



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900318173
Data Deposito	01/09/1993
Data Pubblicazione	01/03/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	K		

Titolo

METODO PER MARCARE CELLULE EUCARIOTE.

RM93 A 000587

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Metodo per marcare cellule eucariote"

a nome: FONDAZIONE CENTRO SAN ROMANELLO DEL MONTE TABOR

Inventori: Bordignon Claudio, Mavilio Fulvio

L'invenzione concerne un metodo per marcare cellule eucariote (di mammifero) utilizzando un recettore di superficie cellulare con un dominio intracellulare modificato come marcatore selezionabile.

L'identificazione di cellule nelle quali una sequenza di DNA è stata introdotta con successo è un passaggio essenziale nella tecnologia del DNA ricombinante. Poichè la sequenza di DNA da introdurre non produce necessariamente un fenotipo che può essere selezionato in maniera semplice, sono normalmente introdotte sequenze di DNA aggiuntive codificanti per un fenotipo selezionabile. Vi è ancora solo un numero molto limitato di tali geni marcatori selezionabili da utilizzarsi nella tecnologia del DNA ricombinante di cellule eucariote. La maggior parte di questi geni marcatori disponibili come, per esempio, la timidina chinasi del virus Herpes simplex tipo 1 (Wigler et al., Cell 1, 1977, 223) o la ipoxantino-fosforibosil

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA S.p.A.

transferasi (Jolly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1983, 477) corrispondono a geni che sono espressi in maniera costitutiva nella maggior parte delle cellule normali o sono identici a tali geni.

Pertanto, questi geni marcatori possono essere utilizzati in cellule mutanti speciali che non esprimono il gene corrispondente. Un gene marcatore preferito, d'altra parte, dovrebbe non essere espresso nella maggior parte delle cellule di mammifero o almeno non essere espresso in alcuni tessuti e tipi cellulari, in modo che essi possano essere utilizzati come geni marcatori selezionabili nella tecnologia del DNA ricombinante che coinvolge tali cellule.

Robert Fawlink et al. hanno descritto l'uso dell'antigene di superficie cellulare CD24 come un marcatore selezionabile dominante nel trasferimento genico mediato da retrovirus (Journal of Cellular Biochemistry, Supplement 17 E, pag. 203, abstract S210). Utilizzando questo marcatore, fibroblasti NIH-3T3, cellule pre-B BAF-3 così come cellule di midollo osseo murino possono essere marcate per infezione retrovirale e le cellule così marcate sono evidenziate per analisi di selezione delle cellule attivate per fluorescenza (fluorescence activated cell sorting analysis). Tuttavia, l'antigene di superficie cellulare CD24 è

ING. BAZZANO & ZUCCARDO ROMA S.p.A.

espresso normalmente su alcune cellule di mammifero, e pertanto l'uso di questo marcatore sarà limitato dalla difficoltà di discriminare tra le cellule che normalmente esprimono l'antigene di superficie cellulare CD24 e le cellule marcate con questo marcatore.

Inoltre, è stato trovato che l'antigene cellulare di superficie CD24, a seguito di espressione eterologa, è presentato sulla superficie cellulare solo in maniera minore.

E' pertanto oggetto dell'invenzione fornire un procedimento per marcare cellule eucariote, con l'uso di recettori di superficie cellulare, in modo che a mezzo di tale processo i recettori di superficie cellulare siano presentati in grande quantità sulla superficie cellulare, in cui la sensibilità della selezione e della evidenziazione delle cellule marcate può essere aumentata.

Questo scopo è ottenuto a mezzo di un processo di marcatura di cellule eucariote (di mammifero) esprimendo in queste cellule un acido nucleico, detto acido nucleico codificante un recettore di superficie cellulare, e presentando il recettore alla superficie cellulare, il processo essendo caratterizzato dall'uso di un acido nucleico in cui la regione codificante il

ING. D. L. 10.10.1974 SpA

dominio intracellulare del recettore è completamente o parzialmente deleta, o modificata in modo che il recettore presentato alla superficie non può effettuare alcuna trasduzione di segnale dopo il legame al suo ligando.

Preferibilmente, il dominio intracellulare è deletato completamente, oppure ne sono modificati ^o nucleotidi individuali.

Preferibilmente, viene utilizzato l'acido nucleico codificante per il recettore NGF-, CD24- o LDL.

La sequenza del recettore NGF, che sarà riferito d'ora in poi come "recettore per il fattore di crescita nervoso a bassa affinità, LNGFR", è descritto in D. Johnson, Cell 47, 1986, 545-554. Preferibilmente, viene utilizzato un acido nucleico in cui la regione di DNA codificante gli amminoacidi da 245 al C-terminale sono stati deleti (SEQ ID NO 1).

L'acido nucleico può essere introdotto nella cellula bersaglio, per esempio, con un vettore virale (preferibilmente retrovirale) a mezzo di lipofezione o electroporazione.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è un DNA, che codifica per un LNGFR modificato e che è illustrato in SEQ ID NO 1, così come cellule eucariote contenenti detto acido nucleico.

Sp. 1
L. 1

Un acido nucleico di questo tipo può essere utilizzato per esprimere un recettore della superficie cellulare cosí modificato, e per presentare il recettore alla superficie cellulare in modo che il recettore possa essere utilizzato come marcatore selezionabile per le cellule eucariote trasfettate.

E' anche possibile isolare le cellule marcate per immuno-selezione, introducendo tale acido nucleico in una cellula eucariote. A questo scopo, le cellule trasfettate sono identificate, selezionate con un anticorpo marcato che lega in maniera specifica il recettore utilizzato secondo l'invenzione, e isolate dissociando il complesso anticorpo-complesso cellulare.

Il DNA codificante il recettore o un derivato di questo sarà introdotto in un vettore di espressione eucariote con metodi noti nel settore. Vettori di espressione adatti sono noti agli esperti nel settore, preferibilmente sono utilizzati vettori retrovirali. Anche altri vettori virali secondo lo stato dell'arte possono essere utilizzati per il trasferimento del DNA recettore (per esempio virus herpes, adenovirus, vaccinia virus), vettori retrovirali, vettori a doppia copia (Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 1986, 3194-3198) in cui una frequenza alta di provirus riarrangiato ed un titolo significativamente più basso

ING. BARZANO & TAMARCO S.p.A.

di virus sono stati osservati. I vettori XSN virali (Bio-Techniques, 7, 1989, 980-990) sono i preferiti.

I vettori di espressione eucariotica ricombinanti sono poi introdotti nelle cellule ospite eucariote, sia da soli per un protocollo di marcatura genica, o in combinazione con altro DNA da trasdurre, ma con nessun fenotipo selezionabile. L'introduzione DNA nella cellula ospite è ottenuto con metodi di infezione virale noti nell'arte. Inoltre, il trasferimento del gene del recettore può essere ottenuto anche utilizzando metodi di trasferimento non virali (per esempio electroporazione, trasferimento liposomale, precipitazione con calcio). Le cellule che controllano il DNA esogeno possono essere poi riconosciuti per la loro capacità di produrre un recettore ad alti livelli. Le cellule ricombinanti eucariote che controllano un DNA secondo la presente invenzione possono anche essere più facilmente evidenziate per la loro capacità di produrre un derivato del recettore.

Il recettore marcatore delle cellule eucariote ottenute come sopra descritto permette una facile selezione e separazione di tali cellule utilizzando anticorpi che legano il recettore utilizzato. Tali anticorpi sono noti nel settore e descritti, per esempio, da A. Ross et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 81,

ING. BARTOLI & C. S.p.A.

1984, 6681-6685, EP-A 0202055). Inoltre, gli anticorpi per i recettori possono essere ottenuti con metodi noti nel settore immunizzando un animale con una proteina codificata dal DNA secondo la presente invenzione ed isolando gli anticorpi dal siero degli animali immunizzati, o fondendo cellule di milza degli animali immunizzati con cellule immortali, cosí come, per esempio, una linea cellulare di mieloma murino, per ottenere anticorpi monoclonali. Questi anticorpi possono essere marcati con metodi noti nell'arte (cosí come quelli descritti, per esempio, in J.H. Peters, Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, 2. Auflage, 1988, 285-315). Marcatori adatti saranno enzimi, coloranti fluorescenti o chemiluminescenti.

Utilizzando un anticorpo immobilizzato invece di un anticorpo marcato, si possono selezionare le cellule trasfettate. Pertanto, la fase solida con l'anticorpo immobilizzato contro il recettore viene utilizzata come una matrice in cromatografia di affinità. Dopo separazione delle cellule non-trasfettate che non esprimono il recettore, le cellule legate sono, per esempio, coltivate e poi espanse su piastre di petri per la notte.

I processi come sopra descritti saranno importanti specialmente come mezzi diagnostici per la

MG P.107.000/1 - 100 - S.0.A.

identificazione di cellule introdotte in un organismo mammifero a mezzo di protocolli di terapia genica. Per alcune applicazioni, come, per esempio, il trapianto di midollo osseo, è di valore diagnostico differenziare tra le cellule che originano dal trapianto di midollo osseo e le cellule che derivano dalle cellule residue dell'ospite. In questo caso, le cellule di midollo osseo che contengono il DNA che codifica per il recettore sono trapiantate per fornire cellule con un marcatore di superficie cellulare. Preferibilmente saranno trapiantate cellule progenitrici o staminali contenenti il gene secondo l'invenzione che erano state arricchite secondo lo stato dell'arte (per esempio con anticorpi immobilizzati anti-CD34). Dopo il trapianto, le cellule, specialmente quelle derivanti da cellule tumorali, possono essere differenziate tra quelle derivate dalle cellule trapiantate o quelle dalle cellule residue dell'organismo ospite.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione è pertanto l'uso del procedimento per la immunoselezione di cellule trasfettate secondo la presente invenzione per la identificazione diagnostica di cellule, che sono state marcate per trasfezione con un DNA codificante un recettore, in particolare un DNA secondo la presente invenzione.

ING. BARTANO & ZANUCCI ROMA S.p.A.

La principale applicazione della marcatura di cellule del sangue o di cellule del midollo osseo con i recettori modificati descritti sarà il monitoraggio di cellule da trapianti autologhi e anche allogenici. Nel trattamento delle leucemie e dei linfomi è spesso necessario trattare i pazienti con dosi subletali di farmaci citostatici o con dosi comparabili di irradiazione o con una combinazione di questi. Per ristabilire le funzioni del midollo osseo viene effettuato o un reimpianto di midollo osseo che era stato prelevato prima del trattamento o un impianto allogenico di midollo da un donatore compatibile per HLA.

Nel caso di trapianto di midollo osseo autologo la contaminazione di cellule tumorali nel materiale reimpiantato potrebbe condurre ad un riavvio del tumore. Metodi di selezione per purificare il midollo dalle cellule tumorali sono utilizzati, ma tali tecniche non sono affidabili al momento. Nel caso di un riavvio è ovviamente non possibile distinguere tra queste cellule tumorali potenzialmente contaminanti ed un riavvio causato da cellule residue dopo il trattamento. Nel caso di trapianti di midollo osseo allogenici il rigetto del midollo allogenico è il problema principale.

Se dopo il trapianto autologo le cellule trapiantate sono marcate con un gene e di conseguenza il prodotto genico derivato da questo che non è espresso in queste cellule, è possibile tracciare queste cellule direttamente dopo trapianto e in caso di riavvio del tumore differenziare tra cellule tumorali derivate dal materiale trapiantato e cellule tumorali residue. Questa informazione porterebbe ad una definizione molto precoce di un ulteriore trattamento basato sulla fonte di riavvio del tumore. Oltre a questo scopo diagnostico, la marcatura genica in trapianti autologhi porterebbe anche a monitorare ed a paragonare l'efficienza di diversi metodi di eliminazione di cellule tumorali in gruppi di pazienti relativamente piccoli.

Per il trapianto autologo il principale campo di applicazione sarà il monitoraggio del rigetto di cellule trapiantate.

Il protocollo clinico conterrà i seguenti passaggi:

- a) Espianto delle cellule del paziente.
- b) Depurazione delle cellule espianate secondo tecniche note nel settore.
- c) Trasduzione nelle cellule del paziente di un vettore che contiene il gene per il recettore

modificato secondo la presente invenzione.

d) Facoltativamente, l'espansione delle cellule del paziente in condizioni selettive, per esempio con G418, utilizzando l'espressione del gene per la resistenza alla neomicina codificato dal vettore contenente il gene per il recettore modificato.

e) Immunoselezione delle cellule marcate che esprimono il gene modificato e rappresentano il recettore sulla superficie delle cellule.

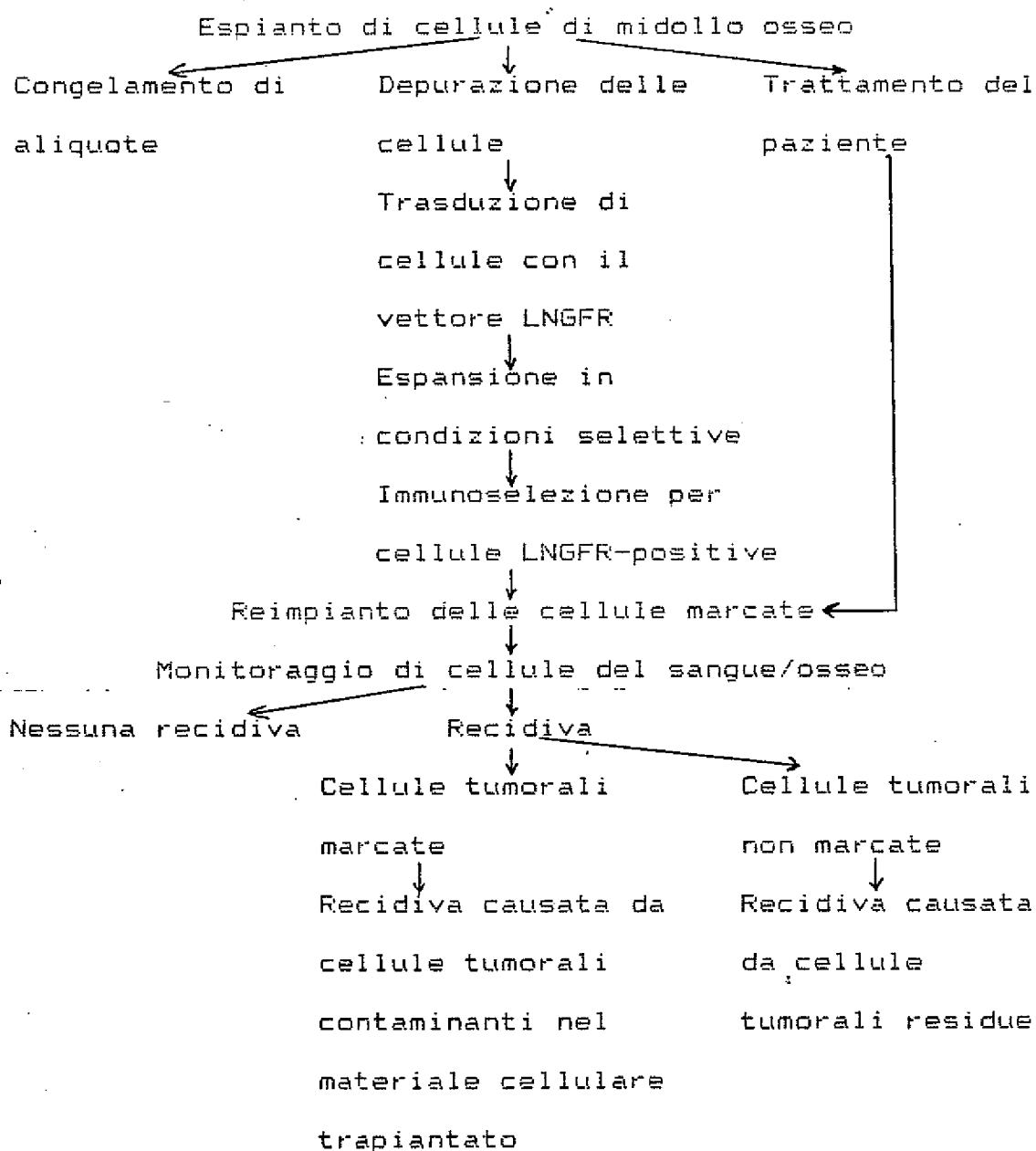
f) Reimpianto delle cellule arricchite e marcate nel paziente.

g) Monitoraggio delle cellule del sangue/midollo del paziente per il gene marcatore per analisi FACS o tecniche ELISA.

ING. BARZANO & ZAVARDO ROMA S.p.A.

DIAGRAMMA SCHEMATICO PER IL PROTOCOLLO

DI MARCATURA GENICA



ING. BARTOLO A. TOSCANO FIVIA SpA

Un gran numero di studi hanno dimostrato che i vettori retrovirali sono un mezzo efficace per il trasferimento di DNA esogeno in cellule somatiche (1). Nel sistema ematopoietico del topo, è stato ottenuto un efficiente trasferimento ed espressione genica, sia in cellule progenitrici che in cellule staminali pluripotenti, in vitro così come in vivo. Livelli minori di trasferimento genico sono stati ottenuti in progenitori ematopoietici canini e umani in coltura, nei quali sono stati dimostrati livelli significativi di espressione dei geni trasdotti (vedi riferimento 2). Il trasferimento genico mediato da retrovirus è al momento utilizzato in protocolli di terapia genica per il trattamento di malattie ereditarie e acquisite, così come la deficienza di adenosina deaminasi (ADA⁻) la immunodeficienza combinata grave (SCID) e i tumori avanzati (come riferito in 3). Sebbene vi sia stato un significativo sforzo per ottimizzare le procedure di purificazione delle cellule staminali ematopoietiche umane e per trovare le condizioni efficienti di trasferimento ed espressione genica, i linfociti da sangue periferico (PBLs) sono ancora considerati il veicolo cellulare più sicuro per la terapia genica umana.

Sono stati ingegnerizzati e utilizzati per il

ING. B. 1971/100 Sp. 1

trasferimento genico in cellule ematopoietiche umane diversi vettori retrovirali, tutti derivati dal virus della leucemia murina di Moloney (MoMLV). L'uso di diversi promotori che dirigono l'espressione del gene d'interesse, e la posizione di questa sequenza rispetto alle unità di trascrizione virale, sono stati alcuni dei parametri presi in considerazione nel generare vettori alternativi (4. 5. 6). Alcuni di questi vettori sono stati utilizzati per trasdurre cellule linfoidee umane in condizioni diverse. Linfociti umani infiltranti nei tumori (TILs) sono stati trasdotti con il vettore retrovirale NZ, con il gene per la neomicina fosfotransferasi (Neo), ed è stato dimostrato che mantenevano un fenotipo normale e le caratteristiche funzionali in vitro (7. 8). Le cellule trasdotte sono state recuperate dai siti tumorali fino a 64 giorni dopo la somministrazione delle cellule in vivo a pazienti affetti da melanoma (9). Il trasferimento genico era ottenuto in sottopopolazioni sia di cellule T umane CD4⁺ che CD8⁺ derivate da TILs e da PBLs (10). Un vettore retrovirale per l'espressione di un gene CD18 funzionale, diretto da un promotore virale LTR, ha trasdotto con successo linfociti da pazienti affetti da deficienza di adesione dei leucociti (LAD), ed ha condotto alla correzione della LAD in vitro (11).

cellula bersaglio ideale sia rappresentata dalla cellula staminale pluripotente, non vi è nessuna evidenza definitiva circa la capacità di vettori retrovirali di trasdurre tali cellule ad una efficienza adeguata, e di mantenere una espressione genica stabile nella loro progenie. I risultati di protocolli clinici in progresso basati su trasferimento genico di midollo osseo potrebbero chiarificare questi problemi a breve (1, 3, 30).

Ovviamente, il trasferimento genico potrebbe essere ottenuto più facilmente in linfociti del sangue periferico, una alternativa potenziale alle cellule di midollo osseo, almeno per i disordini congeniti e acquisiti del sistema immunitario. Tuttavia, a questo scopo, è necessario definire quale proporzione di PBLs necessitano di essere trasdotti per rappresentare l'intero repertorio immunitario, e se questo possa essere mantenuto in vivo stabilmente, entrambi prerequisiti necessari per una procedura di trasferimento genico che sia di rilevanza terapeutica. A questo scopo l'efficienza del trasferimento genico e la progettazione del vettore, che entrambi influenzano la persistenza e i livelli di espressione genica, sono dei fattori cruciali.

L'efficienza totale del trasferimento genico

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA S.p.A.

in PBLs umani è stata strettamente correlata al protocollo di infezione. Una limitata espansione cellulare a mezzo di attivazione breve di linfociti in vitro, seguita dal trasferimento genico in PBLs per esposizione dei sovranatanti cellulari produttori, provocava una limitata proporzione di cellule resistenti a G418 (circa 1% per ciclo di infezione), con una variabilità aggiuntiva introdotta dal titolo di sovranatanti del vettore. L'efficienza del trasferimento genico può essere aumentata da una espansione in vitro più estesa delle cellule bersaglio.

La nostra analisi dell'uso del repertorio di V β nella popolazione di PBLs, dopo tre cicli di infezione di PBLs con sovranatanti contenenti vettori, seguita da selezione di cellule trasdotte in G418, produceva un repertorio intatto paragonato alla popolazione di controllo originale dei linfociti non trasdotti/non selezionati. Questi dati suggeriscono che una limitata espansione di cellule bersaglio e l'uso di sovranatanti contenenti vettori producono un adeguato trasferimento genico, in maniera indipendente dalla relativa bassa frequenza di trasferimento genico, almeno quando i sovranatanti dei vettori hanno dei buoni titoli virali ($> 5 \times 10^5$). Tuttavia, titoli virali bassi in sovranatanti di vettori producono repertori limitati di

ING. BARZANO & C. S.p.A.

$\text{V}\beta$. Ciò è stato confermato da analisi per "Southern blot" del riarrangiamento della catena $\text{TCR-}\beta$, che ha mostra uno schema oligoclonale nella popolazione trasdotta/selezionata. Pertanto, abbiamo tentato di superare questa limitazione per co-coltura di PBLs con cellule producenti vettori irradiate. In maniera indipendente dal titolo virale, questa procedura di trasferimento genico è significativamente più efficace, almeno un ordine di grandezza. Prendendo vantaggio dalla alta efficienza di trasferimento genico per co-coltivazione e espressione di LNGFR su linfociti trasdotti, abbiamo messo a punto un protocollo semplice che coinvolge la co-coltivazione e la immunoselezione che permetta la produzione di cellule trasdotte in maniera omogenea.

In considerazione del fatto che i protocolli di co-coltura sono ancora considerati non sicuri per uso clinico, abbiamo progettato condizioni di co-coltura in cui le cellule producenti i vettori e le cellule PBLs sono mantenute separate a mezzo di una membrana porosa, che permette il passaggio del virus mentre evita il contatto cellula-cellula. Nelle nostre mani, questa procedura non ha mostrato una sufficiente consistenza e riproducibilità di frequenze di infezione in esperimenti seriali. Tuttavia, questo approccio può offrire alcuni

vantaggi quando paragonato all'infezione con il sovrannatante.

Un'analisi per doppia immunofluorescenza di cellule T selezionate in G418 per la coespressione di LNGFR e di diversi marcatori di superficie delle cellule T ha mostrato una suscettibilità simile di tutte le subpopolazioni saggiate con una efficienza apparentemente uguale di trasferimento genico. Inoltre, abbiamo ottenuto una sporadica, sebbene significativa evidenza di trasferimento genico in cellule immature, CD4⁺/CD8⁺. Abbiamo già mostrato il trasferimento genico mediato da vettore retrovirale in progenitori delle cellule T prima del riarrangiamento TCR(¹³). I dati attuali confermano ulteriormente la conclusione che l'infezione retrovirale di PBMCs permetta il trasferimento genico nei progenitori circolanti ad una frequenza bassa ma evidenziabile. Questo potrebbe essere un vantaggio aggiuntivo dei protocolli di trasferimento genico che comportino una coltura a breve termine in vitro ed una espansione limitata dei linfociti bersaglio.

Infine, l'influenza del costrutto del vettore sull'efficienza del trasferimento genico e sull'espressione è stata analizzata nei seguenti studi. Nei costrutti vettoriali utilizzati, il gene di

ING. BAZZANO & TAMARCO ROMA SpA

riferimento è stato alternativamente posto all'interno dell'unità di trascrizione retrovirale sotto il controllo di promotori interni di SV40 o di HSV-TK (NSV-N e NTK-N rispettivamente), con LTR virali di MoMLV (LNSN), o al di fuori della unità di trascrizione retrovirale sotto il controllo del promotore umano ADA (il vettore a "doppia copia" DCN). L'uso di un recettore di superficie - LNGFR - come gene di riferimento ha permesso lo studio dei livelli di espressione genica in diverse subpopolazioni di PBL, con una risoluzione a singola cella.

I titoli virali ottenuti per diversi vettori nei cloni produttori selezionati sono stati comparabili, con l'eccezione delle cellule produttori DCN che in maniera consistente producevano titolo fino a cinque volte più bassi di quelli per gli altri tre vettori, suggerendo che la extra sequenza nelle LTR virali possa ridurre l'efficienza di trasduzione, probabilmente interferendo con il processo di trascrizione inversa/integrazione. Ciò è anche indicato dalla tendenza relativamente alta di DCN a integrarsi come provirus riarrangiato, che riduce ulteriormente l'efficienza di trasferimento genica totale che può essere ottenuta con questo tipo di vettore. Se ciò dipenda dalle caratteristiche intrinseche della sequenza

ING. BARTOLINI / CON RINA SpA

di cDNA LNGFR é da determinare. Riarrangiamenti dei provirus integrati sono stati osservati con frequenze molto basse per gli altri tre vettori.

I livelli di espressione genica dimostrano che i vettori basati sulle unità di trascrizione interne erano i meno efficienti in termine sia di accumulo di mRNA che di espressione delle proteine. La sola eccezione era il livello molto alto di trascritti generati dal promotore di SV40 all'interno di due diversi vettori (NSV-N e LNSN) nella linea di cellule B RIM infettata con EBV. Ciò può essere dovuto alla interazione delle proteine di EBV attivanti in trans con l' "enhancer" di SV-40. Al contrario, i vettori basati sulle LTR di MoMLV e sul promotore umano ADA per l'espressione del gene di riferimento funzionavano molto efficientemente in tutte le linee ematopoietiche. Un'analisi delle linee e dei cloni di cellule T ha dato essenzialmente gli stessi risultati. Sia i vettori LNSN che DCN erano molto efficaci nella direzione di alti livelli di espressione genica in tutte le subpopolazioni di cellule T, comprese progenitori immaturi, e mantenevano questi livelli non alterati per un alto numero di passaggi.

In conclusione, il vettore retrovirale basato su LTR é probabilmente il più affidabile ed efficace per

Fig. 10.17. Risultati di espt. SDA

il trasferimento genico e l'espressione in PBLs umani, mentre il vettore DCN, sebbene molto buono per l'espressione genica, provoca generalmente un'efficacia di trasferimento genico bassa sia a causa del basso titolo che della tendenza di riarrangiamenti genomici. Questo tipo di costrutto, tuttavia, potrebbe essere il vettore di scelta quando un'espressione genica tessuto-specifica, inducibile, o in qualche altro modo indipendente da LTR sia un requisito obbligatorio, o anche in tessuti in cui vi potrebbe essere una inattivazione di LTR. Sebbene non siano stati indagati questi aspetti nel presente studio, le cellule staminali ematopoietiche umane potrebbero essere tra questi tessuti, per analogia con quello osservato nel sistema ematopoietico murino.

L'uso di un gene codificante per una molecola di superficie cellulare come marcatore di cellule dopo trasferimento mediato da vettore retrovirale rappresenta chiaramente un importante vantaggio rispetto ai vettori utilizzati in esperimenti di marcatura genica precedenti che utilizzano un gene marcatore, normalmente il gene NeoR, non espresso sulla membrana cellulare. Questo tipo di vettore dovrebbe rappresentare un vantaggio potenziale per studi in vivo preclinici e clinici di marcatura cellulare.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Miller AD: Human gene therapy comes of age. Nature 357: 455, 1992
- 2) Karlsson S: Treatment of genetics defects in hematopoietic cell function by gene transfer. Blood 78: 2481, 1991
- 3) Anderson WF: Human gene therapy. Science 256: 808, 1992
- 4) Gilboa E, Eglitis MA, Kantoff FW, Anderson WF: Transfer and expression off cloned genes using retroviral vectors. Biotechniques 4: 504, 1986
- 5) Miller AD, Rosman GJ: Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques 7: 980, 1989
- 6) Hantzopoulos PA, Sullenger BA, Ungers G, Gilboa E: Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3519, 1989
- 7) Kasid A, Morecki S, Aebersold P, Cornetta K, Culver K, Freeman S, Director E, Lotze MT, Blaese RM, Anderson WF, Rosenberg SA: Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. Proc: Natl. Acad. Sci. USA 87: 473, 1990

SpA
1990. 6/10/90 11:20:00

8) Culver K, Cornetta K, Morgan R, Morecki S, Aebersold P, Kasida A, Lotze M, Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese RM: Lymphocytes as cellular vehicles for gene therapy in mouse and man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3155, 1991

9) Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Merini MJ, Culver K, Miller AD, Blaese RM, Anderson WF: Gene transfer into humans immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumorinfiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. New Eng. J. of Med. 323: 570, 1990

10) Morecki S, Karson E, Cornetta K, Kasid A, Aebersold P, Blaese RM, Anderson WF, Rosenberg SA: Retrovirus-mediated gene transfer into CD4+ and CD8+ human T cell subsets derived from tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood monuclear cells. Cancer Immunol. Immunother. 32: 342, 1991

11) Wilson JM, Ping AJ, Krauss JC, Mayo-Bond L, Rogers CE, Anderson DC, Todd IRT: Correction of CD18-deficient lymphocytes by retrovirus-mediated gene transfer. Science 248: 1413, 1990

12) Ferrari G, Rossini S, Giavazzi R, Maggioni D, Nobili N, Soldati M, Ungers G, Mavilio F, Gilboa E, Bordignon C: An in vivo model of somatic cell gene

therapy for human severe combined immunodeficiency.
Science 251: 1363, 1991

13) Ferrari G, Rossini S, Nobili N, Maggioni D, Garofalo A, Giavazzi R, Mavilio F, Bordignon C: Transfer of the ADA gene into human ADA-deficient T-lymphocytes reconstitutes specific immune function. Blood 80: 1120, 1992

14) Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E: Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. Cell 63: 601, 1990

15) Lee TC, Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E: Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells. New Biol. 4: 66, 1992

16) Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Seghal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M: Expression and structure of the human NGF receptor. Cell 47: 545, 1986

17) Keller G, Paige C, Gilboa E, Wagner EF: Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. Nature 318: 149, 1985

18) Wiginton DA, Kaplan DJ, States JC, Akeson AL, Perme CM, Bilyk IJ, Vaughn AJ, Lattier DL, Hutton JJ: Complete sequence and structure of the gene for

human adenosine deaminase. Biochem. 25: 8234, 1988

19) Mann R, Mulligan RC, Baltimore D:
Construction of a retrovirus packaging mutant and its
use to produce helper-free defective retrovirus. Cell
33: 153, 1983

20) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:
Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. 1989.

21) Miller AD, Buttimore C: Redesign of
retrovirus packaging cell lines to avoid recombination
leading to helper virus production. Mol. Cell. Biol. 6:
2895, 1986

22) Southern PJ, Berg P: Transformation of
mammalian cells to antibiotic resistance with a
bacterial gene under control of the SV40 early region
promoter. J. Mol. Appl. Genet. 1: 327, 1982

23) Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP,
Aleksander I, Mak TW: A human T cell-specific c DNA
clone encodes a protein having extensive homology to
immunoglobulin chains. Nature 308: 145, 1984

24) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ,
Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic
acid from sources enriched in ribonuclease. Biochem. 18:
5294, 1979

25) Thomas PS: Hybridization of denatural RNA
and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.

W.G. B. 8187-000 2 7-10-1980 RDM: SpA

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980

26) Chomczynski P, Sacchi N: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry 162: 156, 1987

27) Loh EY, Elliot JF, Cwirla S, Lanier LL, Davis MM: Polymerase single-sided specificity: analysis of T cell receptor chain. Science 243: 217, 1989

28) Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J: Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86: 8941, 1989

29) Rosenberg WMC, FAH Moss, Bell JL.: Variation in human T cell receptor $V\beta$ and $J\beta$ repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. Eur. J. Immunol. 22: 541, 1992

30) Bordignon C: A clinical protocol for transfer of the ADA gene into bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes for the treatment of patients affected by ADA deficient SCID. Human Gene Therapy (in press).

TABELLA 1. Analisi per FACS dell'espressione di LNGFR in linee cellulari ematopoietiche umane trasdotte con quattro vettori retrovirali.

LINEA CELLULARE	VETTORE RETROVIRALE			
	NSV-N	NTK-N	LNSN	DCN ^b
K562	++	+	+++	++
KG1	++	++	++	+++
RAJI	++	+	++	-
DAUDI	++	++	+++	+++
RIM	+++	++	++	+++
MOLT-4	+	-	++	++
J.M.	++	++	+++	+++

* L'espressione quantitativa di LNGFR era misurata come: -, 0 unità arbitrarie (a.u.) di intensità media relativa di fluorescenza, +, 0-50 a.u., ++, 50-100 a.u., +++, 100-200 a.u.. Il valore medio relativo della linea cellulare di melanoma A875, esprimente circa 10^6 recettori per cellula, era di 190 a.u..

^b I profili per FACS delle cellule K562, Duadi, RIM e J.M. erano bifasici, e la misura si riferisce solo al picco positivo (vedi risultati).

ING. BARTANO & ZANARDI ROMA S.p.A.

1906. 15th Nov 1910. S.P.A.

Sono mostrate le mappe schematiche dei genomi provirali integrati di NSV-N (A), NTK-N (C), LNSN (E) e DCN (G), indicanti i promotori interni di SV40 (SV), HSV-TK (TK) e di ADA umano (ADAp). I siti di restrizione Xba I e Hind III (H) sono indicati.

Figura 2. Analisi per Southern blot dell'integrazione dei quattro vettori retrovirali (A-D) in digeriti con Xba I di DNA di K562 (1), KG 1 (2), Raji (3), Daudi (4), RIM (5), MOLT-4 (6) e J.M. (7), ibridate con una sonda Neo. Sono indicate le bande che corrispondono a provirus integrati intatti, cosí come il loro peso molecolare (in kb). Le bande di riarrangiamento sono indicate con frecce.

Figure 3a e 3b. Costrutti vettoriali diversi.

Vettori retrovirali

— 31 —

interamente codificante del cDNA del LNGFR umano (¹⁶). I vettori NSV-N e NTK-N sono stati ottenuti per clonaggio del cDNA di LNGFR nei siti unici Hind III e Bgl II dei vettori NSV e NTK rispettivamente. Il vettore NSV è stato derivato dal vettore originale N2 (¹⁷) per inserzione del frammento di 0.4 kb Kpn I/Hind III contenente il promotore "enhancer" precoce di SV40 e l'origine di replicazione nel sito di clonaggio unico Xho I. Il vettore NTK era anche derivato da N2 per inserzione di 852 bp del promotore per la timidina chinasi (TK) del virus Herpes Simplex (HSV). Entrambi i vettori erano dati da E. Gilboa.

Il vettore LNSN è stato costruito per inserzione del cDNA di LNGFR nel sito Hpa I del vettore LXS_N (⁸).

Nel vettore DCN (LNGFR a doppia copia) il cDNA per LNGFR era clonato sotto il controllo del frammento di 0.8 kb Ssp I/Nco I del promotore della adenosina deaminasi (ADA) umana (¹⁸) nei siti Bgl II/Sna BI del polilinker del vettore retrovirale N2A (⁹).

I diversi costrutti dei vettori sono mostrati nelle figure 3a e 3b.

I DNA dei vettori sono stati convertiti nei corrispondenti virus per protocollo di transinfezione. In breve, il DNA del vettore è stato trasfettato nella

linea cellulare di assemblaggio ecotropica $\Psi 2$ ⁽¹⁹⁾ per coprecipitazione standard con calcio fosfato ⁽²⁰⁾. 48 ore dopo la trasfezione, i sovranatanti di $\Psi 2$ sono stati raccolti e utilizzati per infettare la linea cellulare PA317 di assemblaggio anfotropica ⁽²¹⁾ per 16 ore in presenza di 8 $\mu\text{g/ml}$ di polibrene. Le cellule infettate PA317 sono state selezionate in terreno DMEM (GIBCO, Grand Island, NY) supplementato con 10% FCS (Hyclone, Logan, UT) e contenenti 0.8 mg/ml G418 (GIBCO), e poi utilizzate per generare sovranatanti contenenti virus, liberi da virus helper con titoli che raggiungevano da 10^4 a 5×10^5 cfu/ml. Tutti i vettori contengono il gene NeoR codificante per la neomicina fosfotrasferasi, che conferisce una resistenza in vitro all'analogo della neomicina G418.

Infezione delle linee cellulari ematopoietiche

Tutte le linee cellulari descritte in questo studio, con l'eccezione di RIM e di J.M., sono state ottenute da ATCC, e cresciute in terreno RPMI 1640 (GIBCO) supplementato con FCS 10%. Le linee K562 E KG1 sono linee cellulari mieloidi, derivate rispettivamente da leucemie mielogeniche croniche e acute, le linee Raji e Daudi sono derivate da due linfomi di Burkitt; la linea MOLT-4 è considerata una linea cellulare di leucemia di cellule T stabile (CD8^+); la linea RIM è una

linea cellulare linfoblastoide trasformata con EBV; la linea J.M. è una linea cellulare linfoblastoide T CD4⁺/CD8⁺; la linea cellulare A875 è una linea cellulare di melanoma umano che esprime circa 10⁴ LNGFR per cellula.

5x10⁵ cellule bersaglio sono state infettate per 16 ore con sovranatanti virali non diluiti contenenti 8 g/ml di polibrene, cresciute per 24 ore aggiuntive in terreno completo e poi selezionate in presenza di una dose predeterminata di G418 (da 0.5 a 1.5 mg/ml). Analisi ulteriori sono state effettuate su colture di cellule selezionate in G418.

Infezione di linfociti umani

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state ottenute da donatori sani per separazione su gradiente Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Svezia) e cresciute per 72 ore sotto stimolo di fitoemoagglutinina (PHA) e interleuchina-2 umana ricombinante (hu-rIL2) (2 µg/ml di PHA purificata, Wellcome, Labs., Dartford, UK; 100 U/ml di hu-rIL2, Roche, Nutley, NY). L'infezione virale era effettuata per esposizione di PBLs stimolati ad un campione virale a cellulare per 6 ore in presenza di polibrene (8 µg/ml). 48 ore dopo l'infezione, le cellule PBLs erano selezionate in terreno RPMI 1640 supplementato con

MG. R427-110 & Z44720 ROMA SpA

2 mM L-glutamina, 1% aminoacidi non essenziali, 1% sodio piruvato, 5% siero umano (HS) e 100 U/ml di hu-rIL2 (terreno completo), contenente 0.4 mg/ml di G418. La densità cellulare era mantenuta costante (5×10^5 cellule/ml) durante 2 settimane di selezione con G418. I linfociti T umani trasdotti dal retrovirus erano anche clonati in piastre di Terasaki a differenti concentrazioni cellulari ($1-10^5$ cellule per pozzetto) in terreno completo contenente 0.4 mg/ml di G418, in presenza di PBLs umani irradiati come cellule di nutrimento.

Per migliorare l'efficacia di infezione retrovirale, i PBLs umano sono stati co-coltivati con cellule producenti virus per 48-72 ore in terreno completo. La co-coltivazione era effettuata in piastre Transwell (Costar, Cambridge, MA) per prevenire il contatto cellula-cellula. 3×10^5 cellule producenti sono state seminate in pozzetti di piastre a 6 pozzetti e incubate a 37°C per la notte. 5×10^5 PBLs stimolati sono stati aggiunti ai pozzetti Transwell e cresciuto per 48-72 ore in presenza di 8 $\mu\text{g/ml}$ polibrene.

Le cellule trasdotte retrovirali sono state analizzate per citometria a flusso per l'espressione del recettore e espanse per analisi ulteriori.

Analisi del DNA

Si otteneva DNA ad alto peso molecolare dalle cellule per standard estrazione fenolo/cloroformio (20), e si digeriva estensivamente in aliquote di 5 µg con enzimi di restrizione appropriati (GIBCO-BRL), si effettuava una elettroforesi in 0.8% gel di agarosio a 1.5 V/cm in tampone tris-acetato-EDTA, e si trasferiva ad una membrana di nylon (Hybond-N, Amersham, Buckinghamshire, UK) per trasferimento capillare Southern (20) e si ibridizzava con una sonda marcata con ³²P a 10⁷ dpm.

Le sonde di DNA erano dei frammenti di 1.2 Kb Hind III/Sma I di pSV2-neo(22) e il frammento Hinc II 3' del clone YTJ-2 di cDNA, contenenti la regione costante del TCR-β umano (23). I filtri erano lavati in condizioni di alta stringenza ed esposti a pellicole Kodak X-AR a -70°C.

Analisi del RNA

L'RNA totale cellulare era estratto con la tecnica del guanidina isotiocianato (24) e selezionato per poli(A)+ su cromatografia di oligo (dT)-cellulosa (20). 5 µg di RNA poli(A)+ sono stati frazionati per dimensioni su gel 1% di agarosio in formaldeide, trasferiti su una membrana di nylon per trasferimento capillare Northern (25), e ibridizzati, lavati e esposti come descritto per i trasferimenti Southern. Le sonde di

DNA erano il frammento di 1.2 Kb Hind III/Sma I di pSV2-neo e il frammento di 1.5Kb Sst I del cDNA di LNGFR (14).

Fenotipizzazione della superficie cellulare

L'espressione sulla superficie cellulare di LNGFR era monitorata per citometria a flusso utilizzando l'anticorpo monoclonale murino anti-LNGFR umana 20.4 (ATCC) con un metodo di marcatura per fluorescenza indiretta. Il fenotipo della superficie cellulare delle linee linfocitiche T e dei cloni era determinato per citometria a flusso utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con PE anti-CD4 (T4), CD8 (T8), CD5, B4, CD25R, Leu7, Cd34 umano (Coulter Immunology, Hialeah, FL). In breve, 5×10^5 cellule erano colorate con 100 μ l di anticorpi diluiti a 4°C per 30 minuti, lavate due volte in terreno senza FCS e risospese in 0.5 ml di PBS per analisi FACS o in 100 μ l di anticorpo secondario coniugato con FITC diluito. L'analisi per doppia colorazione era effettuata per incubazione sequenziale di anticorpi coniugati con FITC e con PE.

Analisi dell'uso della catena V β TCR

L'RNA totale era estratto da linee cellulari PBL e T utilizzando GTC, (26) trascritti inversamente in cDNA utilizzando code di oligo dT e di oligo dG, (27) ed un ventesimo del DNA ottenuto era utilizzato per PCR con

ING. PARTANO & ZANUCCI ROMA SpA

uso di oligonucleotidi specifici $V\beta$ - $C\beta$ (28) e con un oligonucleotide $C\beta$ specifico (5'-TGCTGACCCCACTGTCGACCTCCTTCCCATT-3'), come descritto nel riferimento 27.

I cicli di amplificazione di PCR erano effettuati a 94°C per 45", 57°C per 45", e 72°C per 1'. Il prodotto amplificato era purificato su gel e clonato nel vettore plasmidico bluescript. Le colonie positive per $C\beta$ erano replicate su diverse piastre e trasferite su filtri di cellulosa e ibridizzate con oligonucleotidi $V\beta$ specifici (28, 29) nelle seguenti condizioni: 6 x in SSC, 1% blotto, 0.1% SDS e 5mM EDTA a 42°C per 3-6 ore, erano lavati per 1 ora alla stessa temperatura in 6 x SSC ed esposti per 6-12 ore ad una pellicola a raggi X a temperatura ambiente.

RISULTATI

Generazione di retrovirus ricombinanti per l'espressione del LNGFR

Sono stati sviluppati quattro diversi costrutti retrovirali per l'espressione di LNGFR e utilizzati per la generazione di linee cellulari producenti virus. I costrutti NSV-N (figura 1A) e NTK-N (figura 1C) sono basati su promotori interni, che dirigono la espressione del cDNA di LNGFR, cioè il promotore precoce di SV40 e il promotore HSV-TK,

VdS: inv. submit - 6/11/2014 10:11

rispettivamente. Nel vettore LNSN (figura 1E), il gene LNGFR è espresso dal LTR virale. Nel costrutto DCN (figura 1G) il cDNA LNGFR è sotto il controllo del promotore ADA umano, nella regione U3 del LTR 3'. Dopo infezione delle cellule bersaglio, il gene trasdotto è duplicato e trasferito al 5' LTR (*), generando così un provirus contenente due copie del minigene ADA-LNGFR. Tutti i vettori portano il gene NeoR, sotto il controllo o di LTR virale (NSV-N, NTK-N e DCN) o del promotore precoce SV40 (LNSN).

I quattro vettori sono stati utilizzati per trasdurre il gene LNGFR nelle linee cellulari ematopoietiche umane di differenti derivazioni e in PBLs umani, e mostrano: i) capacità di trasdurre le cellule bersaglio umane, ii) integrazione e stabilità dei provirus intatti e iii) espressione del gene di riferimento. Il titolo virale delle linee cellulari produttrici anfotropiche va da 1×10^4 a 5×10^5 cfu/ml per i vettori NSV-N, NTK-N e LNSN, e da 5×10^3 a 1×10^4 cfu/ml per il vettore DCN.

Analisi molecolare della integrazione virale nelle linee cellulari ematopoietiche umane

Per un esame iniziale dei diversi vettori, sono state utilizzate diverse linee cellulari tumorali di origine emato-linfopoietica come cellule bersaglio

per il trasferimento genico. Due linee cellulari mieloidi (K562 e KG1), due linfoma di Burkitt (Raji e Daudi), ed una linea cellulare linfoblastoide trasformata da EBV (RIM), e due linee cellulari linfoblastoidi (MOLT-4 e J.M.) sono state trasdotte con i quattro vettori retrovirali e selezionate in presenza di G418. Un'analisi molecolare delle integrazioni retrovirali è stata effettuata per trasferimento Southern. I DNA genomici sono stati digeriti con Xba I, che taglia sia al 5' che al 3' delle LTR di tutti i vettori (figura 1), permettendo l'evidenziazione delle dimensioni dei provirus integrati, e con Bgl II, che taglia solo nei DNA genomici, permettendo una stima del numero di siti di integrazione. I DNA digeriti con Xba I e con Bgl II sono stati ibridizzati sequenzialmente con sonde specifiche per i geni NeoR e LNGFR.

L'integrazione del vettore NSV-N ha generato una singola banda Xba I della dimensione attesa di 5.1 kb, corrispondente ad un provirus intatto, in tutte le linee cellulari selezionate in G418 (figura 2A). Nelle cellule Raji una banda aggiuntiva di dimensione minore è stata osservata, indicando l'integrazione di un provirus riarrangiato (figura 2A, colonna 3). In maniera simile, la digestione con Xba I ha generato una singola banda della dimensione attesa di 5.4 kb nei DNA da tutte e

quattro le linee cellulari infettate NTK-N (figura 2B). Una banda aggiuntiva, probabilmente dovuta alla presenza di provirus riarrangiato, è stata evidenziata solo nel campione RIM (figura 2B, colonna 5). Una singola banda di 4.3 kb è osservata in tutti i campioni trasdotti con il vettore LNSN con nessuna evidenza di riarrangiamenti virali (figura 2C). Al contrario, il quadro delle integrazioni virali nel DNA da cellule infettate con DCN è caratterizzato da frequenti riarrangiamenti (figura 2D). Tutte le linee cellulari trasdotte con DCN mostrano la presenza di una banda di 5.4 kb, corrispondente al provirus intatto, ma anche di una banda aggiuntiva di 3.2 kb in tutte eccettuata 1 (KG1) le linee cellulari. La proporzione relativa delle due bande era variabile nei campioni analizzati, variando da una predominanza del provirus intatto (MOLT-4, figura 2D, colonna 6) ad una prevalenza di quella riarrangiata (Raji, figura 2D, colonna 3). Infezioni ripetute con lo stesso campione retrovirale hanno indicato che la proporzione tra provirus intatto e riarrangiato è un evento casuale, non cellula-specifico.

Come osservato per le linee cellulari trasdotti da tutti gli altri vettori, il quadro con Bgl II ha mostrato che l'infezione con DCN genera un'integrazione policlonale in tutte le linee cellulari.

Sp. 3
ING. B. 11/10

Per chiarire la natura del meccanismo responsabile per la generazione di provirus riarrangiato, abbiamo effettuato digestioni aggiuntive di DNA genomici con Hind III, che taglia due volte nel minigene ADA-LNGFR seguita da ibridazione con la sonda LNGFR. L'analisi comparativa dei quadri di restrizione con Xba I e con Xba I/Hind III con entrambe le sonde hanno indicato che la banda di 3.2 kb corrispondeva ad un provirus riarrangiato mancante del minigene ADA-LNGFR da entrambe le LTR. I provirus difettivi sono stati anche evidenziati ad alta frequenza durante la selezione delle linee cellulari producenti DCN. Il clone utilizzato in tutti i nostri esperimenti portava solo il provirus intatto, indicando che la generazione di provirus difettivi avviene durante l'integrazione nelle cellule bersaglio, e non è dovuta a difetti della linea cellulare produttiva.

Riassumendo, l'infezione di tutte le linee cellulari con NSV-N, NTK-N e LNSN ha dato luogo a popolazioni resistenti a G418 che portano poche copie di provirus principalmente non riarrangiato, mentre l'infezione con il vettore DCN ha generato un provirus comunemente riarrangiato ad alta frequenza, molto probabilmente derivato dalla perdita del minigene ADA-LNGFR dal LTR 3' del vettore retrovirale durante il

processo di integrazione. Questo problema può essere dovuto alla dimensione e alla natura del gene inserito nella LTR virale, limitazioni simili con altri costrutti vettoriali a "doppia copia" non sono stati osservati (12-14).

Espressione mediata da vettore di LNGFR in linee cellulari ematopoietiche umane

L'espressione del LNGFR trasdotto in differenti vettori retrovirali è stata valutata sia a livello di proteina che di RNA. L'espressione sulla superficie cellulare di LNGFR nelle linee cellulari selezionate con G418 è stata analizzata in maniera quantitativa per citometria a flusso con un anticorpo monoclonale anti-LNGFR. I risultati sono sommarizzati nella tabella I. La maggior parte delle linee cellulari trasdotte con NSV-N e NTK-N mostravano un livello medio basso di espressione sulla superficie di LNGFR, espressa come fluorescenza media relativa (< di 100 unità arbitrarie). Un'espressione alta di LNGFR (202 u.a.) si osservava solo nella linea cellulare RIM infettata con EBV trasdotta con NSV-N. L'espressione di LNGFR non era evidenziabile nella linea cellulare MOLT-4 trasdotta con NTK-N, sebbene nessun riarrangiamento del genoma provirale fosse evidenziabile in un digerito del DNA genomico con Xba I (figura 2B, colonna 6). Trasferimento genico

ripetuto con questo vettore nella stessa linea cellulare produceva risultati negativi in maniera consistente.

Tutte le linee cellulari trasdotte con il vettore retrovirale LNSN esprimeva LNGFR a livelli medio alti (50-200 u.a.) (tabella I).

La maggior parte delle linee cellulari trasdotte con DCN esprimevano livelli medi o alti di LNGFR (50-200 u.a.). I profili per FACS delle linee cellulari trasdotte con DCN correlavano con i risultati ottenuti per analisi "Southern", nelle quali le linee cellulari che portavano un provirus riarrangiato oltre ad un provirus intatto mostravano curve bifasiche, con un picco positivo ed un picco negativo proporzionali alla intensità relativa delle bande corrispondenti ai provirus riarrangiati ed intatti rispettivamente.

L'espressione degli RNA vettori specifici nelle cellule trasdotte (K562) era determinata per analisi di trasferimento "Northern" di RNA poli(A)+ isolato dalle linee cellulari selezionate con G418, e ibridizzate a sonde LNGFR e Neo. I risultati ottenuti erano consistenti con i profili di trascrizione attesi di ciascun vettore retrovirale. Nelle cellule trasdotte con NSV-N e NTK-N, specie di RNA non maturate e maturate ibridizzavano sia alla sonda NLGFR che alla sonda Neo. I trascritti subgenomici derivati da SV40 e

SpA

da TK contenenti mRNA specifico per LNGFR erano osservati solo dopo ibridazione con la sonda LNGFR. Le cellule trasdotte con LNSN esprimevano solo la forma di RNA non maturata, ibridizzando sia alla sonda NeoR che alla sonda LNGFR. Ciò è consistente con l'inattivazione del sito donatore di maturazione nel vettore LXS_N, da cui LNSN era derivato (2). Un trascritto più corto, corrispondente al mRNA NeoR derivato da SV40 ibridizzava solo con la sonda NeoR.

Il vettore DCN generava due trascritti genomici derivati da LTR, rispettivamente non maturo e maturo. Una terza specie di RNA era trascritta dal promotore ADA, e probabilmente utilizzata come principale stampo di mRNA per la sintesi di LNGFR. Il contributo relativo del promotore ADA al 5' o al 3' di LTR per il trascritto LNGFR non può essere attribuito con questa tecnica. Una forma di RNA a migrazione più lenta potrebbe rappresentare un trascritto "read-through" che ha inizio dal promotore ADA al 5' di LTR e termina al sito di addizione del poli(A) al 3' di LTR. Erano anche evidenziati due specie di RNA aggiuntive non considerate che ibridizzavano solo con la sonda NeoR. Questi trascritti, presenti in tutte le linee cellulari trasdotte con DCN, erano le uniche specie di RNA evidenziabili in cellule Raji, che non

esprimevano LNGFR e avevano solo il provirus riarrangiato, come dimostrato da analisi per trasferimento "Southern". E' pertanto probabile che questi trascritti sono specifici per il provirus riarrangiato, mancanti del minigene ADAP-LNGFR.

L'espressione dell'RNA osservata nelle altre linee cellulari era comparabile con quella ottenuta dalla linea K562, con la sola eccezione della linea cellulare RIM infettata con EBV, che mostrava in maniera consistente alti livelli di trascritti derivati da SV40, sia da NSV-N che da LNSN.

Efficienza del trasferimento genico mediato da vettore nei PBLs umani

Linfociti da sangue periferico umani sono stati infettati con vettori retrovirali sotto stimolazione di PHA e di IL-2. Per evidenziare le frequenze di infezioni, 48 ore dopo l'infezione le cellule T umane sono state coltivate in condizioni di diluizioni seriali (da 1 a 10^3 cellule per pozzetto). Cellule infettate e di controllo non infettate sono state coltivate in presenza o in assenza di 0.4 mg/ml di G418. La crescita cellulare era valutata 14 giorni dopo il piastramento, quando nessuna cellula poteva essere evidenziata nei pozzetti che contenevano cellule non infettate coltivate in presenza di G418. La frequenza di

ING. B. ZILLO & ZILLO ASSOCIATI S.p.A.

Una volta che le palline magnetiche sono state rimosse, una popolazione omogenea di linfociti trasdotti è ottenuta senza una significativa perdita di cellule trasdotte.

Per valutare l'efficienza dei vettori virali nella infezione di PBLs umani, si trasducevano in maniera indipendente diverse colture di PBL per esposizione a sovranatanti contenenti diversi vettori retrovirali e si selezionava con G418 per la presenza e l'espressione dei vettori. Dieci delle colture trasdotte con i vettori (2 da NSV-N, 3 da NTK-N, 2 da LNSN e 3 da DCN) erano analizzate per le integrazioni provirali per analisi "Southern". La ibridazione alla sonda NeoR digerita con Xba I, che taglia sia al 5' che al 3' di tutti i vettori LTRs (figura 1), permette l'evidenziazione dei provirus integrati, e con Bgl II, che taglia solo nel DNA genomico, permette una stima del numero dei siti d'integrazione. In tutte le colture di linfociti trasdotti da NSV-N, NTK-N e LNSN, solo le bande corrispondenti ai provirus integrati intatti erano evidenziabili, mentre una banda aggiuntiva corrispondente al provirus riarrangiato era osservata in tutte le colture trasdotte con DCN.

Infine, un'analisi delle integrazioni provirali rivelava che le colture di cellule T trasdotte

con NSV-N, NTK-N e LNSN erano largamente policlonali, mentre le colture trasdotte con DCN erano essenzialmente oligoclonali, come indicato dalla presenza di una banda predominante e solo di poche bande minori. Come già suggerito, ciò è probabilmente dovuto ad un titolo virale più basso e potrebbe essere evitato con diversi protocolli di trasferimento genico compresa la co-coltivazione delle cellule bersaglio con le linee cellulari producenti vettore.

Espressione mediata da vettore di LNGFR in linfociti T umani

L'espressione sulla superficie cellulare di LNGFR era evidenziata per analisi FACS in un totale di 23 colture di linfociti T trasdotti con vettori retrovirali (5 NSV-N, 8 NTK-N, 5 LNSN e 5 DCN). L'espressione di LNGFR era bassa in tutte le cellule trasdotte con NSV-N, ed in sei delle otto colture cellulari trasdotte con NTK-N. Le due linee cellulari T trasdotte con NTK-N restanti mostravano livelli intermedi di espressione LNGFR. Livelli di espressione eterogenea erano osservati nelle colture cellulari LNSN, con due linee esprimenti livelli bassi, due livelli intermedi, ed una livelli alti di LNGFR. Nelle cellule trasdotte con DCN, quattro delle cinque linee esprimevano livelli bassi ed una livelli intermedi di

LNGFR.

Per caratterizzare le cellule infette, abbiamo saggiato 13 linee cellulari trasdotte per l'espressione di antigeni di differenziazione della superficie cellulare dei linfociti, utilizzando anticorpi monoclonali anti-CD4, CD8, CD5, B4, Leu7, CD25R e CD34. Tutte le linee cellulari saggate risultavano positive per l'espressione di CD5 e di CD25R e negative per l'espressione di Leu7, B4 e CD34 (non mostrato). Otto delle tredici colture analizzate erano LNGFR⁺/CD8⁺, una era LNGFR⁺/CD4⁺ e quattro erano positive per LNGFR e contenevano diverse percentuali di cellule che coesprimevano CD8 e CD4. La predominanza del fenotipo CD8⁺ nelle colture stimulate con PHA e con IL-2 era anche osservata nelle linee cellulari di controllo non infette, e probabilmente rappresenta un fenomeno costante della procedura di coltura delle cellule T. In generale, non abbiamo osservato una trasduzione preferenziale di una sottospecie cellulare particolare da parte di nessuno dei quattro vettori retrovirali.

I cloni di cellule T erano ottenuti dalle colture di cellule T trasdotte con vettore per piastramento delle cellule in diluizioni limitanti (1000, 100 e 10 cellule per pozzetto), considerando una frequenza di infezione media di approssimativamente 1%.

ING. R. 1074/72 Z. 1000000000 SpA

Il 72% di tutti i cloni esaminati erano LNGFR⁺/CD4⁺ e il 28% erano LNGFR⁺/CD8⁺. La predominanza del fenotipo CD4⁺ era anche osservata nel controllo di cloni di cellule T non infette dagli stessi donatori, ed è considerata un fenomeno standard nelle nostre condizioni di clonaggio. Inoltre, la trasduzione retrovirale e l'espressione di LNGFR era ottenuta in cloni doppi positivi, CD4⁺/CD8⁺. Questi risultati dimostrano che l'infezione retrovirale potrebbe avvenire non solo nelle cellule mature CD4⁺ e CD8⁺, ma anche nei linfociti da sangue periferico doppiamente positivi CD4⁺/CD8⁺.

Analisi del repertorio di cellule T nei linfociti T trasdotti con i vettori

Come già mostrato, un'analisi per trasferimento "Southern" delle integrazioni virali dimostrava la natura policlonale delle colture di cellule T infettate da vettori. Questo era ulteriormente confermato da analisi molecolare dei riarrangiamenti della catena β del recettore delle cellule T (TCR) su campioni di DNA digeriti con Xba I e ibridizzati ad una sonda specifica per la regione costante della catena β del TCR. Uno schema policlonale, con nessuna banda predominante aggiuntiva allo schema della linea germinale, era evidenziata nelle colture di cellule T trasdotte con NSV, NTK-N e LNSN. La presenza di numeri

limitati di bande riarrangiate predominanti era osservata in colture infettate con DCN, così come per le popolazioni cellulari oligoclonali.

Un'ulteriore conferma a queste osservazioni era ottenuta per un'analisi sistematica dell'uso della catena $V\beta$ del TCR nei linfociti trasdotti. Dopo un singolo ciclo di infezione di FBLs con i sovrinatanti contenenti vettori, seguito da una selezione delle cellule trasdotte con G418, l'RNA totale della popolazione di linfociti selezionata era soggetta a trascrizione inversa e il DNA ottenuto era soggetto a PCR con uso di oligonucleotidi specifici $V\beta$ - $C\beta$, ed a PCR "anchor" utilizzando un oligonucleotide specifico $C\beta$ come descritto nella sezione dei metodi. Un'analisi dei prodotti amplificati dagli oligonucleotidi specifici $V\beta$ mostrava un identico repertorio paragonato alla popolazione di controllo originaria dei linfociti non trasdotti/non selezionati. La figura 9 mostra il repertorio sostanzialmente normale dell'uso $V\beta$ in una popolazione policlonale di linfociti trasdotti con LNSN. In maniera simile ai risultati dell'analisi per trasferimento "Southern" dei riarrangiamenti delle catene TCR- β , bassi titoli virali nei sovrinatanti di vettori producevano un limitato repertorio $V\beta$ (non mostrato). Questa limitazione dei vettori a basso titolo

Dr. G. BARZANO & T. M. P. 2011 SpA

potrebbe essere risolta per cicli di infezione multipla
o per co-coltivazione di PBLs con la linea cellulare
produttrice.

via R. ... SpA

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliervo
(N. d'iscr. 171)

Taliervo

SEQ ID NO 1 :

1 GCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCAGCGCAGCCCCATC 60
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGCGCCGGTCGAGGCCGCCCGTCCCCCGCGACCTCGCGTCGCGTCGCGTCGCGGGTAG
 61 AGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCGCTGCCGCGGGAGGCGGGCGATGGGGG 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCAGGCGTTTCGCCTGGCTCGACCTTCAGCTCGCGACGGCGCCCTCCGCCCCGCTACCCCC
 121 CAGGTGCCACCGGCCGCGCCATGGACGGGCGCGCCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGGGGG 180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCCACGGTGGCGCGCGGTACCTGCCCGGCGCGGACGACGACAACGACGAAGACCCCC
 181 TGTCCCTTGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGAGT 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACAGGGAACCTCCACGGTTCCTCCGTACGGGGTGTCCGGACATGTGTGTGTGCGCCACTCA
 241 GCTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGTGGAGCCAACCAGACCG 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGACGTTTCGGACGTTGGACCCGCTCCCACACCGGGTCGGAACACCTCGGTTGGTCTGGC
 301 TGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGT 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACACACTCGGGACGGACCTGTGCGACTGCAAGAGGCTGCACCACTCGCGCTGGCTCGGCA
 361 GCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCCG 420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGTTCGGCACGTGGCTCACGCACCCCGAGGTCTCGTACAGCCGCGGCACGCACCTCCGGC
 421 ACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGGCGCTGCG 480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGCTGCGGCACACGGCGACGCGGATGCCGATGATGGTCCTACTCTGCTGACCCGCGACGC
 481 AGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCCTGCCAGGACAAGCAGA 540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCCGCACGGCGCACACGCTCCGCCCGAGCCCGGAGCACAAGAGGACGGTCTGTTCGTCT
 541 ACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACC 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGTGGCACACGCTCCTCACGGGGCTGCCGTGCATAAGGCTGCTCCGGTTGGTGCACCTGG
 601 CGTGCCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCTCCGCGAGTGACACGCT 660
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCACGGACGGGACGTGGCACACGCTCCTGTGGCTCGCGGTGAGGGCGCTCACGTGTGCGA
 661 GGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGATTACACGGTCCACACCCCCAG 720
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCGGCTGCGGCTCACGCTCCTCTAGGGACCGGCAACCTAATGTGCCAGGTGTGGGGGTC
 721 AGGGCTCGGACAGCACAGCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGCACCTCCAGAACAGACC 780
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCCCGAGCCTGTGCTGTCGGGGGTCGTGGGTCTCGGACTCCGTGGAGGTCTTGTCTG

P.G. BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Un metodo per marcare una cellula eucariota (di mammifero) esprimendo in questa cellula un acido nucleico, detto acido nucleico codificante per un recettore di superficie cellulare, e successivamente presentando detto recettore alla superficie cellulare, caratterizzato dall'uso di un acido nucleico in cui la regione codificante per il dominio intracellulare del recettore è stata completamente o parzialmente deleta o modificata in modo tale che il recettore presentato alla superficie non può, dopo legame al suo ligando, effettuare alcuna trasduzione di segnale.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la regione codificante per il dominio intracellulare è modificata per sostituzione di nucleotidi.

3. Il metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che è utilizzato un acido nucleico codificante per il recettore NGF, CD24 o LDL.

4. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che come acido nucleico, viene utilizzato l'acido nucleico del recettore NGF in cui la regione codificante dagli amminoacidi 245 al C-terminale è deleta.

5. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 4,

caratterizzato dal fatto che l'acido nucleico è introdotto nella cellula a mezzo di un vettore virale, o per lipofezione.

6. DNA che codifica per un recettore modificato del NGF e che è illustrato in SEQ ID NO 1, così come la sequenza complementare di questo.

7. Una cellula eucariota contenente un acido nucleico secondo la rivendicazione 6.

8. Uso di un acido nucleico, che codifica un recettore di superficie cellulare e in cui la regione codificante il dominio intracellulare è stata completamente o parzialmente deleta o modificata in modo tale che il dominio non possa essenzialmente più effettuare alcuna trasduzione di segnale, a mezzo di espressione di detto recettore di superficie cellulare modificato e di presentazione del recettore alla superficie cellulare in maniera tale che il recettore possa essere utilizzato come marcatore selezionabile per cellule eucariote trasfettate.

9. Metodo per la immunoselezione di cellule trasfettate, a mezzo di introduzione di un acido nucleico che codifica per un recettore di superficie cellulare in cui la regione codificante il dominio intracellulare del recettore è stata completamente o parzialmente deleta o modificata in maniera tale che il

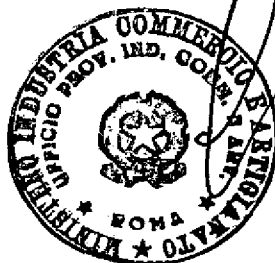
recettore presentato alla superficie non può, dopo legame al suo ligando, effettuare alcuna trasduzione di segnale, di identificazione delle cellule trasfettate per incubazione delle cellule con un anticorpo marcato che si lega in maniera specifica a detto recettore, e per recupero delle cellule per dissociazione del complesso anticorpo/cellula.

10. Metodo per la immunoseparazione di cellule trasfettate, a mezzo di introduzione di un DNA che codifica per un recettore di superficie cellulare in cui la regione codificante per il dominio intracellulare del recettore è stata completamente o parzialmente deleta o modificata in maniera tale che il recettore presentato alla superficie non può, dopo legame al suo ligando, effettuare alcuna trasduzione di segnale, di incubazione delle cellule con un anticorpo contro il recettore immobilizzato prima o dopo l'incubazione, di separazione delle cellule immobilizzate dall'anticorpo dalle cellule non legate, e di isolamento delle cellule per dissociazione del legame anticorpo-recettore.

Roma, - 1 SET. 1993

p.: Fondazione Centro San Romanello del Monte Tabor

ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 171)

Talierno

ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.

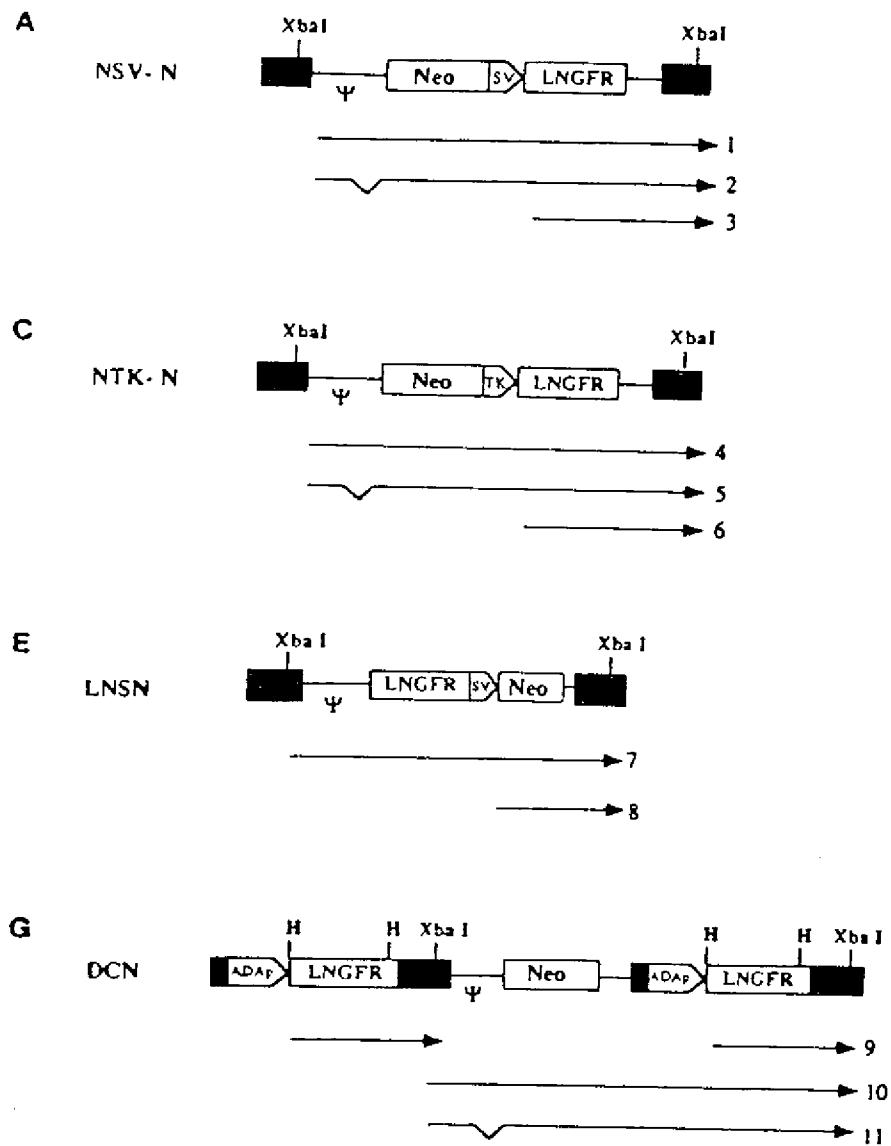


FIG. 1

p.p.: FONDAZIONE CENTRO SAN ROMANELLO DEL MONTE TABOR
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'isr. 171)

Taliencio



2/4

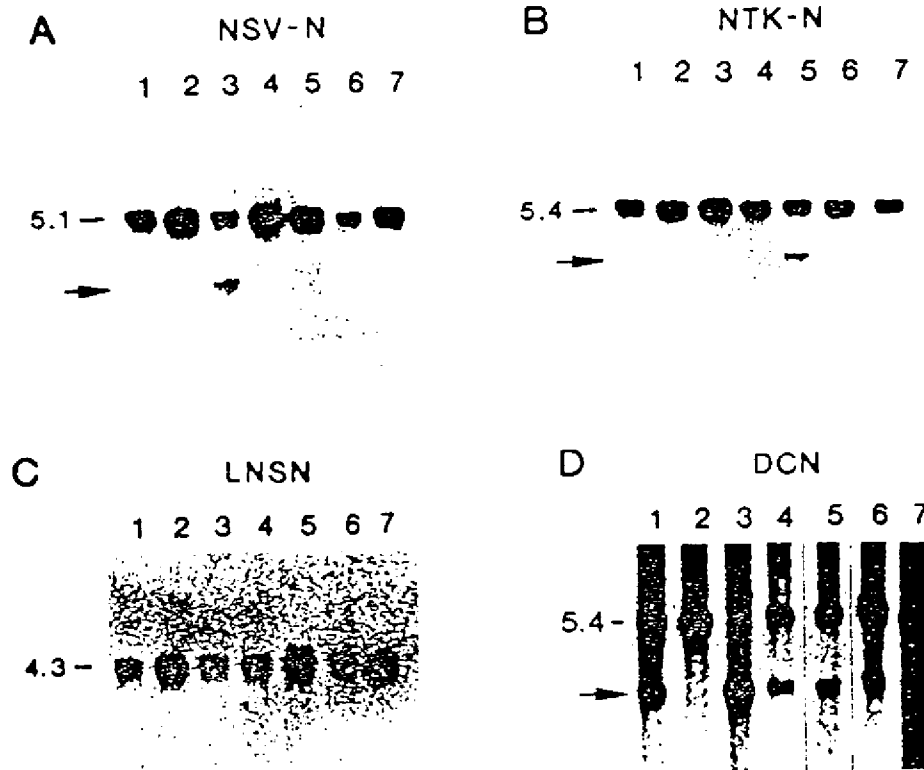


FIG. 2

p.p.: FONDAZIONE CENTRO SAN ROMANELLO DEL MONTE TABOR
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

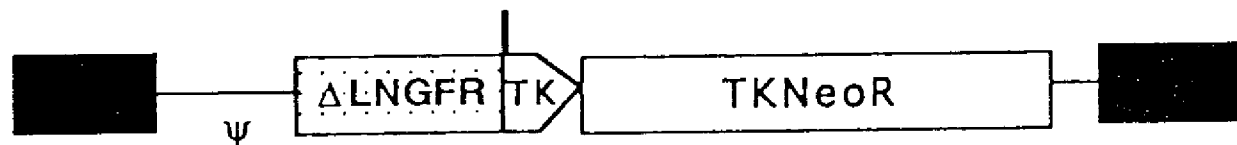


UN MANDATO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'iscr. 171)

Taliencio

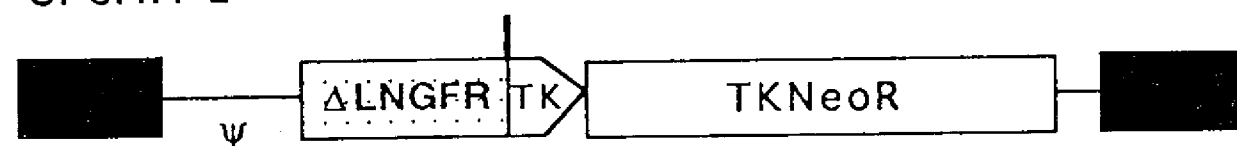
SFCMM-B (Δ NTN)

Bam HI



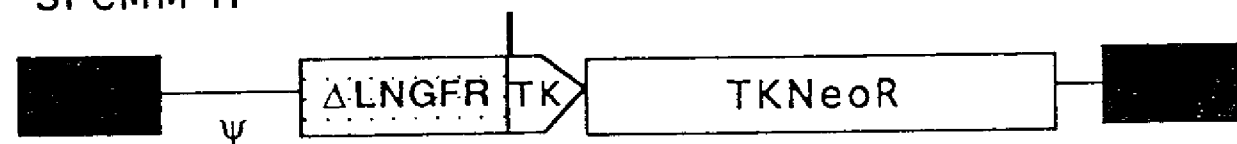
SFCMM-E

Eco RI



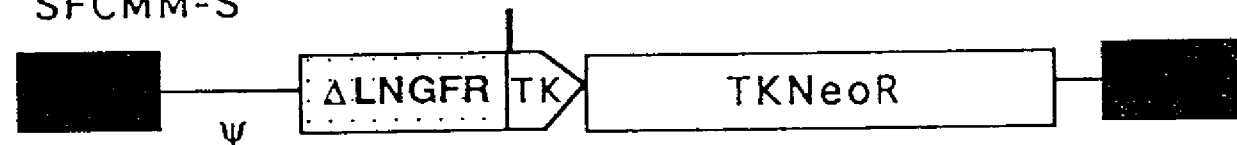
SFCMM-H

Hind III



SFCMM-S

Sac I



SFCMM-C

Cla I

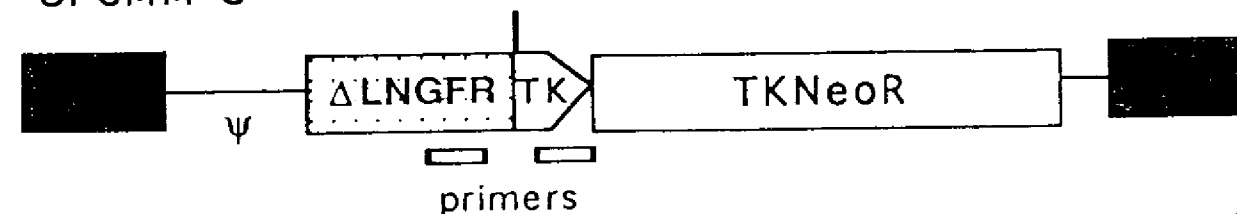
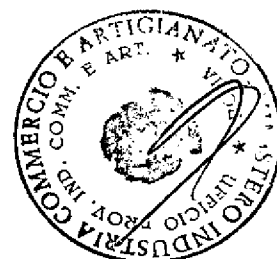


FIG. 3a

p.p.: FONDAZIONE CENTRO SAN ROMANELLO DEL MONTE TABOR
ING. BARZANO¹ & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliercio
(N° d'iscr. 171)

Arliem



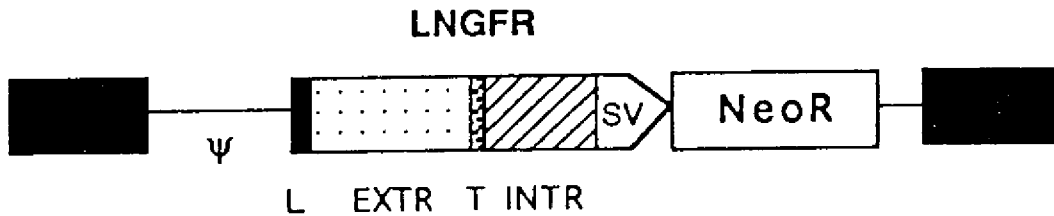
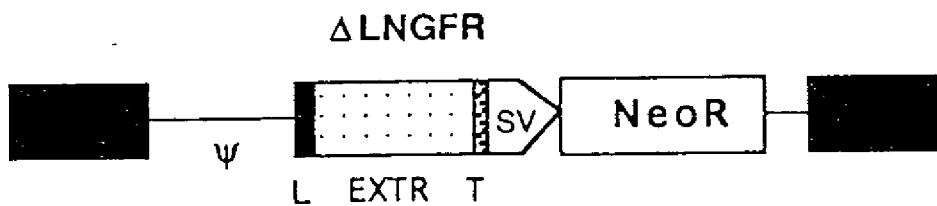
LNSNSFCM (L Δ NSN)

FIG. 3b

p.p.: FONDAZIONE CENTRO SAN ROMANELLO DEL MONTE TABOR
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



UN MARCHIO
per se e per gli altri
Antonio Talierecio
(N. d'iscr. 171)

Italiani