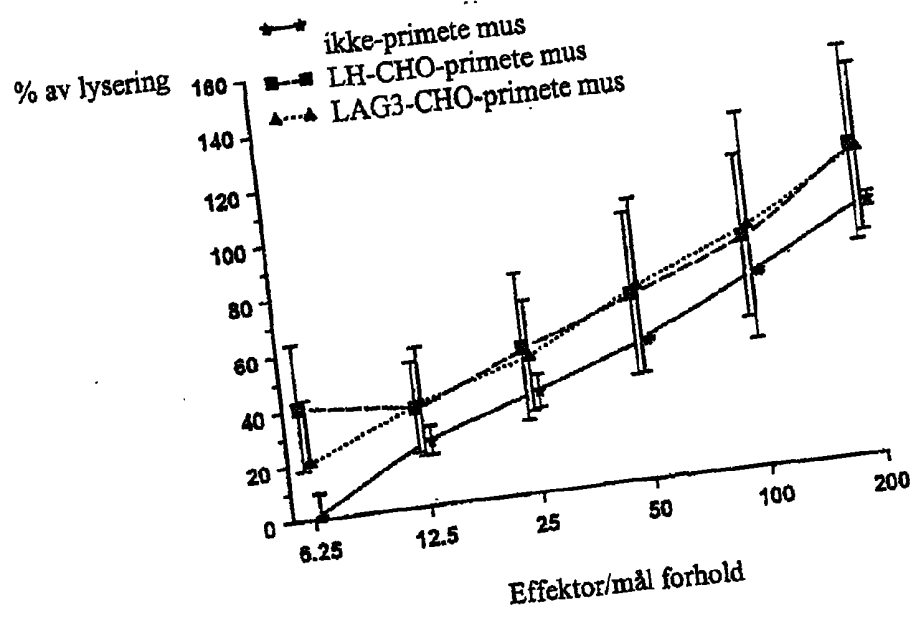
13.

- 25 Anvendelse av et transmembran LAG-3 protein uttrykt på overflaten av en celle, hvilket protein er kodet av DNA som er stabilt integrert i cellen, i fremstilling av et medikament for å indusere beskyttelse mot podingsforkastelse av en verts immunsystem.

FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3

