



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102018000007601
Data Deposito	30/07/2018
Data Pubblicazione	30/01/2020

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	5	0775

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	30

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	14	705

Titolo

METODO PER LA PRODUZIONE DI CELLULE BI-FUNZIONALI PER IL TRATTAMENTO DI TUMORI

D E S C R I Z I O N E

Campo di applicazione.

La presente invenzione riguarda un metodo per la produzione di AD-PC bi-funzionali, co-esprimenti la proteina TRAIL ed
5 il recettore GD2 tCAR, così da ri-direzionare gli AD-PC che rilasciano la proteina anti-tumorale TRAIL contro tumori esprimenti l'antigene GD2.

Stato della Tecnica.

Le cellule progenitrici dell'adulto, inclusa una popolazione
10 cellulare con fenotipo riconducibile a periciti umani (di seguito in breve PC), sono in fase di studio come veicoli cellulari per il rilascio di molecole anti-tumorali.

I PC possono essere ottenuti da diverse fonti e posseggono un innato tropismo per i tumori, come presunti precursori
15 delle cellule stromali tumorali.

I PC possono essere isolati facilmente ed ingegnerizzati (ossia modificati geneticamente) con l'utilizzo di vettori virali.

Il targeting diretto dei tumori primari e delle rispettive
20 metastasi con PC ingegnerizzati per produrre molecole anti-tumorali, rappresenta attualmente una promettente strategia su base cellulare, in particolare per composti dotati di una emivita ridotta o di una scarsa biodisponibilità nei siti bersaglio.



I PC hanno i potenziali vantaggi di offrire un prolungato e concentrato rilascio di molecole terapeutiche, riducendo il targeting non selettivo, rappresentando, pertanto, un approccio incoraggiante per migliorare l'efficacia dei
5 trattamenti terapeutici standard.

La capacità dei PC di fare "homing", ossia di localizzarsi in corrispondenza del sito tumorale, è stata dimostrata per diversi tipi di cancro, inclusi glioma, tumore al seno, sarcoma, tumore al colon, tumore ovarico, carcinomi al
10 pancreas e carcinomi al polmone.

È noto che l'agente pro-apoptotico Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (di seguito in breve TRAIL), può essere rilasciato efficacemente dai PC nei siti tumorali, agendo sui recettori funzionali agonisti di TRAIL
15 (specificamente DR4 e DR5), che sono largamente e preferibilmente espressi sulle cellule tumorali.

Dal brevetto Europeo EP2424979 è noto un metodo per la produzione di medicinali per il trattamento dei tumori che comprende preparare un vettore retrovirale che codifica una
20 molecola TRAIL solubile (sTRAIL) e che infetta stabilmente periciti adiposi (AD-PC).

I PC che producono TRAIL hanno dimostrato un'attività citotossica in vitro e in vivo nei confronti di alcuni tumori e sono quindi particolarmente interessanti nel contesto di
25 trattamenti oncologici.

Tuttavia, questo stato della tecnica è affetto da alcuni problemi.

Un primo problema è che, nonostante il tropismo dei PC per il microambiente tumorale, è stato dimostrato che il numero
5 dei PC nel tumore diminuisce nel tempo e, per la terapia completa, potrebbero essere richieste diverse somministrazioni di queste cellule.

Pertanto, è posta una particolare attenzione sui metodi per aumentare l'affinità dei PC per i siti bersaglio, in modo da
10 ottenere una migliore ritenzione nei siti tumorali ed un prolungato effetto terapeutico in questi ultimi.

La maggior parte del lavoro preliminare per gli approcci di targeting basati sulla affinità di legame, è stato consolidato in campo di terapia genica nella immunoterapia
15 adottiva.

La massima affinità è stata ottenuta usando molecole immunitarie, come ad esempio anticorpi, il recettore dei linfociti T (TCR), od il loro derivati, come i recettori chimerici per l'antigene (di seguito in breve CAR).

20 Questo tipo di targeting trae vantaggio dalla presenza di molecole di superficie unicamente o altamente espresse dalle cellule tumorali.

Un ulteriore problema è che, l'utilizzo di cellule-veicolo, spesso esplica una funzione protettiva sulla molecola
25 terapeutica veicolata, ma non ne migliora necessariamente la

specificità di rilascio che è critica per limitare la tossicità off-target (ossia i cosiddetti effetti collaterali).

Per la soluzione di questo problema si è constatato che il
5 rilascio basato su affinità per mezzo di cellule veicolo ingegnerizzate, aumenta la concentrazione dell'agente in loco e, indirettamente, ne riduce il sequestro, la diluizione o la inattivazione in tessuti non bersaglio, migliorandone così ulteriormente l'efficacia.

10 Nel complesso, l'azione di veicolare un agente terapeutico, riduce fortemente la dose totale richiesta per il trattamento terapeutico e ne limita la tossicità.

Poiché i PC possiedono un intrinseco "homing" verso il tumore, le strategie di targeting basate sull'affinità
15 possono migliorare ulteriormente il rilascio terapeutico da parte dei PC.

In dettaglio, molte neoplasie di origine neuroectodermica, inclusi il glioblastoma (GBM), il microcitoma polmonare, il melanoma, il neuroblastoma ed i sarcomi ossei e dei tessuti
20 molli, ad esempio il sarcoma di Ewing (ES), esprimono comunemente alti livelli del disialoganglioside GD2. Inoltre, alcune varianti di tumore mammario sono risultate positive per il disialoganglioside.



Il GD2 è una molecola di superficie con un'espressione ristretta nei tessuti normali, rappresentando quindi un putativo bersaglio per nuovi approcci terapeutici.

Di recente, sono stati sviluppati due differenti approcci di targeting del GD2, cioè con anticorpi monoclonali diretti
5 contro il GD2 e con l'immunoterapia con linfociti T-CAR.

Il dominio di affinità del CAR, rappresentato dal frammento variabile a singola catena (scFv) derivante dall'immunoglobulina diretta verso il marcatore tumorale di
10 interesse, re-indirizza la funzione citotossica delle cellule immunitarie verso il bersaglio specifico, aumentandone quindi la localizzazione nel sito tumorale.

Il targeting cellulare basato sulla affinità è stato recentemente applicato anche ai PC.

15 Il targeting tumore-specifico e la ritenzione nel sito tumorale sono stati ottenuti, secondo letteratura, tramite modificazione genetica dei PC con recettori artificiali diretti contro erbB2 nel cancro ovarico e contro EGFRvIII nel GBM.

20 Se da un lato il meccanismo di interazione tra TRAIL, rilasciato dai PC, ed i suoi recettori è noto, non è noto invece il modo in cui i PC possano selettivamente localizzarsi e fare targeting del tumore.



L'invenzione si focalizza sull'ottimizzazione della capacità di localizzazione e targeting dei PC produttori TRAIL (PC TRAIL) nei siti tumorali.

Pertanto, per massimizzare il profilo terapeutico dei PC TRAIL e minimizzare gli effetti collaterali, è stata
5 sviluppata una nuova strategia in cui TRAIL è rilasciato da PC bi-funzionali, che sono stati contemporaneamente ingegnerizzati con TRAIL e con una forma troncata, ovvero mancante della porzione intracellulare di trasduzione del
10 segnale, di un CAR anti GD2 (GD2 tCAR).

Tramite questo targeting immunoselettivo, si è mirato a indirizzare questi PC bi-funzionali specificamente contro i tumori GD2 positivi.

Il recettore GD2 tCAR così come TRAIL sono stati espressi
15 nei PC mediante infezione con vettori virali.

I PC bi-funzionali esprimono alti livelli sia di TRAIL sia del GD2 tCAR preservando una robusta attività anti-tumorale contro linee cellulari sia di GBM che di ES.

È rilevante notare che l'azione anti-tumorale è stata così
20 ulteriormente rinforzata nei PC bi-funzionali, dove la presenza del GD2 tCAR migliora la capacità di instaurare interazioni cellula-a-cellula permettendo quindi un targeting ottimale dei tumori esprimenti il GD2.

Nonostante l'espressione del GD2 tCAR non agisca sull'homing
25 dei PC, si è ipotizzato che rinforzare il legame dei PC con

le cellule tumorali possa incrementare la ritenzione dei PC nel sito tumorale, che a sua volta influenza sia la specificità che l'efficacia dell'approccio di terapia cellulare.

5 Secondo l'invenzione, l'innato tropismo dei PC per i tumori accoppiato al targeting specifico mediato dall'antigene GD2 potrebbe essere vantaggioso in generale per migliorare il rilascio terapeutico della molecola TRAIL per il trattamento dei tumori maligni GD2 positivi.

10 Scopi dell'invenzione.

Uno scopo della presente invenzione è quello di migliorare lo stato della tecnica.

Uno altro scopo dell'invenzione è di fornire un metodo per ingegnerizzare PC umani isolati da tessuto adiposo (AD-PC) contemporaneamente sia con TRAIL sia con il recettore GD2 tCAR di legame al GD2, come nuovo potente strumento per reindirizzare i PC produttori l'agente pro-apoptotico TRAIL contro i tumori esprimenti l'antigene GD2, ad esempio contro GBM ed ES. La natura invasiva di questi tumori è la principale causa del fallimento della resezione chirurgica e degli approcci terapeutici standard.

Un altro scopo dell'invenzione è di fornire un metodo per la produzione di PC ingegnerizzati con uno spiccato tropismo per il tumore quale possibile alternativa terapeutica, dove queste cellule servono da veicolo per sostanze anti-tumorali



con lo scopo di modificare geneticamente elementi del microambiente tumorale, al fine di distruggere il tumore dall'interno, il cosiddetto effetto "cavallo di Troia".

È stato infatti riscontrato come i PC persistano all'interno
5 dello stroma tumorale, sistemandosi in prossimità delle cellule tumorali e dei nuovi vasi.

Gli studi attuali sono diretti verso l'ottimizzazione sia della specificità che della efficacia della terapia cellulare basata su PC al fine di prolungare la ritenzione
10 dei PC nel tumore e in parallelo bersagliare una specifica popolazione cellulare.

Secondo un aspetto, l'invenzione fornisce un metodo per la produzione di PC bi-funzionali, ingegnerizzati contemporaneamente con entrambi TRAIL e GD2 tCAR, in grado
15 di mantenere la capacità citotossica TRAIL-mediata (ossia legata al rilascio di TRAIL da parte dei PC), acquisendo al contempo una significativa specificità di legame alle cellule tumorali GD2-positive.

A conferma dello scopo raggiunto, i dati in vitro hanno
20 dimostrato che l'espressione simultanea del ligando pro-apoptotico TRAIL e della proteina GD2 tCAR non influisce sulla mortalità prodotta sul tumore dai PC ingegnerizzati.

In parallelo al potenziale citotossico, sono state analizzate le nuove proprietà acquisite dai PC
25 ingegnerizzate con il GD2 tCAR ed in particolare la capacità



di legare le cellule tumorali esprimenti GD2, in un saggio di interazione cellula-a-cellula.

Il numero di interazioni tra i PC e le cellule tumorali è risultato proporzionale sia alla densità del GD2 sulla
5 superficie delle cellule tumorali sia alla presenza del GD2 tCAR sui PC.

Si deve notare che i PC ingegnerizzati con il recettore GD2 tCAR hanno dimostrato di legare in modo più efficiente e specifico le cellule tumorali esprimenti il GD2.

10 Il saggio di interazione cellula-a-cellula, ha ulteriormente dimostrato come l'aumentata capacità di legame dei PC bi-funzionali si traduca in una più efficace capacità citotossica contro le cellule di GBM positive per il GD2, a confronto con i PC che esprimono solamente TRAIL.

15 Questi dati suggeriscono che l'espressione del GD2 tCAR nei PC bi-funzionali consente un targeting specifico delle cellule tumorali esprimenti il GD2, potenziando allo stesso tempo l'effetto citotossico anti-tumorale.

Secondo un ulteriore scopo dell'invenzione, è stata fornita
20 una prima dimostrazione di una modificazione genetica di PC contemporaneamente sia con TRAIL, sia con un recettore chimerico contro un antigene espresso sulla superficie delle cellule tumorali.

In dettaglio, i PC bi-funzionali comprendono un nucleo, un
25 citoplasma, una modifica stabile che comprende



contemporaneamente una molecola TRAIL ed una molecola GD2 tCAR codificate da almeno un vettore virale ed in cui detti vettori virali comprendono retrovirus, ed in particolare lentivirus.

5 Questi ed altri scopi sono raggiunti da un metodo per la produzione di cellule bi-funzionali, esprimenti sia una molecola ad attività anti-tumorale sia una frazione di un anticorpo monoclonale diretto contro un antigene tumorale, secondo le caratteristiche della rivendicazione 1.

10 Ulteriori caratteristiche sono indicate nelle rivendicazioni dipendenti.

Breve descrizione dei disegni.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno maggiormente evidenti dalla descrizione di una
15 forma di realizzazione di un metodo per la produzione di PC bi-funzionali esprimenti sia TRAIL sia GD2 tCAR indicato di seguito a titolo di esempio non limitativo ed in cui:

Figura 1 è una immagine che illustra gli approcci basati su PC bi-funzionali.

20 La Figura 1a, è la uccisione mirata con PC bi-funzionali (indicati con 1) co-esprimenti il GD2 tCAR (2) ed una variante solubile trimerica di TRAIL (sTRAIL; 3), chiamate pertanto PC sTRAIL bi-funzionali (1).

Nella Figura 1a, si nota che sTRAIL (3) rilasciato dai PC
25 sTRAIL bi-funzionali (1), esercita il suo effetto

citotossico senza il bisogno di un contatto diretto dei PC con cellule tumorali (4), legandosi ad un corrispettivo recettore (5) sulla cellula tumorale ed attivando la morte cellulare mediante apoptosi (indicata con una cellula
5 tumorale apoptotica, 6).

Rappresentando la malattia metastatica una grande sfida in pazienti affetti da cancro, la tecnologia basata su PC sTRAIL bi-funzionali è introdotta con l'obiettivo di migliorare le interazioni cellula-a-cellula con il tumore e raggiungere
10 siti metastatici distanti tramite il rilascio di sTRAIL.

Secondo l'invenzione, il potenziale citotossico dei PC sTRAIL bi-funzionali combinato con il targeting mediato dal GD2 tCAR, può rappresentare un nuovo approccio efficace per il trattamento del cancro anche dopo la disseminazione
15 metastatica.

La Figura 1b, mostra la uccisione mirata con PC bi-funzionali (1') esprimenti il GD2 tCAR (2) insieme ad una forma di TRAIL legata alla membrana (mTRAIL; indicato con 3'), chiamati di seguito PC mTRAIL bi-funzionali (1').

20 Con questa strategia, la cellula tumorale (4) viene mandata in apoptosi (indicata con la cellula tumorale apoptotica, 6) tramite contatto diretto cellula-a-cellula e conseguente legame tra mTRAIL (3') sui PC ed il corrispettivo recettore (5) sulla cellula tumorale.



Come si vede nelle Figure 1a e 1b, la funzionalizzazione (ovvero l'introduzione di un elemento che conferisce una funzione) della superficie dei PC bifunzionali (1 e 1') con il GD2 tCAR (2), incrementa la capacità di interazione dei PC con le cellule tumorali (4) esprimenti un antigene GD2 (7), permettendo il riconoscimento di un selettivo target cellulare, con lo scopo ultimo di aumentare la ritenzione dei PC all'interno del sito tumorale, che a sua volta influisce sia sulla specificità che sull'efficacia della somministrazione cellula-mediata di TRAIL.

La Figura 2a è la rappresentazione schematica del costrutto esprimente il GD2 tCAR, in cui l'anti-GD2 scFv derivato da una immunoglobulina M (IgM) è stato fuso con il dominio cerniera trans-membrana del CD8- α umano.

Nella Figura 2b, è rappresentato il costrutto esprimente sTRAIL che contiene un segnale di secrezione (SS) derivante da una immunoglobulina collegato ad un sito di clivaggio della furina (FCV) e ad una cerniera di isoleucine (IL-Z) (che permette la formazione di una struttura trimerica) che è coniugata con il dominio di legame recettoriale di TRAIL (aminoacidi 114-281).

Nella Figura 2c, si nota che il costrutto di espressione di mTRAIL trasporta il gene umano di TRAIL per intero.



Tutti i costrutti di espressione descritti sopra sono inseriti tra gli elementi regolatori lentivirali PGK e WPRE del vettore pCCL PGK WPRE.

Le Figure da 3a a 3f mostrano l'espressione delle varianti di TRAIL (nel dettaglio mTRAIL e sTRAIL), sia come proteina presente a livello della membrana cellulare sia a livello intracellulare (nel citoplasma) e della molecola GD2 tCAR sulla superficie cellulare verificata tramite analisi al FACS (sigla dell'inglese Fluorescent-Activated Cell Sorter) dei PC ingegnerizzati.

La co-espressione nei PC del GD2 tCAR insieme a mTRAIL o sTRAIL per produrre rispettivamente i PC mTRAIL bi-funzionali ed i PC sTRAIL bi-funzionali (nelle Figure seguenti indicati come Bi-Funct) è stata ottenuta tramite infezione con almeno un vettore retrovirale, in particolare lentivirale, benché il metodo di ingegnerizzazione ottimale da noi applicato preveda l'utilizzo di vettori retrovirali (in particolare lentivirali) distinti, rappresentati in Figura 2.

Negli istogrammi specificati di seguito, la curva grigio scura indica l'espressione di TRAIL o del GD2 tCAR nei PC valutata mediante marcatura con gli specifici anticorpi mentre la linea in grigio chiaro rappresenta il controllo prodotto tramite marcatura con un anticorpo di identica classe isotipica ma non diretto contro TRAIL o GD2 tCAR.

Nello specifico, la presenza di TRAIL è stata valutata con un anticorpo murino coniugato al fluorocromo PE diretto contro TRAIL umano (prodotto da BioLegend, San Diego, California, US).

5 La marcatura intracellulare è stata effettuata tramite kit Cytofix/Cytoperm kit (BD, Franklin Lakes, New Jersey, US). Per rilevare il GD2 tCAR, i PC sono stati incubati con sieri di topo anti-idiotipo contenenti anticorpi in grado di riconoscere il GD2 tCAR e successivamente con anticorpo
10 secondario coniugato al fluorocromo APC prodotto in capra e diretto contro gli anticorpi murini (BD).

La Figura 3a, mostra l'analisi dei PC infettati con il vettore vuoto (EV), dove l'espressione di TRAIL e del GD2 tCAR è assente.

15 Nella Figura 3b, si nota l'analisi dei PC GD2 tCAR infettati con il vettore codificante (che significa che porta l'informazione genetica per produrre una proteina) il GD2 tCAR che risulta espresso nel 79±7% della popolazione cellulare.

20 Nella Figura 3c, si osserva l'analisi dei PC sTRAIL infettati con un vettore codificante per sTRAIL dove la presenza di TRAIL è stata confermata nel 99,3% dei PC sTRAIL (28,3% sulla membrana cellulare e 71% nel citoplasma).

Nella Figura 3d, è riportata l'analisi dei PC sTRAIL bi-
25 funzionali (in Figura sTRAIL Bi-Funct) produttori sia il GD2

tCAR che sTRAIL, dove è di interesse osservare come il 74.2% dei PC sTRAIL bi-funzionali esprimano TRAIL (18,3% sulla membrana cellulare e 55,9% nel citoplasma) associato ad un 85% di espressione del GD2 tCAR.

5 In Figura 3e, l'analisi dei PC mTRAIL infettati con il vettore codificante per mTRAIL mostra che TRAIL è prodotto dal 95±8% dei PC mTRAIL (55±7% sulla membrana cellulare e 40±1% nel citoplasma)

Nella Figura 3f, sono analizzati i PC mTRAIL bi-funzionali
10 (in Figura mTRAIL Bi-Funct) che producono sia il GD2 tCAR che mTRAIL.

In particolare, TRAIL è stato rilevato nel 71±4% dei PC mTRAIL bi-funzionali (49±7% sulla membrana cellulare e 22±3% nel citoplasma) e 65±17% di questi PC mTRAIL bi-funzionali
15 sono anche positivi per il GD2 tCAR.

La Figura 4 è un grafico che mostra l'analisi del rilascio di sTRAIL da parte dei PC ingegnerizzati mediante valutazione ELISA, acronimo derivato dall'espressione inglese Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

20 I PC sTRAIL bi-funzionali sono stati ottenuti infettando nuovamente i PC sTRAIL con un vettore retrovirale, in particolare lentivirale, codificante il GD2 tCAR.

Il rilascio di sTRAIL da parte dei PC sTRAIL bi-funzionali è stato confermato con un test ELISA ottenendo una media di
25 253,5±10 pg/ml di sTRAIL.



I PC EV ed i PC GD2 tCAR (questi ultimi non presenti nel grafico) non rilasciano spontaneamente TRAIL.

Queste evidenze dimostrano che alti livelli di GD2 tCAR espressi dai PC sTRAIL bi-funzionali non influiscono in modo
5 rilevante sulla produzione di sTRAIL, avvalorando la fattibilità dell'approccio di targeting bi-funzionale, secondo l'invenzione.

La Figura 5 mostra l'analisi dell'espressione del GD2 valutata mediante FACS.

10 Le cellule sono state prima selezionate secondo i parametri morfologici di FSC e SSC (area di sinistra) facendo un riquadro sulla popolazione cellulare di interesse ed escludendo i detriti, poi è stata valutata l'espressione del GD2 (area di destra, curva grigio scura) tramite marcatura
15 con l'anticorpo primario murino diretto contro il GD2 umano (BD) e successiva incubazione con l'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo APC prodotto in capra e diretto contro gli anticorpi di topo (BD).

L'anticorpo secondario è stato inoltre usato da solo per
20 marcare le cellule come controllo isotipico (area di destra, linea in grigio chiaro).

I livelli di espressione del GD2 risultano essere rispettivamente alti nella linea TC71 (Figura 5a), bassi nella linea A673 (Figura 5b) ed assenti nella linea RD-ED
25 (Figura 5c).



La Figura 6 mostra l'espressione di entrambi i recettori agonisti, ovvero in grado di produrre l'effetto fisiologico a seguito del legame con il ligando, (specificamente DR4 e DR5) e decoy, quindi antagonisti (nello specifico DcR1, DcR2) di TRAIL nelle linee cellulari di ES (TC71 in nero, A673 in tratteggio nero e RD-ES in punteggiato nero) mediante analisi al FACS.

Dalla Figura 7a alla 7f è mostrata la citotossicità esercitata in vitro dai PC sTRAIL bi-funzionali sulle linee cellulari target di ES.

I PC sono stati marcati con la molecola fluorescente CFSE (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), acquisendo così una fluorescenza verde.

Più in dettaglio, le Figure dalla 7a alla 7c, mostrano la citotossicità esercitata dai PC sTRAIL bi-funzionali nei confronti delle linee cellulari di ES valutata con saggi di co-coltura a 24 ore, testando molteplici rapporti target: effettore (T:E), nel dettaglio T:E 1:1, 1:2 e 1:5.

L'effetto citotossico dei PC bi-funzionali è stato ulteriormente valutato comparandolo con quello indotto da rhTRAIL (1 µg/ml) e dai PC esprimenti sTRAIL da solo, mentre i PC EV ed i PC GD2 tCAR sono stati usati come controllo negativo.

Cellule non trattate di controllo (indicate come CTR) di ES sono state introdotte allo stesso modo per il confronto.



La fluorescenza verde dei PC marcati con CFSE ha permesso di ottenere al FACS una chiara distinzione tra le cellule target (CFSE-) e le cellule effettrici (CFSE+).

L'attività citotossica è stata valutata mediante marcatura con propidio ioduro (PI) sopravvitale, ponendo un riquadro o "gate" (ovvero fare una selezione, fare un "gating") sulle cellule CFSE negative, per quantificare solo la percentuale delle cellule tumorali morte.

I valori riportati di "p" (o p-value, in inglese), ottenuti con test statistico t di Student o t-test e applicato in tutte le successive analisi, derivano da molteplici comparazioni tra i PC sTRAIL ed i PC sTRAIL bi-funzionali rispetto ai gruppi di controllo rappresentati dai PC EV, dai PC GD2 tCAR e dal trattamento con rhTRAIL oppure dalle sole cellule tumorali CTR.

Per le TC71 (Figura 7a) si rileva: *p<.01, °p<.01, Sp<.01; per le A673 (Figura 7b) si rileva: *p<.05, °p<.01, Sp<.01; per le RD-ES (Figura 7 c) si rileva: *p<.01, °p<.01, Sp<.01. Nelle Figure da 7d a 7f, per valutare la citotossicità della molecola sTRAIL rilasciata dai PC sTRAIL bi-funzionali, le cellule tumorali sono state seminate in una piastra da 12 pozzetti alla concentrazione di 6000 cellule/cm² ed il giorno seguente la semina sono state incubate per 24 ore con il surnatante (ovvero il terreno di crescita condizionato dai



PC) contenente sTRAIL rilasciato in 48 ore dai PC sTRAIL e dai PC sTRAIL bi-funzionali.

La percentuale di mortalità è stata valutata al FACS tramite marcatura con PI.

5 I surnatanti derivanti dai PC EV e dai PC GD2 tCAR sono stati usati come controlli.

Cellule di ES di controllo CTR sono state introdotte allo stesso modo per il confronto.

I valori riportati di "p", riguardano molteplici confronti
10 tra i PC sTRAIL ed i PC sTRAIL bi-funzionali rispetto ai gruppi di controllo rappresentati dai PC EV, dai PC GD2 tCAR e dal trattamento con rhTRAIL oppure dalle sole cellule tumorali CTR. Per le TC71 (Figura 7d) si rileva: *p<.05, °p<.01, \$p<.05; per le A673 (Figura 7e) si rileva: *p<.01, °p<.01, \$p<.01; per le RD-ES (Figura 7f) si rileva: *p<.01, °p<.01, \$p<.01.
15

Le Figure 8a e 8b mostrano l'attività anti-tumorale dei PC sTRAIL bi-funzionali in un modello tridimensionale (3D) nei confronti di sferoidi di cellule tumorali TC71.

20 La linea cellulare TC71 di ES è stata fatta crescere in sferoidi tumorali "in vivo-like", cioè che mimano il tumore in vivo, allo scopo di studiare più realisticamente l'infiltrazione e la citotossicità dei PC sTRAIL bi-funzionali in un modello 3D in vitro.



La formazione degli sferoidi tumorali è stata ottenuta seminando 20000 cellule TC71 per pozzetto di una piastra multi-pozzetto da 96 pozzetti aventi un fondo a forma di "U" e ad ultra-bassa aderenza (Corning, New York, Stati Uniti),
5 caratteristiche che permettono nel tempo l'aggregazione cellula-a-cellula e quindi la formazione dello sferoide.

I PC sono stati aggiunti 24 ore dopo la semina delle TC71 alla concentrazione di 25.000 cellule per pozzetto.

Un periodo di co-coltura di 15 ore è stato identificato come
10 ottimale per quantificare la citotossicità dei PC sTRAIL bi-funzionali, tramite saggi basati sulla luminescenza, in dettaglio il saggio Cell Titer-Glo® 3D Cell Viability (Promega, Madison, Wisconsin, Stati Uniti), che misura il contenuto di ATP presente all'interno dello sferoide, quale
15 indicatore della vitalità cellulare, ed il saggio Caspase-Glo® 8 (Promega) che misura l'attività della caspasi 8.

Analizzando la vitalità cellulare (Figura 8a), si nota che il contenuto di ATP è più basso nelle co-culture con i PC sTRAIL bi-funzionali e con i PC sTRAIL, rispetto alle co-
20 colture controllo con i PC EV ed i PC GD2 tCAR. Nel dettaglio, si rileva: *p<.001, °p<.01, §p<.01;

In parallelo, si osserva che i PC sTRAIL bi-funzionali sono in grado di attivare fortemente la caspasi 8 negli sferoidi di TC71 (Figura 8b), rispetto ai PC non citotossici di
25 controllo (ovvero PC EV e PC GD2 tCAR) ed in misura simile



al trattamento con rhTRAIL o alla co-cultura con PC sTRAIL.
Nello specifico, si rileva: *p<.01, °p<.001, §p<.001.

La Figura 9 comprende tre grafici che mostrano il risultato
di saggi di interazione cellula-a-cellula dove risulta
5 evidente come il GD2 tCAR espresso sulla superficie dei PC
sTRAIL bi-funzionali aumenti il legame con le linee cellulari
di ES esprimenti il GD2.


I PC marcati con CFSE sono stati seminati in una piastra da
12 pozzetti per creare in 12 ore un monostrato di cellule
10 confluenti.

Per testare l'interazione cellula-a-cellula, è stata
aggiunta sopra al monostrato di PC una sospensione di cellule
di ES esprimenti la DsRed.

Dopo un'ora e mezza di incubazione, il terreno è stato
15 rimosso e le co-culture sono state lavate due volte con PBS
(acronimo di phosphate-buffered saline), poi poste in
agitazione per 3 minuti in modo da distaccare le cellule
tumorali debolmente adese ed il terreno è stato nuovamente
rimosso.

20 Le cellule rimanenti sono state raccolte mediante
tripsinizzazione e risospese in un volume fisso di PBS.

Il numero assoluto degli aggregati tra i PC e le cellule di
ES è stato valutato al FACS quantificando la popolazione
doppiamente positiva CFSE/DsRed in una frazione di tempo



costante di 60 secondi, come meglio descritto più avanti nell'Esempio 1.

Il dato è stato espresso come "fold-change", ovvero come rapporto, del numero di aggregati cellulari derivanti dall'interazione dei PC ingegnerizzati (PC GD2 tCAR, PC sTRAIL e PC sTRAIL bi-funzionali) con le cellule di ES ed il numero di aggregati prodotto dall'interazione dei PC EV con le cellule di ES. Questo è stato fatto per tutte e tre le linee di ES prese in considerazione.

I PC ingegnerizzati con il GD2 tCAR, sia i PC GD2 tCAR che i PC sTRAIL bi-funzionali, legano le linee cellulari GD2 positive, TC71 e A673, maggiormente rispetto ai PC EV e ai PC sTRAIL (per le TC71 * $p < .01$, ° $p < .01$; per le A673 * $p < .05$, ° $p < .01$).

Non sono state riscontrate differenze tra i diversi tipi di PC nella capacità di formazione di aggregati cellulari con la linea RD-ES che è negativa per il GD2.

Descrizione dettagliata di esempi di realizzazione preferiti.

Negli esempi che seguono, per semplicità si è fatto riferimento a cellule e/o periciti di derivazione umana, tuttavia la persona esperta comprende che è possibile anche l'impiego di cellule e/o periciti di derivazione animale.

ESEMPIO 1

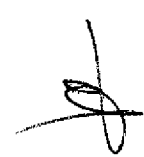
Ruolo svolto dal GD2 tCAR sulla membrana dei PC bi-funzionali nell'interazione tra i PC mTRAIL bifunzionali e le cellule di ES.

La tecnologia del GD2 tCAR è stata ulteriormente testata
5 considerando PC produttori una forma di TRAIL legata alla membrana (mTRAIL), come in Figura 1b (indicata con 3'), che richiede un contatto diretto cellula-a-cellula per indurre l'apoptosi della cellula tumorale.

Grazie al nuovo recettore GD2 tCAR, i PC bi-funzionali
10 produttori mTRAIL sono stati indirizzati specificamente contro il ES esprime il GD2 e l'interazione cellula-a-cellula è stata ottimizzata.

Il riconoscimento selettivo del target cellulare da parte dei PC ingegnerizzati con il GD2 tCAR è stato valutato nei
15 confronti di tutte le linee cellulari di ES, che differiscono considerevolmente per i livelli di espressione di GD2, che sono alti nelle TC71, bassi nelle A673 e completamente assenti nelle RD-ES, quale linea cellulare controllo negativo.

20 Un vettore retrovirale monocistronico basato sul virus delle cellule staminali murine (MSCV) e codificante per una proteina fluorescente rossa chiamata DsRed, è stato usato per infettare stabilmente le linee cellulari di ES, in modo da distinguere quest'ultime dai PC nel saggio di interazione.



Il retrovirus è stato prodotto per mezzo della linea cellulare FLYRD18 di packaging (che consente la produzione di virus infettante ma incapace di replicarsi).

I PC sono stati marcati con il colorante fluorescente CFSE
5 come da protocollo del reagente.

Il saggio di interazione cellula-a-cellula è stato eseguito come descritto di seguito.

I PC marcati con il CFSE sono stati seminati in una piastra da 12 pozzetti ad alta densità (100.000 cellule/pozzetto)
10 per creare in 12 ore un monostrato di cellule confluenti.

Per testare l'interazione, una sospensione di cellule di ES esprimenti la DsRed (70.000 cellule/pozzetto) sono state aggiunte al monostrato di PC.

Dopo un'ora e mezza di incubazione, il terreno è stato
15 rimosso e le co-culture sono state lavate due volte con PBS e poste in agitazione per 3 minuti in modo da distaccare le cellule tumorali debolmente legate al monostrato.

Le cellule rimanenti sono state raccolte mediante tripsinizzazione e risospese in un volume fisso di PBS.

20 Il numero assoluto degli aggregati cellulari PC-ES è stato quantificato mediante FACS considerando la popolazione doppio positiva CFSE/DsRed, in una frazione di tempo costante di 60 secondi.

Il dato è stato espresso come "fold-change" tra il numero di
25 aggregati cellulari derivanti dall'interazione dei diversi

PC ingegnerizzati (PC GD2 tCAR, PC mTRAIL e PC mTRAIL bi-funzionali) con le cellule di ES ed il numero di aggregati prodotto dall'interazione dei PC EV con le cellule di ES.

La stabilità di legame nella popolazione degli aggregati è stata inoltre valutata confrontando i PC EV ed i PC GD2 tCAR nell'interazione con la linea TC71 di ES.

Dopo il distacco con tripsina, gli aggregati cellulari PC-TC71 sono stati mantenuti in interazione per ulteriori periodi rispettivi di 2 e 4 ore in condizioni stringenti, ossia tali da sfavorire il mantenimento dei legami meno saldi, nello specifico a 4°C su un supporto rotante.

Il numero assoluto degli aggregati è stato poi quantificato mediante FACS.

I dati sono stati espressi confrontando il numero assoluto degli aggregati alle 2 o alle 4 ore in condizioni stringenti con il numero assoluto dopo distacco con tripsina.

RISULTATI dell'esempio 1.

Secondo l'invenzione, l'ingegnerizzazione della superficie dei PC con il GD2 tCAR rappresenta un metodo in grado di rafforzare l'interazione tra i PC e le cellule di ES esprimenti il GD2, forzando, inoltre, il legame di mTRAIL ai suoi recettori agonisti sulle cellule di ES.

Per studiare le nuove proprietà fornite dal GD2 tCAR, è stata testata l'abilità dei PC mTRAIL bi-funzionali di legare le

cellule di ES esprimenti il GD2, in un saggio di interazione cellula-a-cellula.


A tale scopo, i PC sono stati marcati con la molecola CFSE, acquisendo così una fluorescenza verde; al contrario le linee cellulari di ES sono state infettate stabilmente con un
5 vettore virale codificante per il gene DsRed, mostrando una fluorescenza rossa.

Grazie a questa diversa marcatura, i PC e le cellule di ES sono risultati chiaramente distinguibili tramite FACS ed i
10 loro aggregati sono apparsi come doppio positivi per entrambi i marcatori fluorescenti, CFSE e DsRed (Figura 10a, riquadro P4).

Nel saggio di interazione cellula-a-cellula, le cellule DsRed di ES sono state aggiunte al monostrato di PC marcati
15 con CFSE e lasciate in interazione per 1,5 ore.

Dopo lavaggi sequenziali per perdere gli interattori deboli, le cellule sono state raccolte ed analizzate tramite FACS per determinare il numero assoluto degli aggregati cellulari PC-ES, visualizzati come eventi doppio positivi CFSE/DsRed.
20 La relativa strategia di "gating" è stata descritta nella Figura 10a.

Le cellule sono state prima selezionate secondo i parametri morfologici di FSC e SSC (Figura 10a, area di sinistra) per escludere i detriti, poi le cellule DsRed-ES ed i CFSE-PC
25 sono stati visualizzati in un dot plot (ovvero un diagramma



di dispersione a punti che rappresenta la correlazione fra due parametri) CFSE e DsRed per ottenere quindi gli eventi doppio positivi, corrispondenti agli aggregati cellulari PC-ES, visualizzati nel riquadro in alto a destra (P4; Figure 5 10a, area di mezzo).

Un gate della popolazione doppio positiva CFSE/DsRed in P1 (Figura 10a, area di destra) ha confermato le dimensioni più grandi e la maggior complessità cellulare interna degli aggregati PC-ES.

10 Il numero di aggregati prodotti dall'interazione tra i PC GD2 tCAR, i PC mTRAIL bi-funzionali e le cellule di ES, è stato rapportato al numero degli aggregati tra i PC EV e le cellule di ES ed i dati mostrati come fold-change, per tutte le linee cellulari di ES testate (Figura 10b e 10c).

15 Come previsto, i valori espressi dai rapporti sono direttamente proporzionali all'abbondanza del GD2 nelle linee cellulari di ES e alla capacità dei PC di interagire tramite la funzionalizzazione con il GD2 tCAR.

I PC ingegnerizzati con il GD2 tCAR, sia i PC GD2 tCAR che 20 i PC mTRAIL bi-funzionali, legano la linea TC71 altamente GD2 positiva almeno dodici volte meglio rispetto ai PC EV ed ai PC mTRAIL (Figura 10b, area di sinistra). In particolare, si rileva: * $p < .001$, ° $p < .001$.

Inoltre, incubando gli aggregati per 2 ore in rotazione a 25 4°C (Figura 10b, area di destra), il legame dei PC GD2 tCAR



alle TC71 è più stabile rispetto a quello dei PC EV. La capacità di legame dei PC GD2 tCAR non è calata significativamente rispetto al valore basale al momento del distacco, al contrario quella dei PC EV è più bassa ($p < .001$).

5 Dopo 4 ore in condizioni stringenti, il numero di aggregati dei PC GD2 tCAR è ancora stabile rispetto alla condizione basale mentre quello dei PC EV è calato ulteriormente se comparato sia al time-point (ovvero al tempo di rilevazione) di 2 ore in condizioni stringenti che al tempo basale di
10 distacco ($*p < .05$).

Confrontando anche tra di loro i due tempi di incubazione di 2 e 4 ore in condizioni stringenti, non risultano differenze nel numero di aggregati con i PC GD2 tCAR, mentre un calo nel numero di aggregati si è verificato per i PC EV a 4 ore.

15 Un significativo, ma più ridotto guadagno in termini di capacità di legame dei PC ingegnerizzati con il GD2 tCAR, sia i PC GD2 tCAR che i PC mTRAIL bi-funzionali, si è riscontrato con la linea A673 esprime bassi livelli del GD2 (Figura 10c, area di sinistra; si rileva: $*p < .05$,
20 $^{\circ}p < .05$).

Per quanto riguarda la linea RD-ES GD2 negativa, non si rileva differenza in termini di formazione degli aggregati PC-ES tra i diversi tipi di PC ingegnerizzati, poiché questa linea cellulare tumorale non presenta il ligando GD2 sulla
25 superficie (Figure 10c, area di destra).

I PC ingegnerizzati con il GD2 tCAR hanno pertanto dimostrato un legame ottimizzato e specifico per le cellule di ES che esprimono l'antigene GD2.

5 ESEMPIO 2

Valutazione dell'effetto citotossico dei PC mTRAIL bi-funzionali su una linea cellulare di ES.

Secondo l'invenzione, è stato dimostrato che i PC bi-funzionali, ingegnerizzati per produrre contemporaneamente
10 sia mTRAIL sia il GD2 tCAR, mantengono l'attività citotossica TRAIL-mediata migliorando, inoltre, l'interazione con le cellule tumorali GD2 positive.

Dapprima, sono state realizzate delle co-culture bidimensionali (2D) come segue. I PC sono stati marcati con
15 il marcatore CFSE e seminati in una piastra di coltura da 12 pozzetti.

Dopo 12 ore dalla semina, le cellule tumorali sono state aggiunte alla densità di 6000 cellule/cm².

Sono stati testati differenti rapporti T:E (1:1, 1:2, e 1:5).

20 L'attività anti-tumorale dei PC esprimenti mTRAIL è stata valutata al FACS tramite marcatura con PI (50 µg/ml) dopo sole 12 ore di co-cultura, selezionando le cellule CFSE negative e PI positive, ovvero le cellule tumorali morte.

Il rhTRAIL alla dose di 1 µg/ml è stato introdotto come
25 controllo positivo.

Successivamente, l'attività anti-tumorale è stata confermata mediante saggio di attivazione della caspasi 8.

Per dimostrare che i PC mTRAIL bi-funzionali sono in grado di mandare in apoptosi le cellule di ES tramite l'attivazione della pathway (ovvero la via di trasduzione del segnale) di TRAIL, è stata analizzato il pattern di attivazione della caspasi 8, che è un marker precoce dell'apoptosi TRAIL-mediata, mediante tecnica di western blot su un lisato di cellule TC71, dopo 4 ore di co-cultura.

Nei dettagli, i PC ingegnerizzati sono stati seminati alla densità di 30.000 cellule/cm² in una piastra da 12 pozzetti. Dopo 12 ore, sono state aggiunte le TC71 alla densità di 6000 cellule/cm², quindi ad un rapporto T:E di 1:5.

Il rhTRAIL alla dose di 1 µg/ml è stato introdotto come controllo positivo.

Le cellule sono state raccolte e lisate dopo 4 ore di co-cultura con i PC ingegnerizzati o di incubazione con il rhTRAIL.

Il lisato proteico è stato quantificato usando il Biorad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, California, Stati Uniti). Secondo western blot, dopo il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana, sono state effettuate due rilevazioni mediante anticorpi: la prima per rilevare la caspasi 8 utilizzando un anticorpo monoclonale (mAb) murino (1C12; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, Stati Uniti) come

anticorpo primario ed un anticorpo secondario IRDye 800CW (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Stati Uniti) prodotto in capra e diretto contro gli anticorpi di topo.

Nella seconda, è stata rilevata la GAPDH usando un mAb di coniglio (14C10; Cell Signaling Technologies) come anticorpo primario ed un anticorpo secondario IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) prodotto in capra e diretto contro l'anticorpo di coniglio.

Il potenziale citotossico dei PC mTRAIL bi-funzionali è stato ulteriormente confermato in un modello 3D: gli sferoidi tumorali sono aggregati cellulari eterogenei che, quando diventano di diametro maggiore i 500 μm , si caratterizzano per la presenza di zone ipossiche ed un centro necrotico.

Gli sferoidi 3D sono, pertanto, considerati dei validi modelli per modellare le caratteristiche tipiche delle microregioni tumorali o delle micro-metastasi.

Al fine di creare questi sferoidi tumorali, sono state usate delle piastre a 96 pozzetti, con il fondo a forma di "U" e ad aderenza ultra-bassa (Corning), che, in contrasto con i metodi standard, non richiedono un rivestimento della superficie per prevenire l'adesione cellulare.

Le cellule tumorali esprimenti la DsRed hanno formato in tali piastre una struttura 3D in 24 ore.



La forma ad "U" del pozzetto promuove la formazione di singoli sferoidi di dimensioni riproducibili e localizzati al centro del pozzetto.

Dopo 24 ore, i PC ingegnerizzati marcati con il tracciante cellulare CFSE sono stati aggiunti allo sferoide tumorale, alla densità di 25000 cellule/pozzetto.

Il rhTRAIL alla dose di 1 µg/ml è stato introdotto nuovamente come controllo positivo.

L'architettura degli sferoidi è stata monitorata tramite microscopio a fluorescenza per 48 ore di co-cultura, al fine di seguire l'infiltrazione dei PC e l'effetto citotossico mediato dai PC mTRAIL bi-funzionali sullo sferoide tumorale. Inoltre, la vitalità delle cellule che formano lo sferoide è stata quantificata dopo 15 ore di co-cultura con saggi basati sulla luminescenza, nel caso specifico il CellTiter-Glo® 3D cell Viability Assay (Promega), che misura il contenuto di ATP presente all'interno dello sferoide, quale indicatore della vitalità cellulare, e il Caspase-Glo® 8 (Promega) che misura l'attività della caspasi 8.

RISULTATI dell'esempio 2.

Saggi di citotossicità sono stati introdotti per verificare che l'espressione contemporanea del ligando pro-apoptotico TRAIL e della molecola GD2 tCAR sulla superficie dei PC non vada ad inficiare il potenziale citotossico esercitato dai



PC ingegnerizzati mediante contatto cellula-a-cellula con le cellule tumorali.


Dapprima, la citotossicità dei PC mTRAIL bi-funzionali è stata confermata con un esperimento di co-coltura con la
5 linea di ES TC71, testando differenti time-points, precisamente a 12 ore (Figura 11a) 24 e 48 ore (dati non mostrati) e multipli rapporti T:E (1:1; 1:2 e 1:5).

L'effetto citotossico dei PC mTRAIL bi-funzionali è stato comparato con quello indotto dal rhTRAIL (1 µg/ml) e dai PC
10 esperimenti solamente mTRAIL, mentre i PC EV ed i PC GD2 tCAR sono stati usati come controlli negativi.

I PC mTRAIL bi-funzionali sono stati in grado di esercitare un rilevante effetto citotossico, con il livello di mortalità più alto (fino ad un 80±8% di cellule morte rilevate con il
15 rapporto T:E di 1:5) raggiunto dopo sole 12 ore di co-coltura, comparabile a quello prodotto dai PC mTRAIL e dal trattamento con rhTRAIL.

La citotossicità mediata dai PC mTRAIL bi-funzionali aumenta inoltre proporzionalmente con l'aumentare del rapporto T:E
20 (p<.05).

Per tutti i time-points valutati, la co-coltura delle TC71 con i PC EV o i PC GD2 tCAR non altera la vitalità delle cellule tumorali. Dall'analisi statistica mediante t-test si rileva: *p<.05; °p<.001; °p<.001, Sp<.001.



Per dimostrare che i PC mTRAIL bi-funzionali sono in grado di mandare in apoptosi le cellule di sarcoma tramite l'attivazione della pathway di TRAIL, è stato analizzato il pattern di attivazione della caspasi 8 mediante western blot su un lisato di cellule TC71 dopo sole 4 ore di co-cultura (Figura 11b).

Le cellule TC71 sono state messe in co-coltura con i PC ingegnerizzati al rapporto T:E di 1:5 oppure in presenza di rhTRAIL alla dose di 1 µg/ml, come controllo positivo.

Per le TC71 in co-coltura sia con i PC mTRAIL bi-funzionali che con i PC mTRAIL oppure trattate con rhTRAIL si osserva la presenza di una banda corrispondente al frammento p43/p41 della caspasi 8, risultante dall'attivazione e dal conseguente clivaggio di quest'ultima.

In co-coltura con i PC di controllo, PC EV e PC GD2 tCAR, non è stata riscontrata nessuna attivazione della caspasi 8, similmente al controllo rappresentato dalle TC71 da sole CTR.

In conclusione, questi dati hanno confermato che i PC mTRAIL bi-funzionali inducono apoptosi seguendo la stessa pathway del rhTRAIL.

Sferoidi in vivo-like, sono stati inoltre ottenuti a partire dalla linea cellulare TC71 esprime la DsRed per analizzare meglio l'infiltrazione e la citotossicità dei PC mTRAIL bi-funzionali marcati con il CFSE in un modello 3D.



Pertanto, è stata testata la capacità della linea TC71 di formare sferoidi tumorali (Figure 12a, prima riga).

La formazione degli sferoidi tumorali è stata ottenuta seminando le TC71 in una piastra da 96 pozzetti, con il fondo a forma di U e ad aderenza ultra-bassa (Corning).

La formazione degli sferoidi è un processo bi-fasico di aggregazione cellulare e di maturazione dello sferoide che porta ad una compattazione e ad una significativa riduzione del volume, raggiungendo una dimensione di 500-600 µm dopo 24 ore dalla semina.

Gli sferoidi delle TC71 rimangono stabili per diversi giorni con minime alterazioni morfologiche e mantengono alti livelli di espressione dell'antigene GD2 (dati non mostrati).

Successivamente, gli sferoidi delle TC71 sono stati trattati con rhTRAIL (1 µg/ml) per valutare se la conformazione 3D conferisce loro resistenza al trattamento con il ligando di morte. Come si osserva in Figura 12a, seconda riga, il rhTRAIL innesca l'apoptosi delle TC71, rompendo l'architettura 3D e riducendo sia la fluorescenza che le dimensioni degli sferoidi.

Gli sferoidi tumorali sono stati dapprima monitorati al microscopio a fluorescenza per osservare l'infiltrazione e la citotossicità dei PC ingegnerizzati nel corso delle 48 ore di co-coltura (Figura 12b).

Nelle prime 8 ore di co-cultura, tutti i diversi tipi di PC ingegnerizzati si localizzano progressivamente alla periferia dello sferoide tumorale (Figura 12b, prima colonna) per poi cominciare ad interagire alle 24 ore con le
5 cellule tumorali, provocando una compattazione dello sferoide rosso (Figura 12b, seconda colonna).

Differenze tra i diversi PC ingegnerizzati sono apparse dopo 48 ore di co-cultura (Figura 12b, terza e quarta colonna). Sia i PC EV che i PC GD2 tCAR hanno infiltrato in profondità
10 lo sferoide rosso, raggiungendone il centro, come evidente dall'analisi delle sezioni congelate (Figura 12b, ultima colonna), mentre sia i PC mTRAIL che i PC mTRAIL bi-funzionali hanno progressivamente distrutto lo sferoide rosso partendo dai bordi con un conseguente calo della
15 fluorescenza della DsRed espressa dalle cellule tumorali e la perdita completa dell'architettura sferoidale, come si osserva nelle sezioni congelate.

È stato poi scelto un time-point precoce di 15 ore per quantificare la citotossicità dei PC mTRAIL bi-funzionali
20 mediante saggi basati sulla luminescenza (Figura 12c).

La citotossicità dei PC mTRAIL bi-funzionali si è evidenziata sia in termini di calo della vitalità cellulare, sia di attivazione della caspasi 8 nello sferoide tumorale.

Il contenuto di ATP (Figura 12c, area di sinistra e di
25 mezzo), quale indice di vitalità cellulare, è più basso nelle


co-culture con i PC mTRAIL bi-funzionali e con i PC mTRAIL se comparato con le co-culture con i PC di controllo, PC EV e PC GD2 tCAR. In particolare, si rileva: *p<.001, °p<.001, \$p<.001

5 In parallelo, i PC mTRAIL bi-funzionali sono in grado di attivare la caspasi 8 nelle TC71 (Figura 12c, area di destra) in misura simile ai PC mTRAIL e al trattamento con rhTRAIL, mentre i PC EV ed i PC GD2 tCAR non attivano la via apoptotica. Dall'analisi statistica si ottiene: *p<.05,
10 °p<.001, \$p<.001.

Completivamente, questi dati in-vitro hanno dimostrato che i PC mTRAIL bi-funzionali preservano una rilevante attività anti-tumorale, comparabile a quella dei PC mTRAIL, nonostante la simultanea espressione di alti livelli del GD2
15 tCAR.

Ancora più rilevante è che l'azione anti-tumorale dei PC mTRAIL bifunzionali è stata ulteriormente rinforzata dall'aumentata capacità di targeting dovuta alla presenza del GD2 tCAR che ha la funzione di migliorare le interazioni
20 con le cellule tumorali esprimenti il GD2, come presentato nell'esempio 1.

ESEMPIO 3



Effetto della ingegnerizzazione dei PC con il GD2 tCAR
nell'interazione tra PC e GBM.

Come primo passo, in maniera simile a quanto descritto
nell'esempio 1, è stata valutata mediante saggio di
5 interazione cellula-a-cellula l'affinità di legame dei PC
mTRAIL bi-funzionali nei confronti della linea T98G di GBM,
che si caratterizza per una elevata espressione del GD2.

Il saggio di interazione cellula-a-cellula è stato poi
ulteriormente allestito per valutare se l'ottimizzata
10 capacità di legame dei PC mTRAIL bi-funzionali nei confronti
delle cellule di GBM positive per il GD2 si traduce in una
citotossicità più efficace, a confronto con quella mediata
dai PC mTRAIL.

A tale scopo, è stata considerata la linea T98G di GBM,
15 altamente GD2 positiva, ed il saggio di interazione è stato
condotto per un tempo di 7 ore.

Successivamente, è stata eseguita una marcatura con
Annessina V, un marcatore di apoptosi, sulla popolazione di
aggregati cellulari PC-GBM prodotti nel saggio di
20 interazione. Al FACS sono stati quindi quantificati gli
aggregati CFSE/DsRed positivi per l'Annessina V, in una
frazione di tempo costante di 60 secondi.

I dati sono stati espressi come percentuale di aggregati
cellulari PC-GBM positivi per l'Annessina V.



Sieri anti-idiotipo prodotti nel topo e diretti contro il GD2 tCAR sono stati poi utilizzati per bloccare l'interazione GD2 tCAR-mediata tra i PC mTRAIL bi-funzionali e le T98G ed è stato poi analizzato l'effetto sull'apoptosi tramite marcatura con Annessina V.

In breve, i PC ingegnerizzati sono stati incubati con tali sieri diluiti 1:20 per 40 minuti a 37°C e 5% CO2 e quindi usati per allestire un saggio di interazione cellula-a-cellula, come descritto in precedenza.

La percentuale di aggregati cellulari PC-GBM positivi per l'Annessina V dopo 7 ore di interazione è stata poi analizzata al FACS.

RISULTATI dell'esempio 3

Secondo l'invenzione, i PC ingegnerizzati con il GD2 tCAR, sia i PC GD2 tCAR che i PC mTRAIL bi-funzionali, legano la linea T98G risultata altamente positiva per l'espressione del GD2 (come indicato da analisi al FACS in Figura 13) almeno quattro volte di più rispetto ai PC EV ed ai PC mTRAIL (Figura 14); * $p < .001$).

È interessante notare che la co-espressione di mTRAIL e del GD2 tCAR conferisce ai PC mTRAIL bi-funzionali un'attività citotossica molto più rapida contro le cellule di GBM GD2 positive, come verrà meglio descritto più avanti.

La mortalità cellulare è stata valutata ad un time-point precoce di 7 ore, tramite marcatura con Annessina V sugli aggregati doppio positivi CFSE/DsRed.

La strategia di gating descritta in precedenza per il saggio
5 di interazione (con riferimento alla Figura 10a) è stata applicata in questo esperimento e la percentuale di aggregati PC-GBM positivi per l'Annessina V è stata quantificata sulla popolazione cellulare compresa nel riquadro P4 di Figura 15a.

10 L'interazione con i PC mTRAIL bi-funzionali ha prodotto un significativo effetto citotossico sugli aggregati ($59 \pm 5\%$ di cellule apoptotiche), se comparato sia con i PC mTRAIL ($32 \pm 7\%$), sia con i PC di controllo, ovvero i PC EV ($9 \pm 3\%$) ed i PC GD2 tCAR ($15 \pm 4\%$) ($p < .001$) (Figura 15b, colonne senza
15 tratteggio).

Per confermare il ruolo del GD2 tCAR espresso dai PC mTRAIL bi-funzionali nell'indurre un'apoptosi più rapida ed efficace, sono stati usati sieri anti-idiotipo di topo contro il recettore chimerico per bloccare il legame tra il GD2
20 tCAR ed il ligando GD2 (Figura 15b, colonne con tratteggio). Bloccando l'interazione tra il GD2 tCAR ed il GD2 tramite incubazione dei PC mTRAIL bi-funzionali con i sieri di topo, la percentuale di aggregati positivi all'Annessina V si è ridotta significativamente fino ad un $40 \pm 2\%$, comparabile ai
25 PC mTRAIL con ($36 \pm 7\%$) o senza incubazione con i sieri.

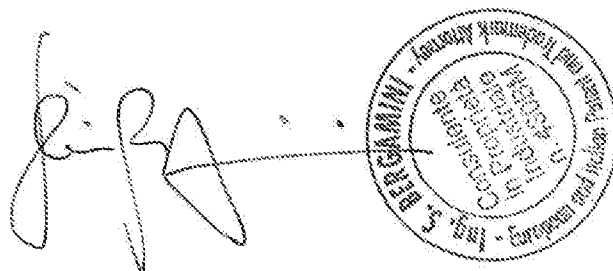
Applicando l'analisi statistica secondo t-test si rileva:
*p<.001, **p<.001, °p<.001, °°p<.001.

Questi dati suggeriscono che l'espressione del GD2 tCAR da
parte dei PC mTRAIL bi-funzionali conferisce un targeting
5 specifico delle cellule tumorali esprimenti il GD2 e ne
potenzia anche l'effetto citotossico.

Si è constatato come l'invenzione raggiunga gli scopi
prefissati.

L'invenzione come concepita è suscettibile di modifiche e
10 varianti, tutte rientranti nell'ambito del concetto
inventivo.

Nella attuazione pratica, gli elementi indicati potranno
essere sostituiti con altri tecnicamente equivalenti, senza
per questo uscire dall'ambito di protezione delle seguenti
15 rivendicazioni.



The image shows a handwritten signature in black ink, which appears to be 'S. Bergamini'. To the right of the signature is a circular official stamp. The stamp contains the text 'Ing. S. BERGAMINI' around the top edge and 'Consulente in Proprietà Industriale' around the bottom edge. In the center of the stamp, there is a date '12/02/2014' and the number '4308M'. The stamp is partially overlapping the signature.

20

25

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la produzione di cellule bi-funzionali, caratterizzato dal fatto che comprende ingegnerizzare cellule di partenza ottenendo cellule ingegnerizzate
5 esprimenti contemporaneamente sia una molecola ad attività anti-tumorale sia una frazione di un anticorpo monoclonale diretto contro un antigene tumorale.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto ingegnerizzare prevede i passi di:
- 10 - Introdurre in dette cellule di partenza una sequenza codificante per una molecola pro-apoptotica;
- Introdurre in dette cellule di partenza una sequenza che codifica per una frazione di un anticorpo monoclonale diretto contro un antigene tumorale.
- 15 3. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui detta molecola pro-apoptotica è TRAIL.
4. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui detta molecola di TRAIL rilasciata da dette cellule ingegnerizzate comprende una molecola di TRAIL solubile, o sTRAIL, che è
20 dotata di una sequenza di secrezione.
5. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui detta molecola di TRAIL rilasciata da dette cellule ingegnerizzate comprende una molecola di TRAIL di membrana, o mTRAIL, che è dotata di una sequenza di legame alla membrana di dette
25 cellule ingegnerizzate.

6. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta frazione di anticorpo monoclonale è un scFv derivante da una immunoglobulina diretta verso l'antigene tumorale.
7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui detto scFv
5 è compreso in un recettore chimerico per l'antigene, noto come CAR.
8. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui detto CAR è CAR troncato, o tCAR, della porzione intracellulare di trasduzione del segnale.
- 10 9. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto antigene tumorale è GD2.
10. Metodo secondo la rivendicazione 8 e 9, in cui detto tCAR ha affinità di legame per l'antigene GD2.
11. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto
15 ingegnerizzare comprende infettare dette cellule di partenza con almeno un vettore virale.
12. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui detti vettori virali comprendono retrovirus.
13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detti
20 retrovirus comprendono lentivirus.
14. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule di partenza sono periciti umani, o PC.
15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui dette cellule di partenza hanno origine scelta tra tessuto adiposo,
25 tessuto osteo-midollare, placenta, liquido amniotico, polpa

dentale, tessuto muscolare, tessuto cardiaco, cordone ombelicale, tessuto cutaneo, tessuto pancreatico, tessuto intestinale, tessuto endometriale deciduale.

16. Metodo secondo la rivendicazione 15, in cui dette
5 cellule di partenza sono cellule di tessuto adiposo, o AD-PC.

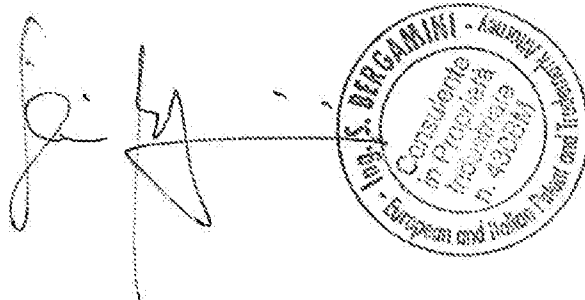
17. Metodo secondo la rivendicazione 16, in cui è previsto modificare in modo stabile dette AD-PC.

18. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule
10 di partenza sono scelte tra: cellule umane di origine autologa o allogenica, cellule animali.

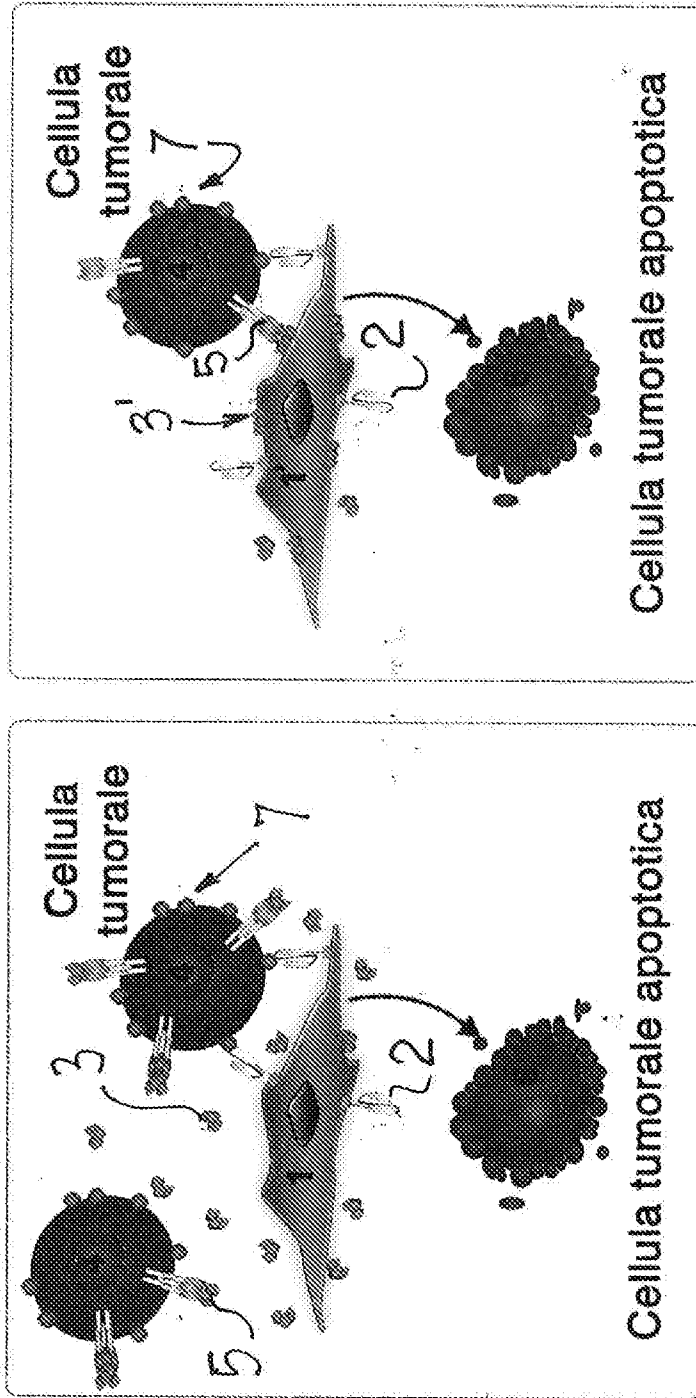
19. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule bi-funzionali comprendono:

- Un nucleo ed un citoplasma;
- 15 - Una modifica stabile di detto nucleo, caratterizzato dal fatto che detta modifica stabile comprende una molecola di TRAIL e una molecola di GD2 tCAR codificate da almeno un vettore virale ed inserito in detto nucleo di dette cellule di partenza.

20



25







 Recettore di TRAIL
 TRAIL
 GD2 iCAR
 Antigene GD2

Fig. 1b

Fig. 1a



Handwritten signature

3/22

Fig. 3a

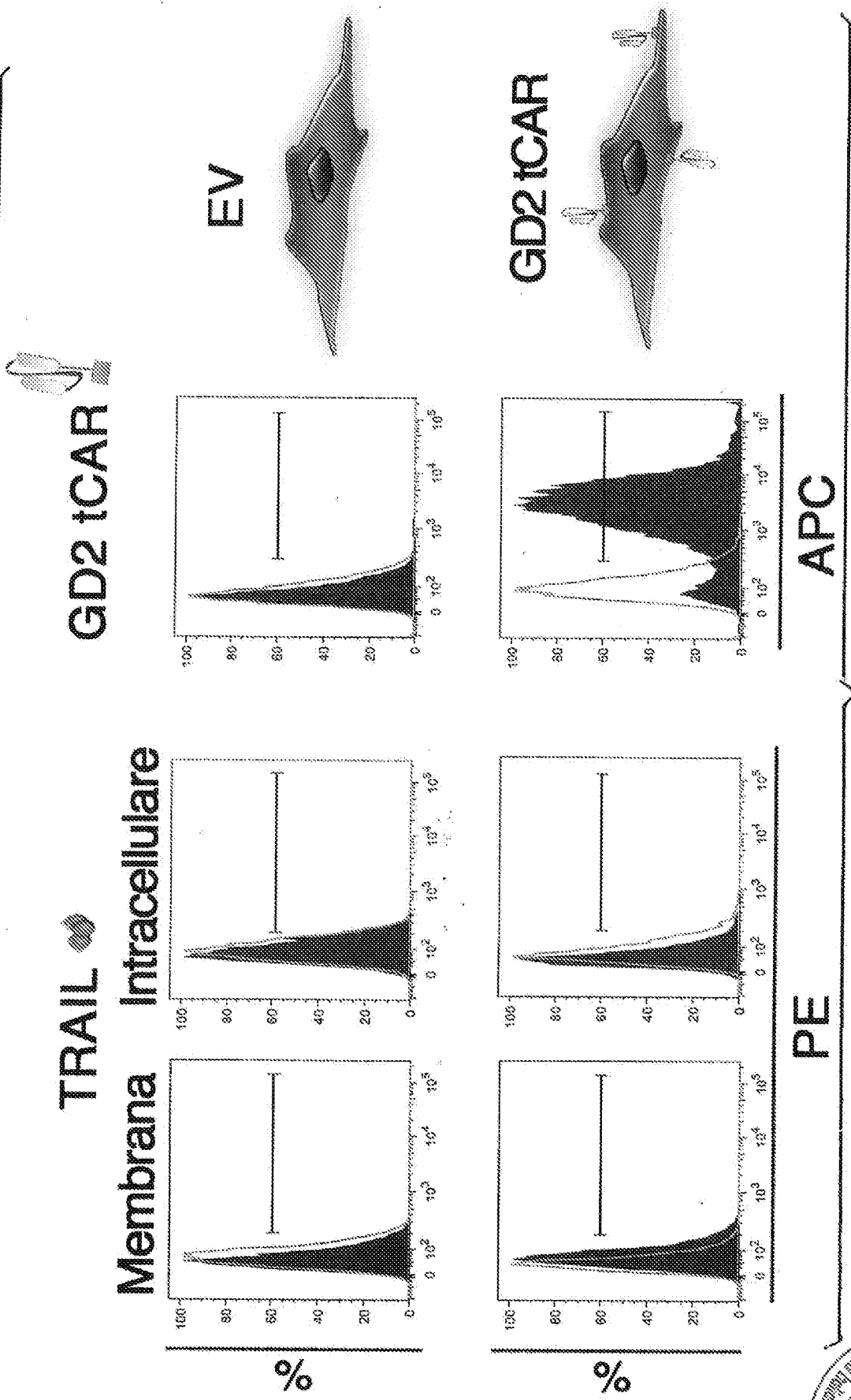


Fig. 3b

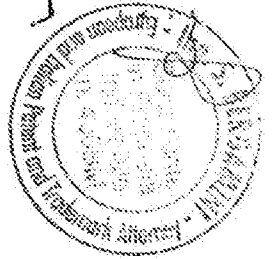
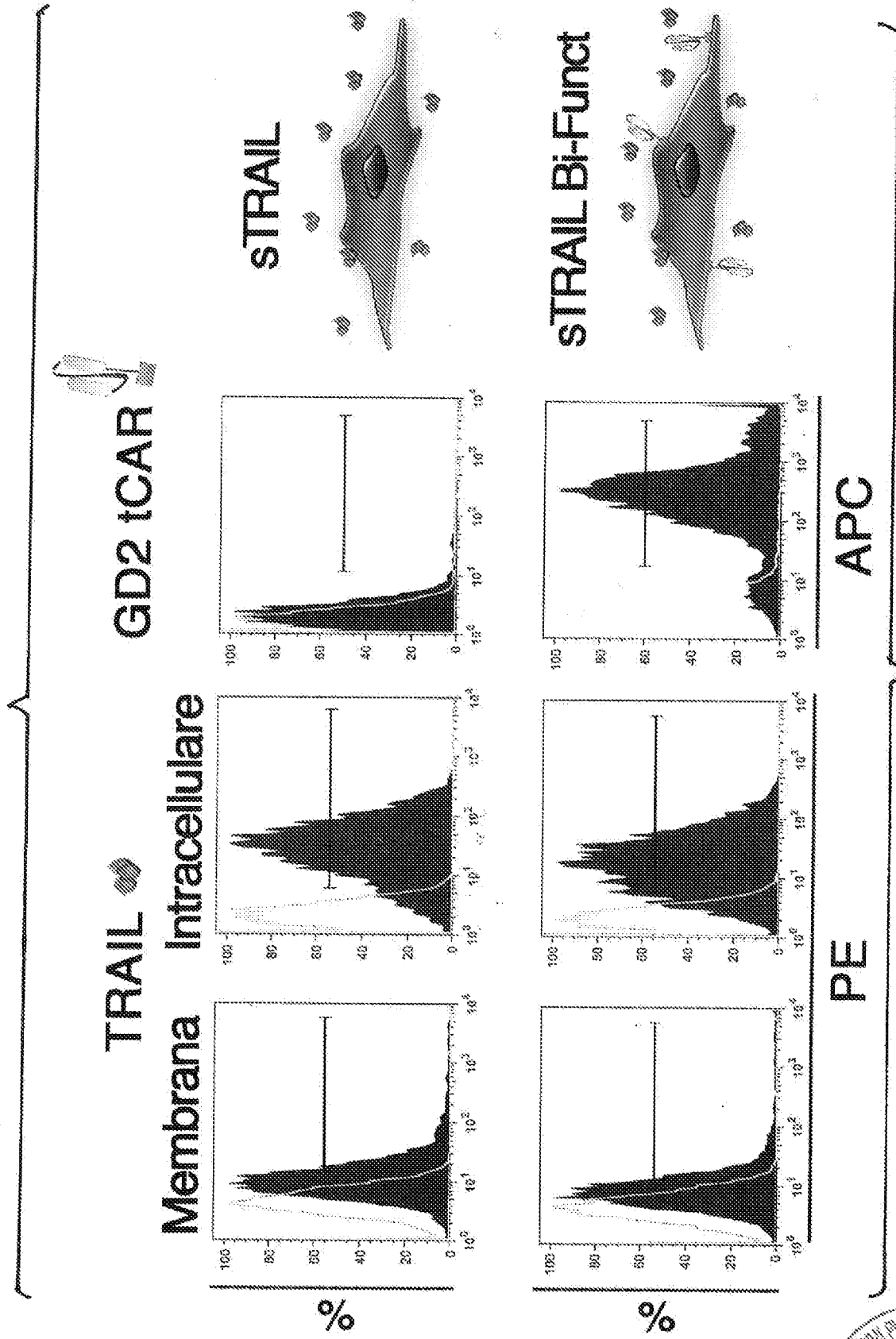


Fig. 3c



4/22

Fig. 3d

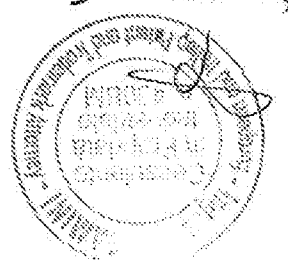


Fig. 3e

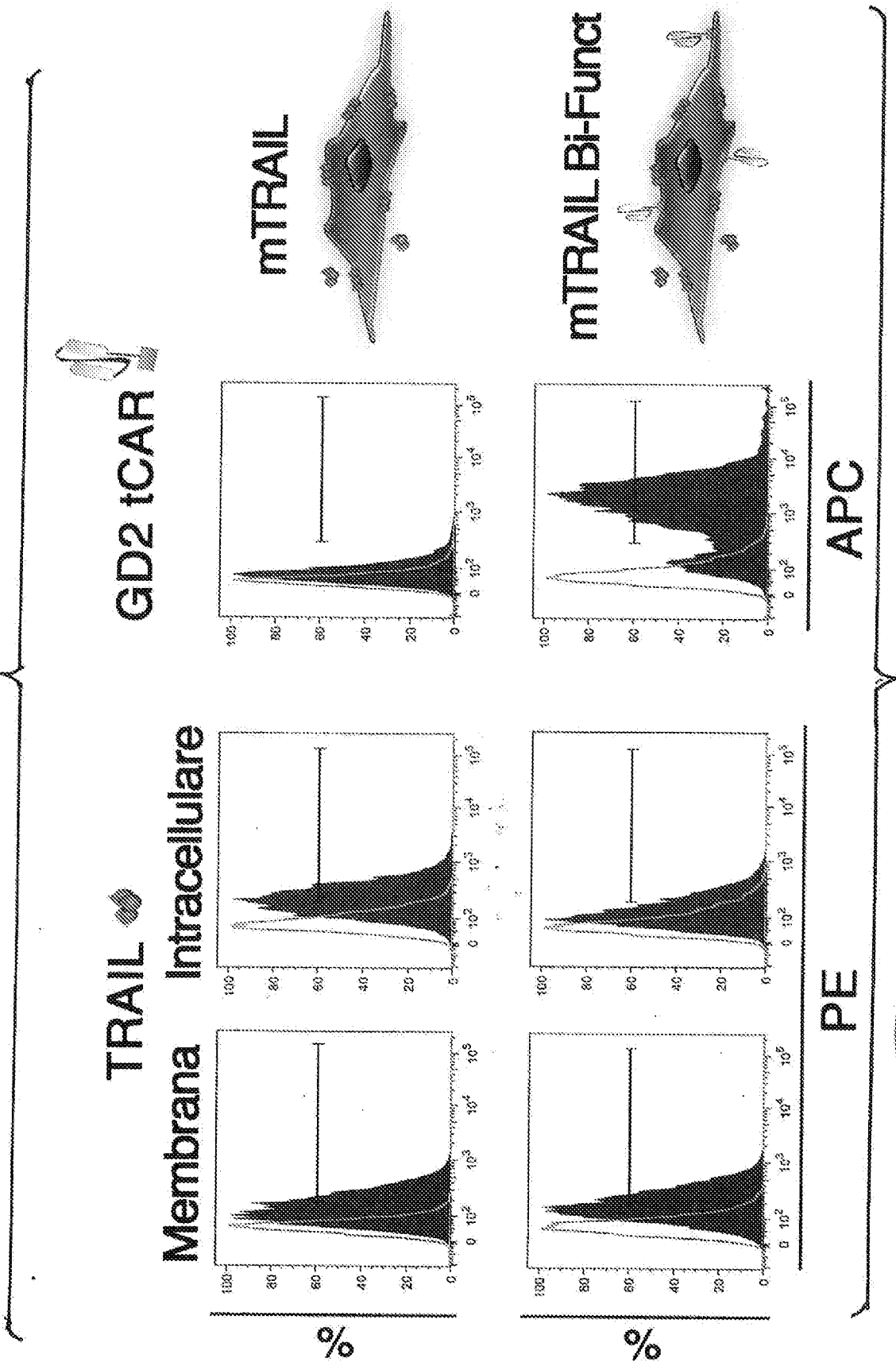


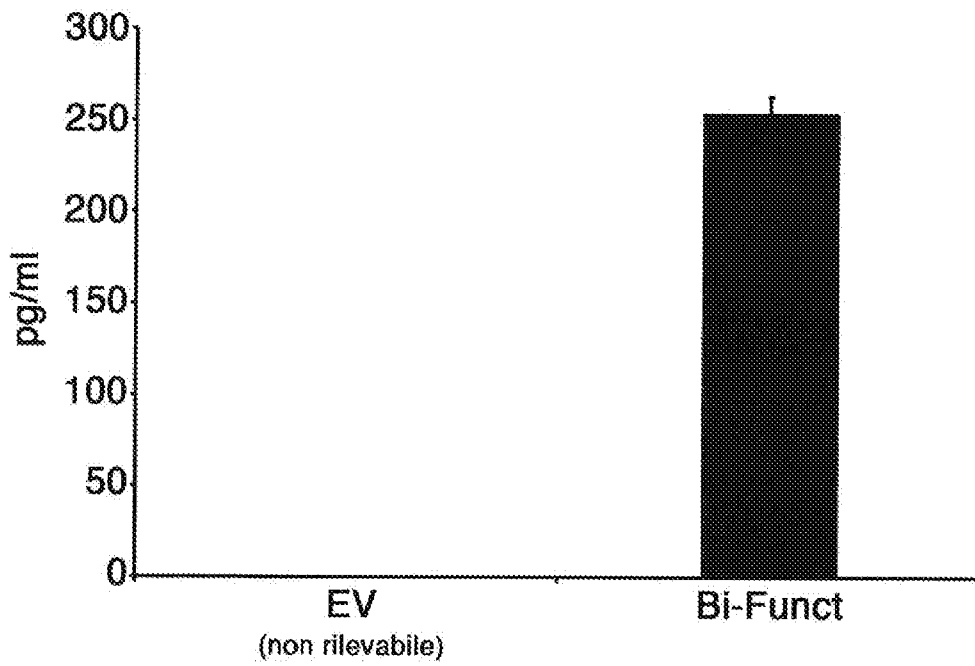
Fig. 3f



Handwritten signature

6/22

Fig. 4



[Handwritten signature]

[Circular official stamp]

7/22

Fig. 5a

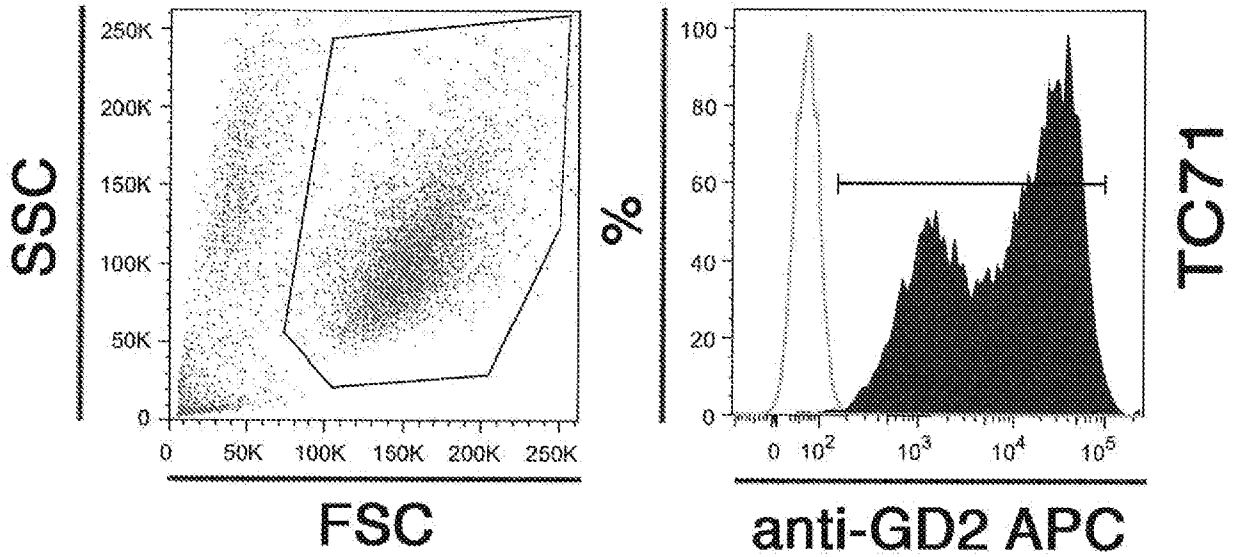
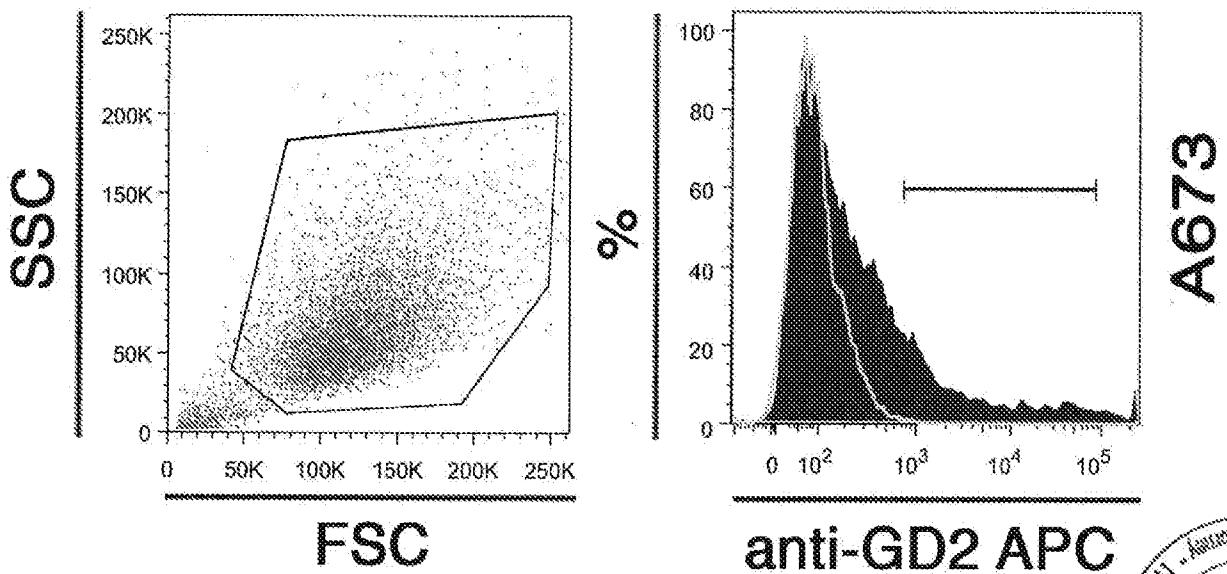
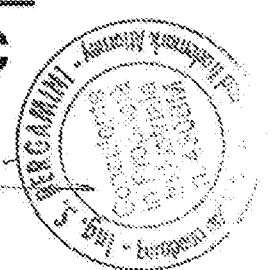


Fig. 5b



Handwritten signature



8/22

Fig. 5c

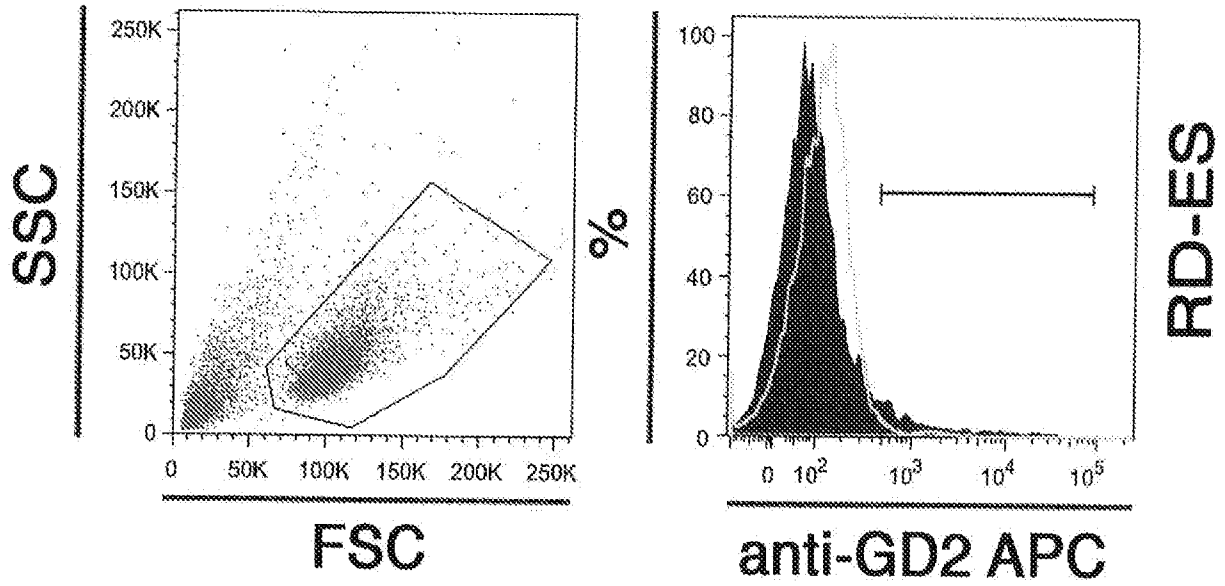


Fig.6

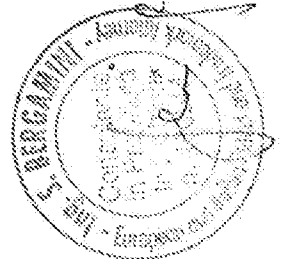
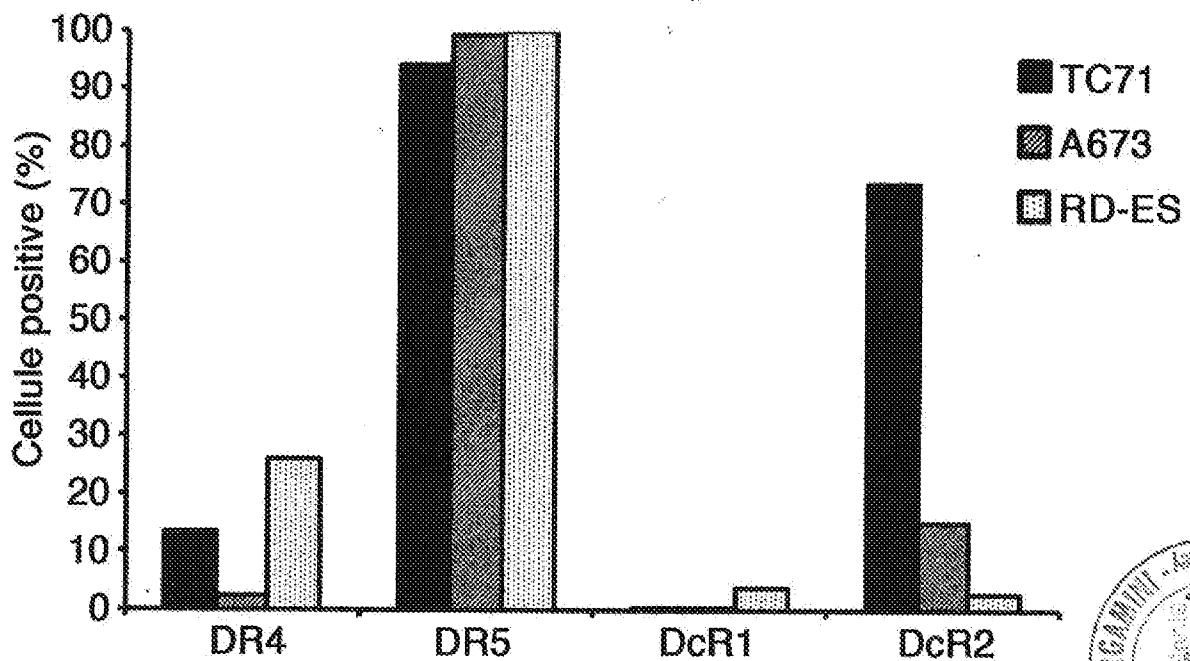


Fig. 7a

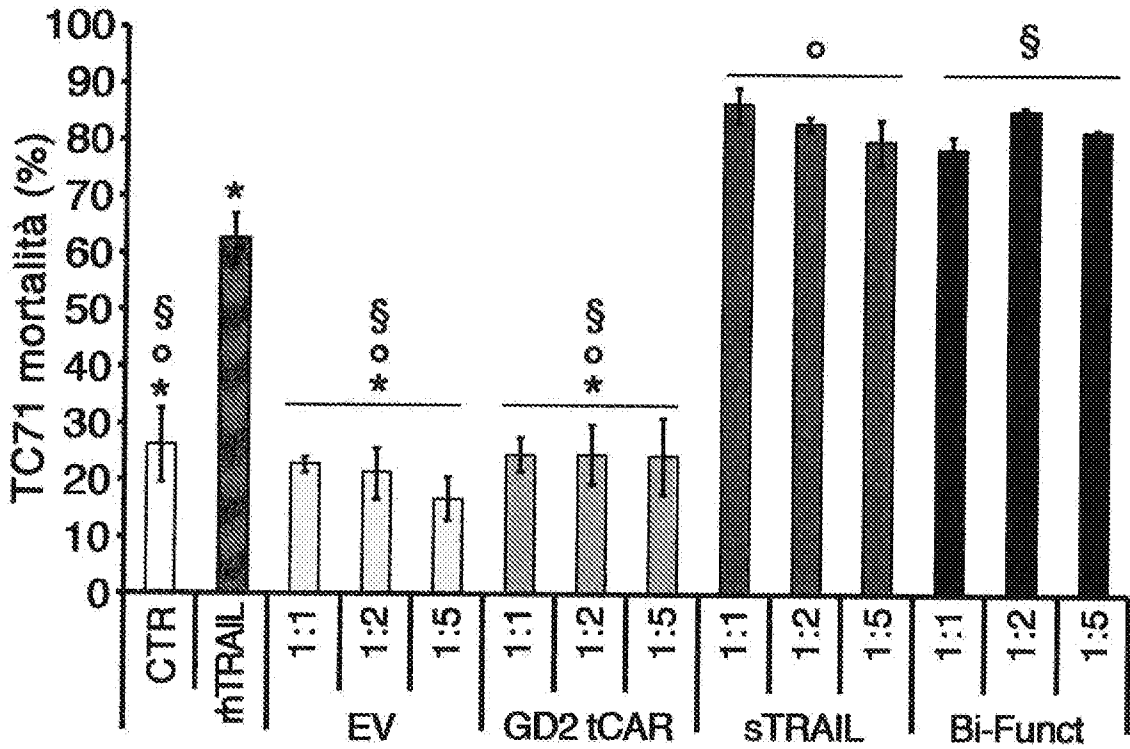
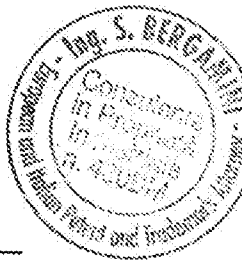
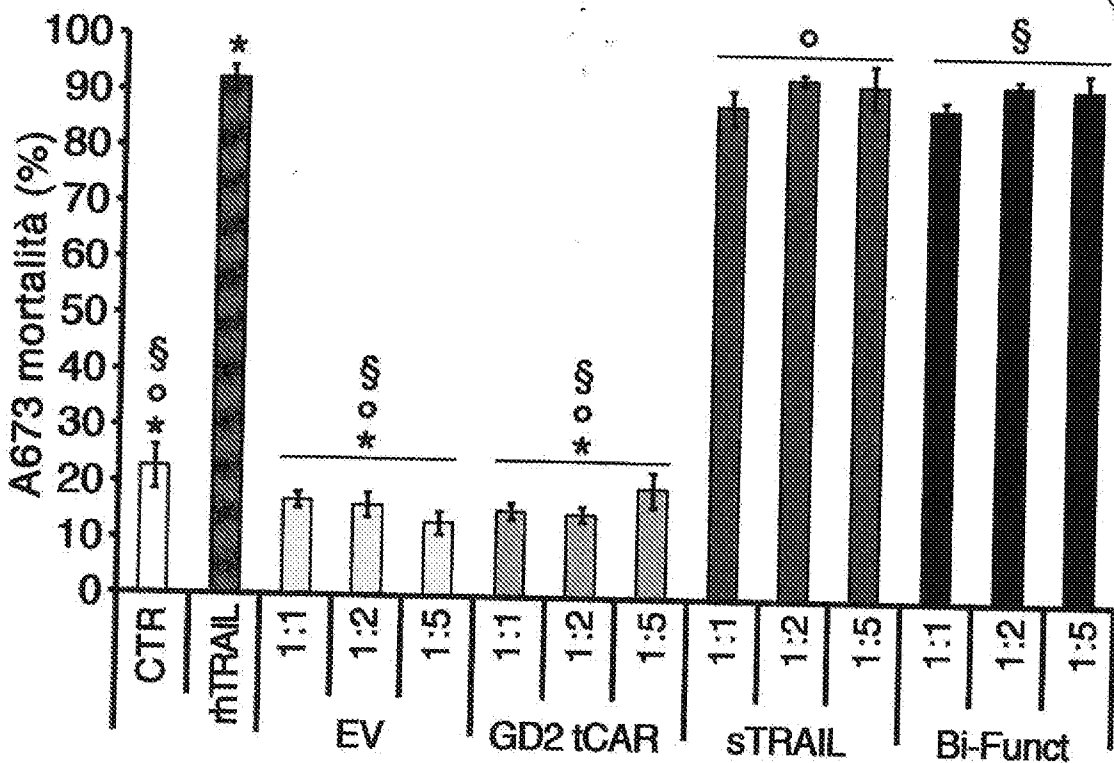


Fig. 7b



Handwritten signature

Fig. 7c

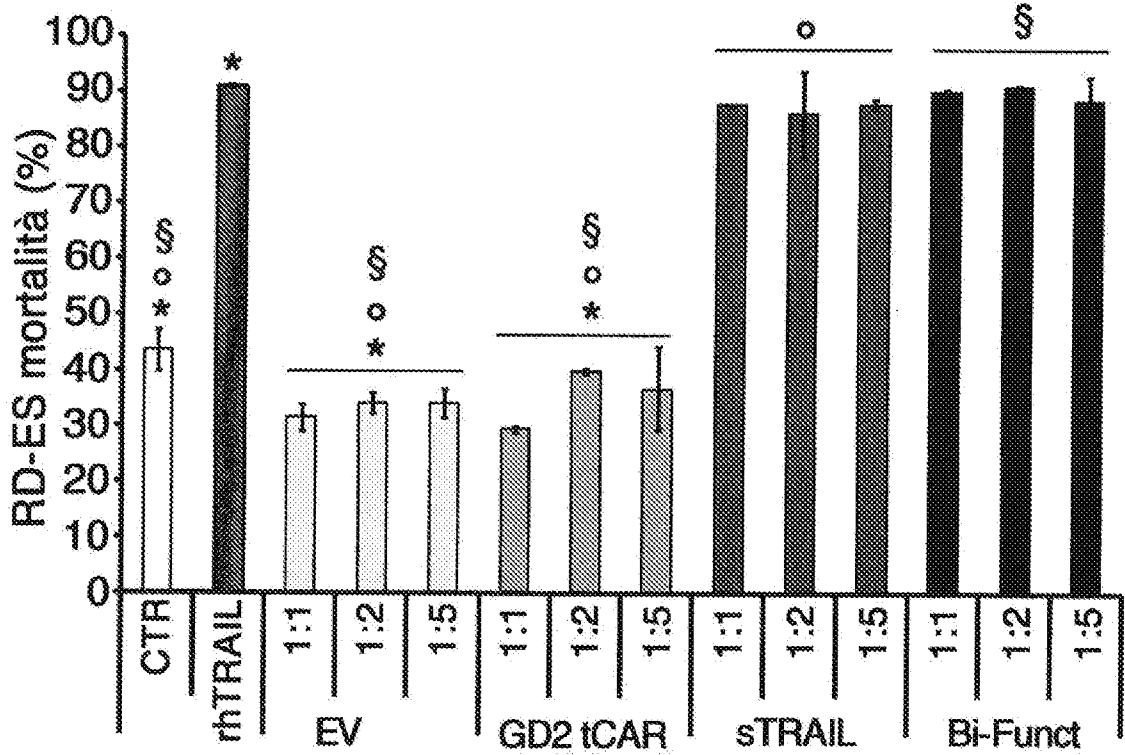
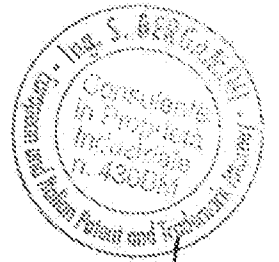
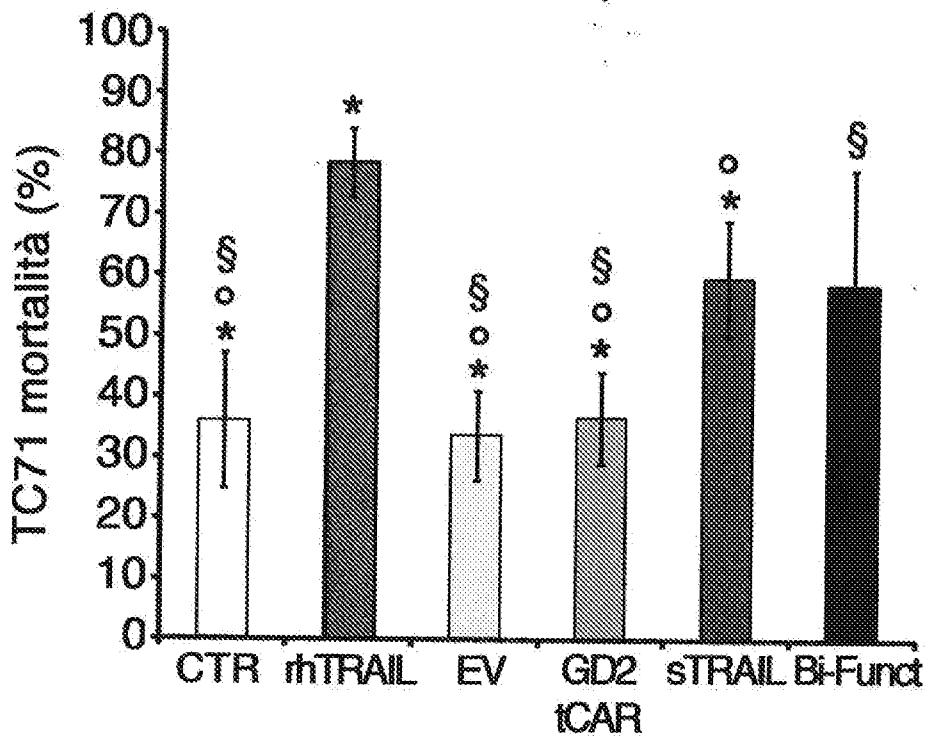


Fig. 7d



Handwritten signature

11/22

Fig. 7e

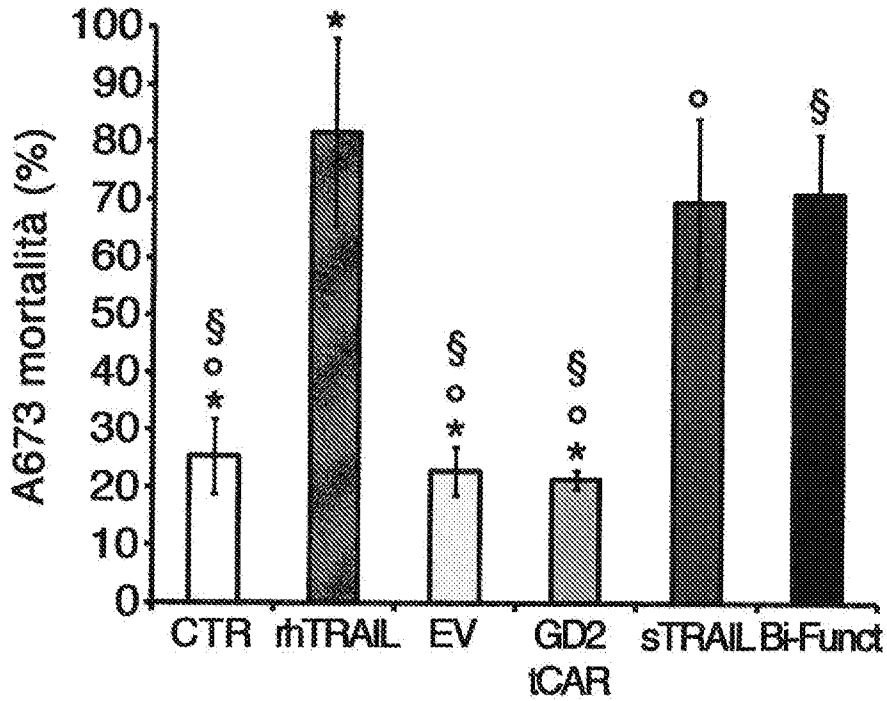
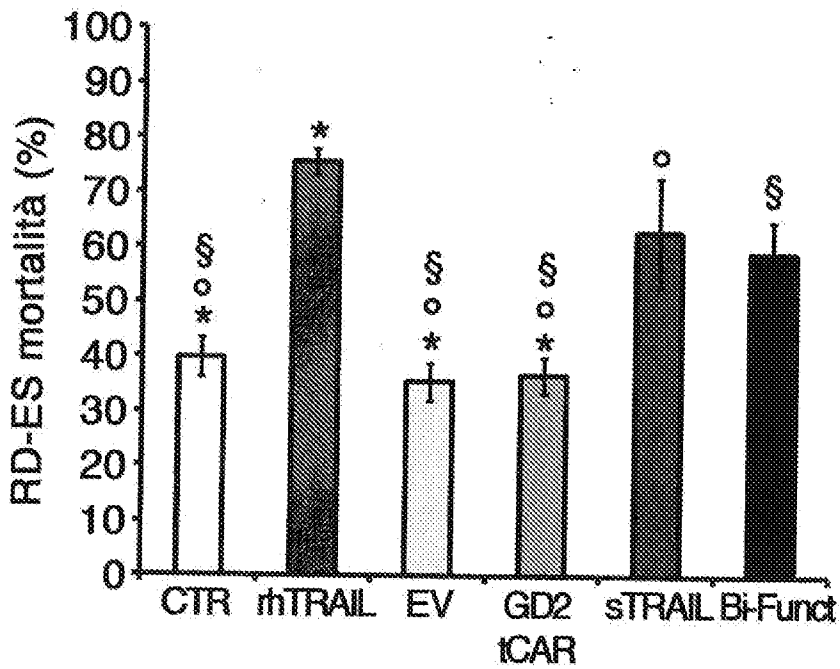


Fig. 7f



[Handwritten signature]

Fig. 8a

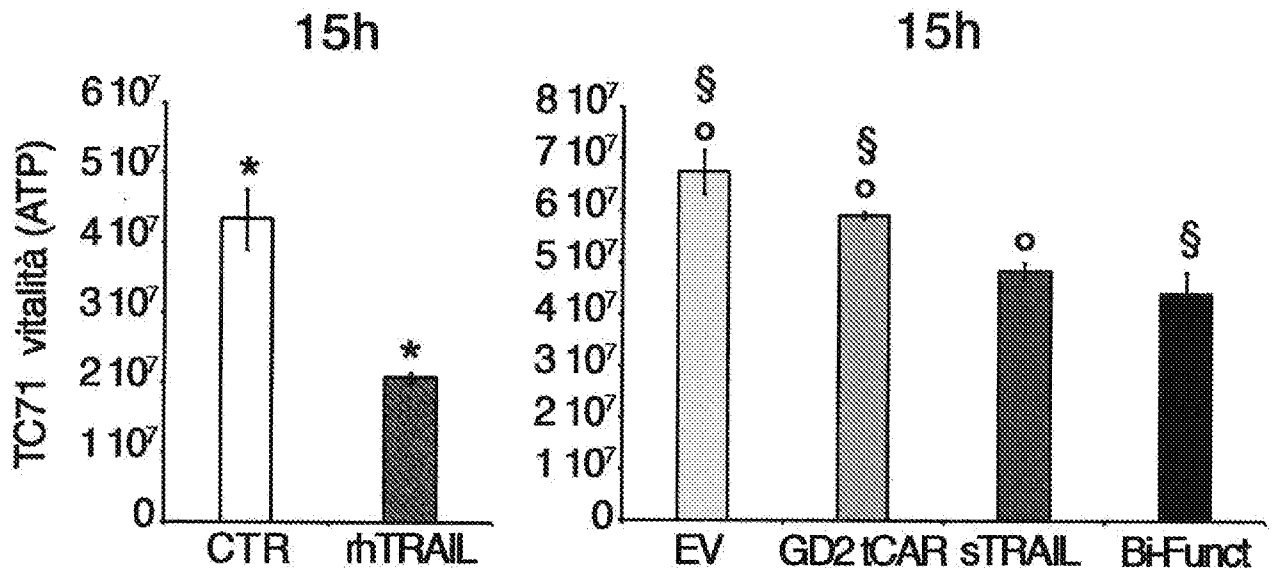
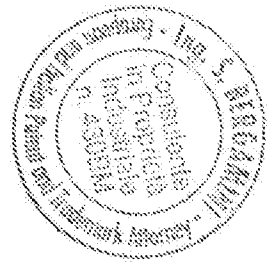
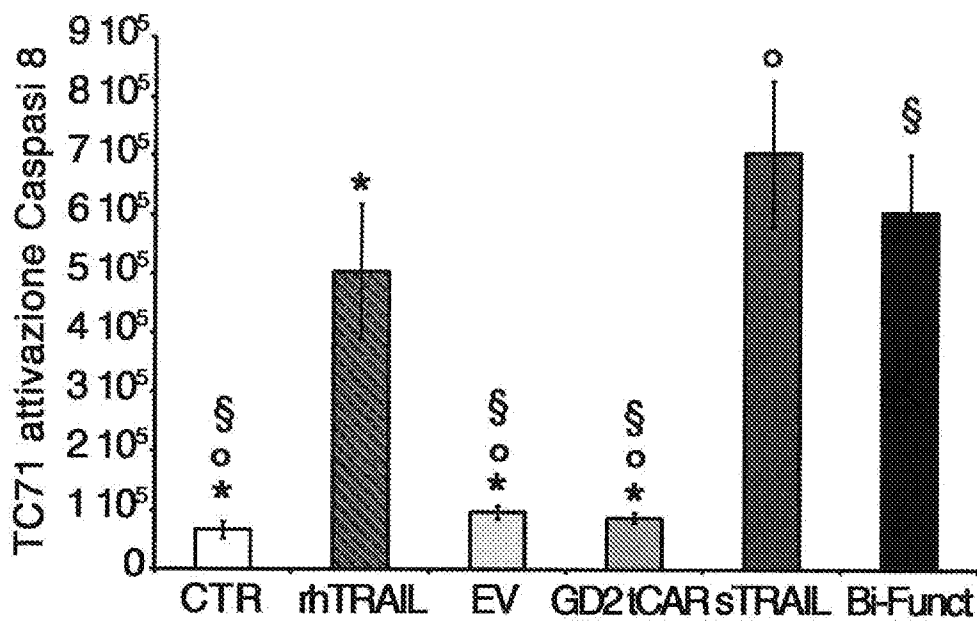
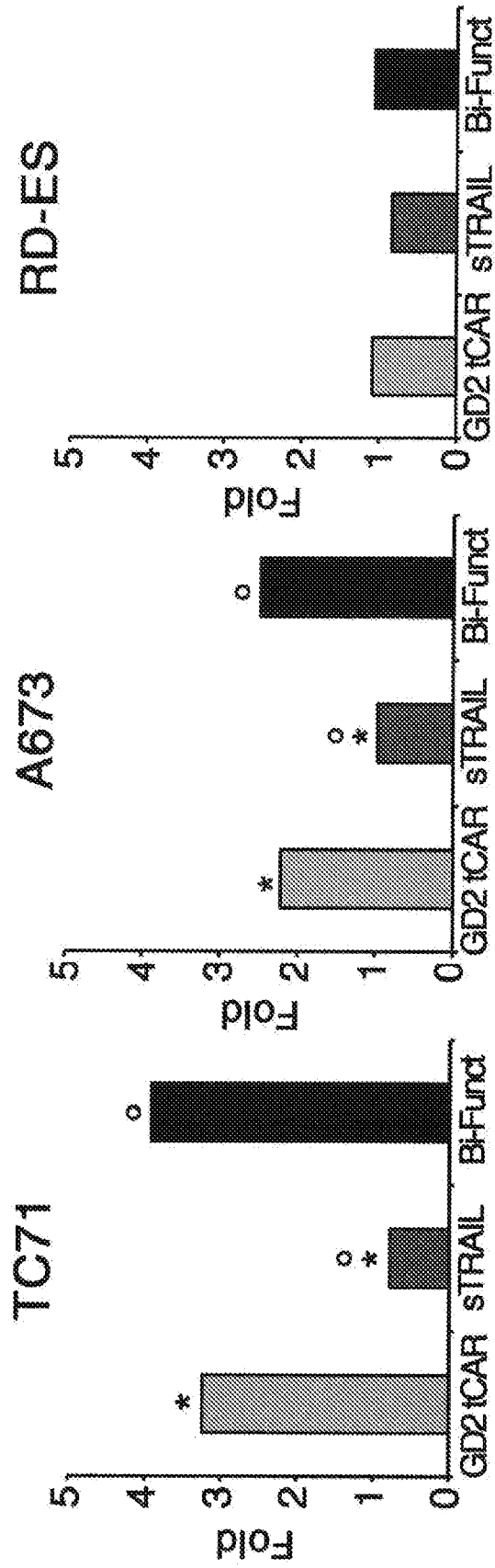


Fig. 8b



Handwritten signature

Fig. 9



[Handwritten signature]

14/22

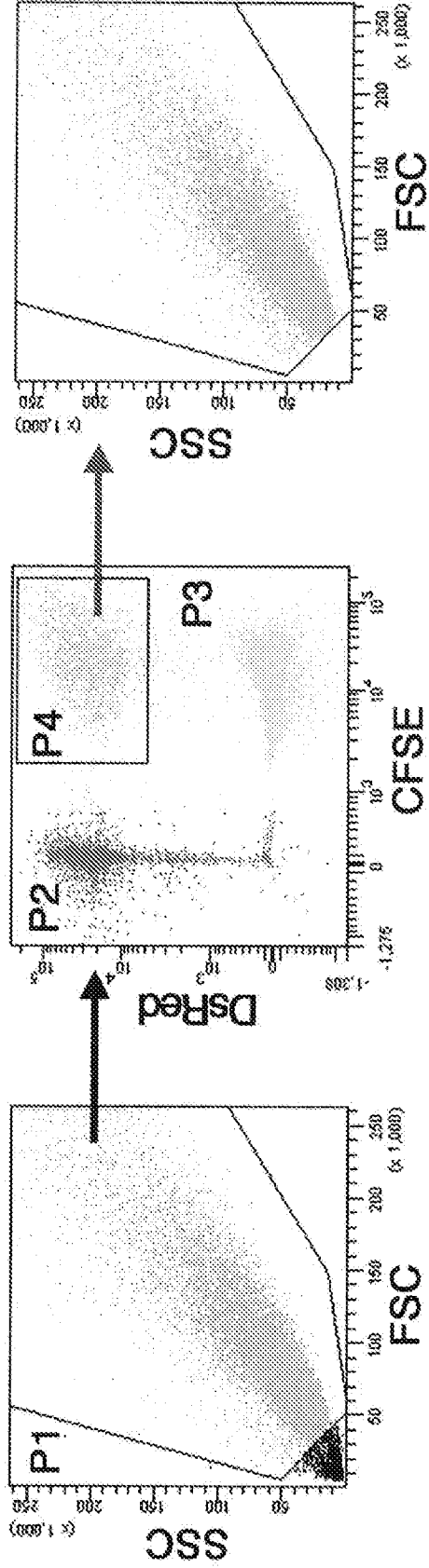


Fig. 10a



[Handwritten signature]

Fig. 10b

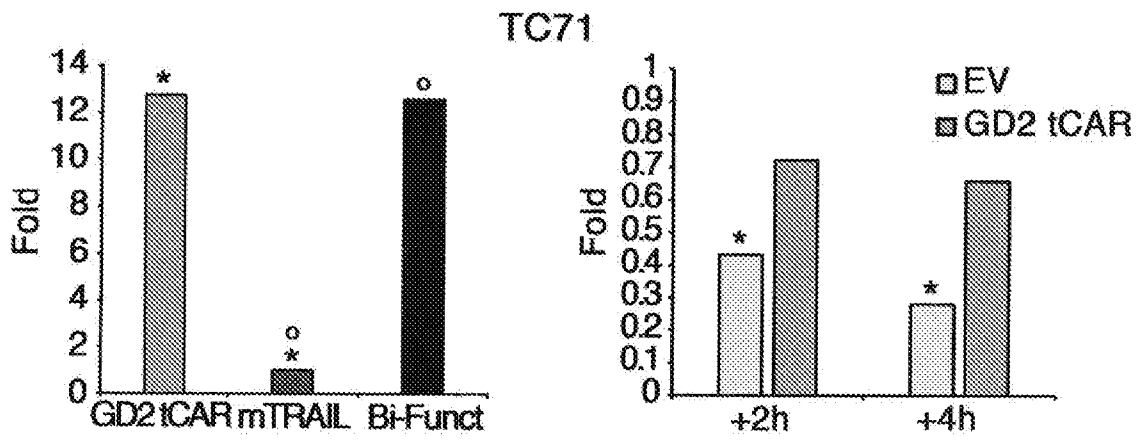
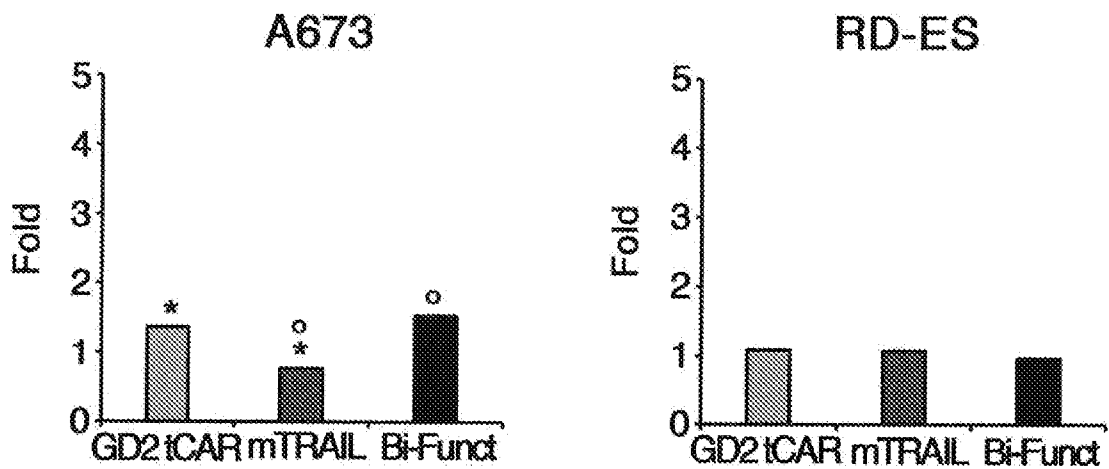


Fig. 10c



[Handwritten signature]

[Circular stamp: UNIVERSITÄT WÜRZBURG - Institut für Pharmazie und Biotechnologie]

Fig. 11a

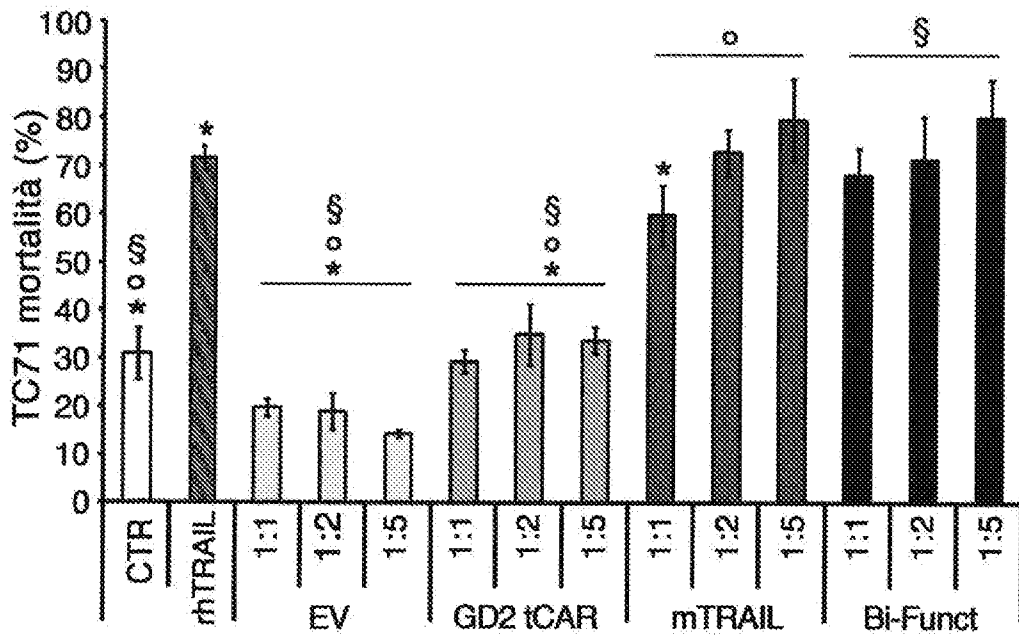
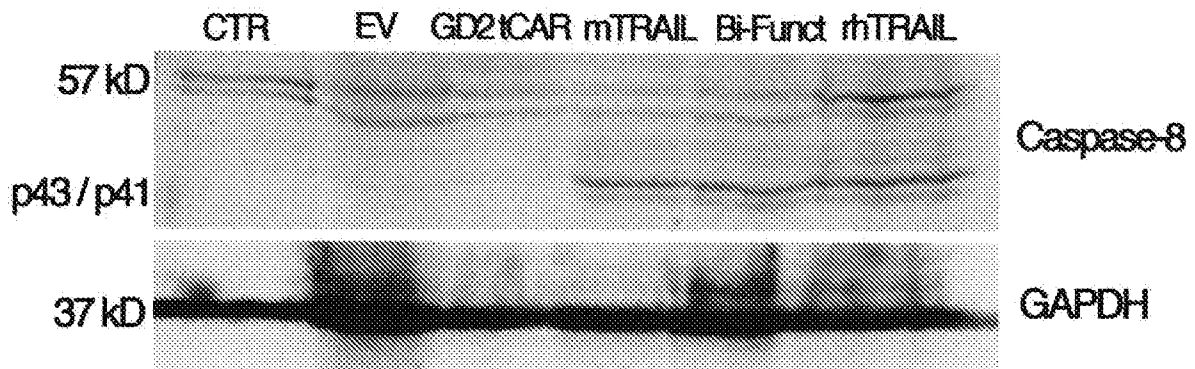


Fig. 11b

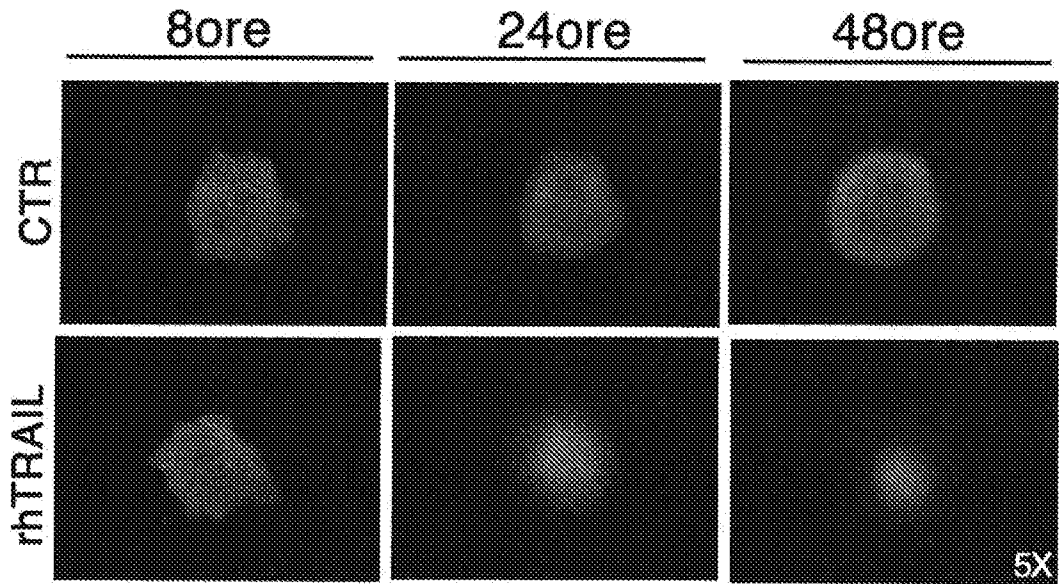


[Handwritten signature]

Ing. S. BERGAMINI
 Consulente
 in Proprietà
 Industriale
 n. 400/94
 e in Brevetti e Marchi Registrati

17/22

Fig. 12a



[Handwritten signature]

Università - INF. S. BERGAMINI
Consulente
in Proprietà
Int. Civile
n. 430/04
Pat. Brev. Patenti e Marchi

Fig.12 b

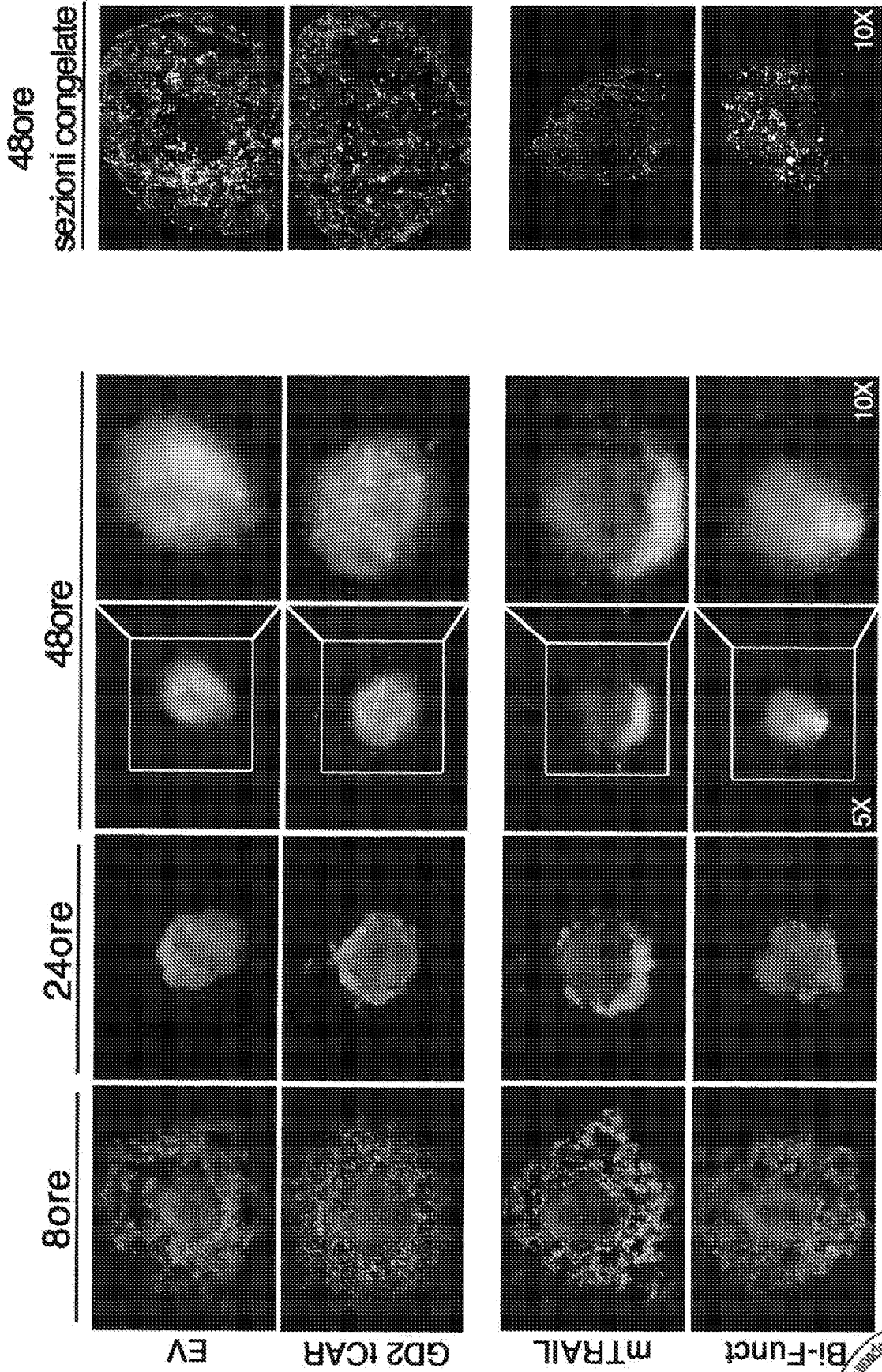
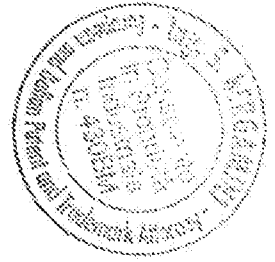


Fig. 12 b



Fig. 12c



Handwritten signature

Fig. 13

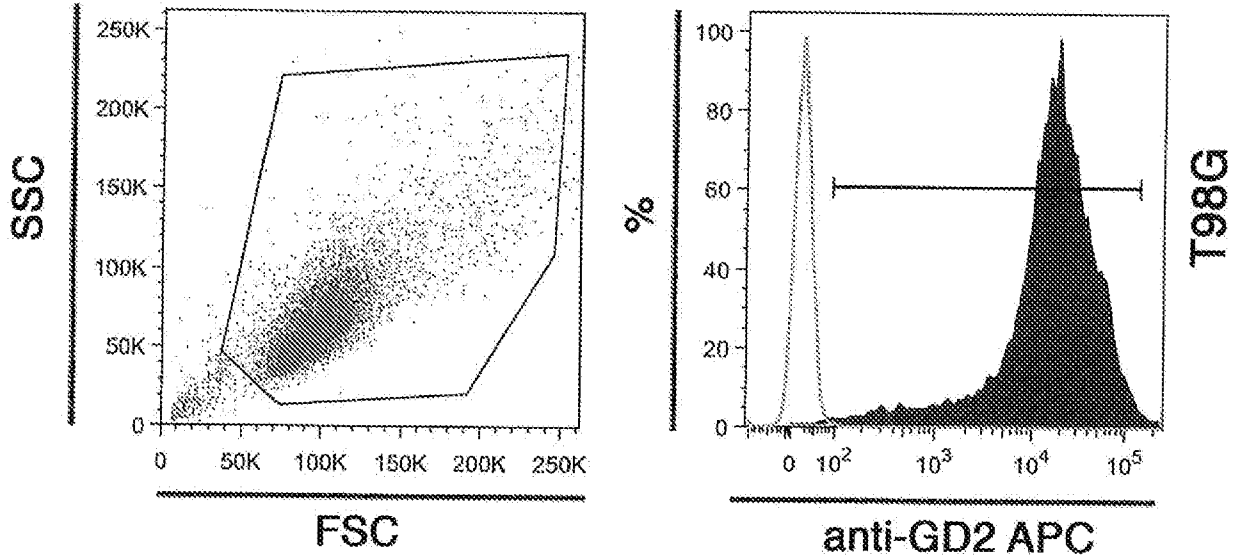
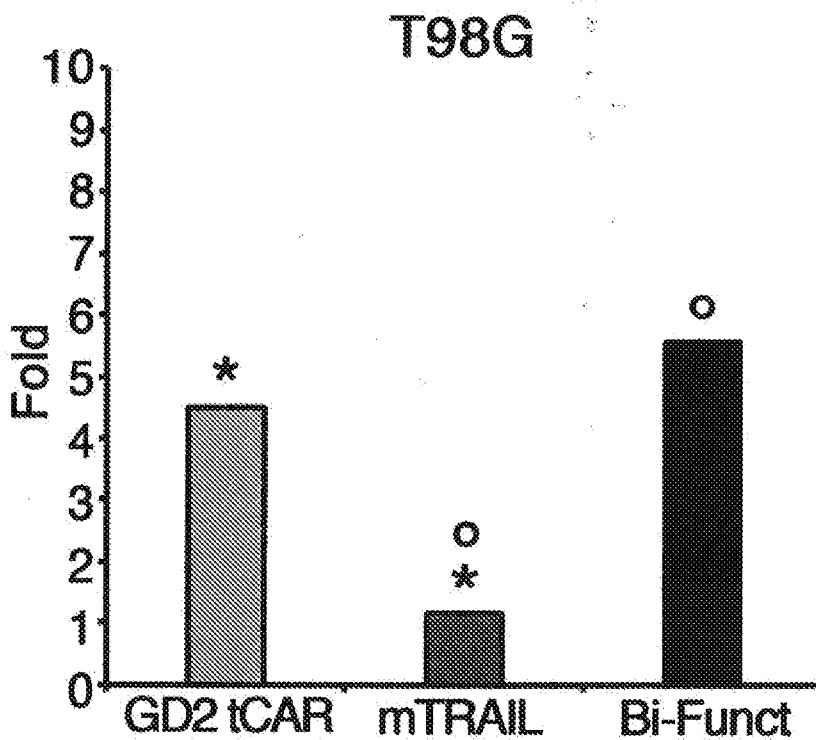


Fig. 14



Jan B. ...

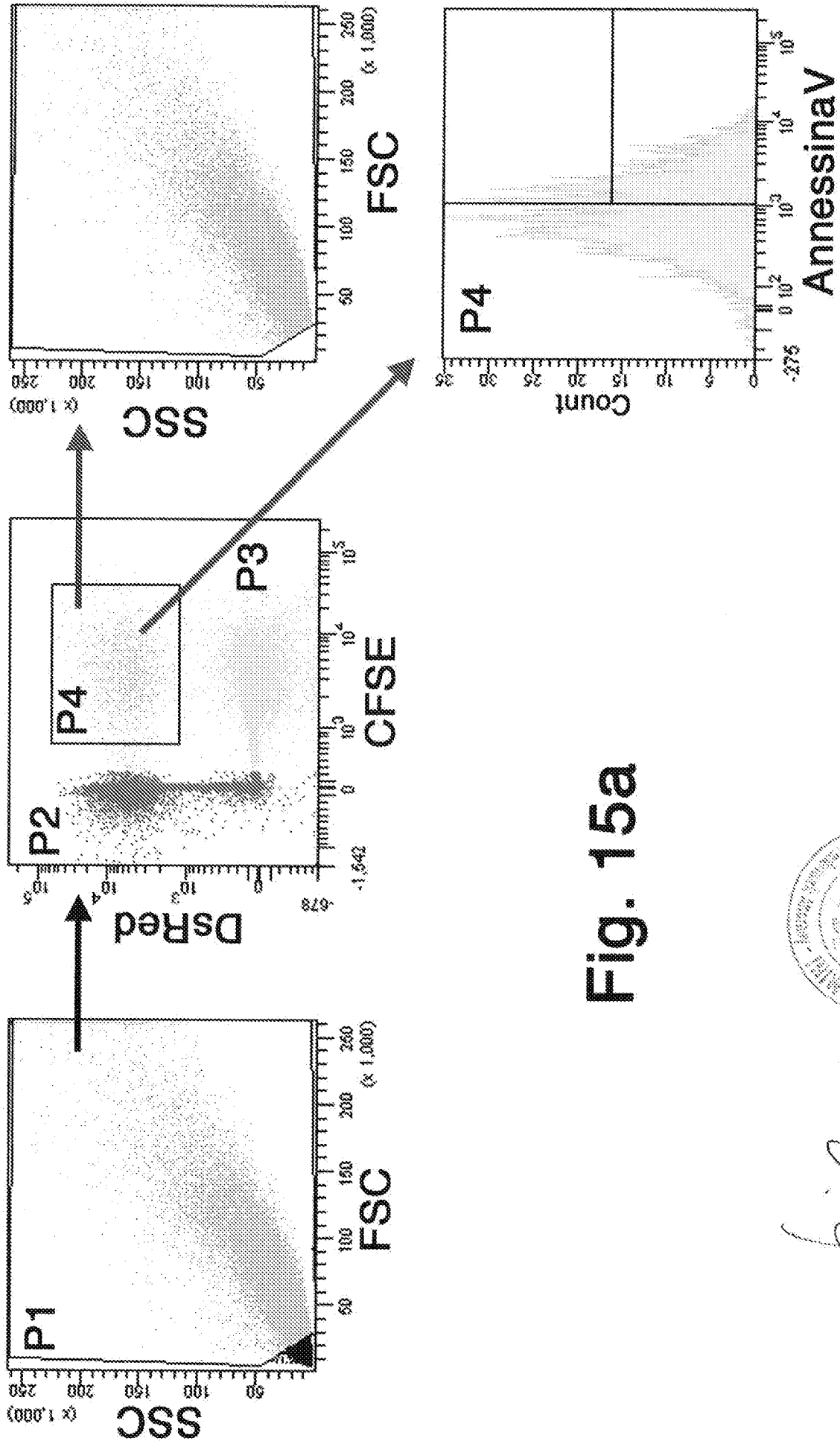
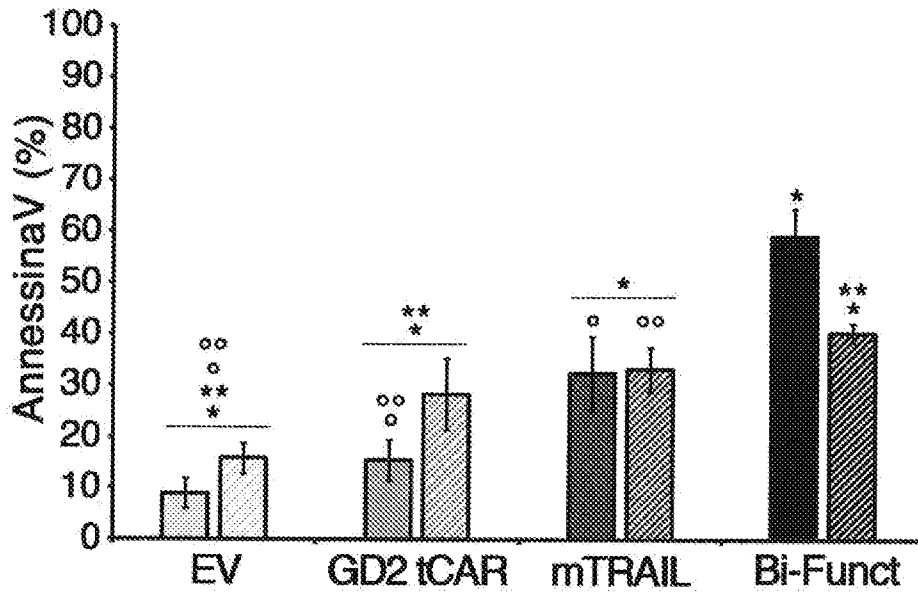


Fig. 15a

Signature

A circular official stamp of the Government of Karnataka, Department of Health and Family Welfare, Bangalore. The text around the perimeter includes "GOVERNMENT OF KARNATAKA" and "DEPARTMENT OF HEALTH AND FAMILY WELFARE, BANGALORE". The center contains a signature and some illegible text.

Fig. 15b



Handwritten signature and a circular stamp. The stamp contains the text: "FACULTY OF SCIENCE" and "UNIVERSITY OF SAUDI ARABIA".