



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900370995
Data Deposito	01/06/1994
Data Pubblicazione	01/12/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	02	D		

Titolo

METODO PER LA AMPLIFICAZIONE IN VITRO E L'ESPRESSIONE IN CELLULE DI MAMMIFERO DI SEQUENZE ESOGENE DI ACIDI NUCLEICI
--

DESCRIZIONE

RM 24 / 000343

a corredo di una domanda di brevetto di invenzione dal titolo:

"Metodo per la amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di sequenze esogene di acidi nucleici"

a nome: FONDAZIONE CENTRO SAN ROMANELLO DEL MONTE TABOR

Inventori: Monaco Lucia, Uhlén Mathias

La presente invenzione concerne un metodo per la amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di sequenze di acidi nucleici esogene.

Più in particolare l'invenzione riguarda un metodo per la amplificazione in vitro di sequenze di DNA che possono essere poi direttamente introdotte in cellule ospiti di mammifero, per una loro corretta ed efficiente espressione.

Tali sistemi hanno però alti costi di produzione e rese non sempre soddisfacenti (1). Una della strategie più utilizzate per ottenere elevate quantità della proteina ricombinante è quella di aumentare il dosaggio genico, utilizzando vettori virali presenti in molte copie nella cellula ospite, come SV40 (2,3), il virus del Papilloma Bovino, il virus di Epstein-Barr (4); o per co-amplificazione in vivo dell'unità genica integrata a seguito di selezione per una aumentata resistenza ad alcune sostanze, come il metotrexato, il cadmio o la metionina sulfossimmina (5). Tali sistemi presentano, tuttavia, degli inconvenienti. I sistemi virali richiedono normalmente

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

particolari cellule ospiti permissive e, inoltre, spesso il sistema di espressione è transiente, a causa dell'instabilità dei vettori e/o della perdita di vitalità delle cellule ospiti. La co-amplificazione in vivo non è facilmente controllabile e le rese della proteina sono spesso imprevedibili. Inoltre gli schemi di amplificazione sono lunghi e laboriosi e, anche in questo caso, sono spesso richieste cellule ospiti particolari.

Sono stati descritti sistemi di amplificazione in vitro del DNA che richiedono la costruzione di cosmidi con inserti ligati in tandem, l'assemblamento delle particelle fagiche in vitro ("packaging"), e l'introduzione nella cellula ospite (6,7).

Gli autori della presente invenzione hanno messo a punto uno schema per l'integrazione di sequenze di DNA esogene nel genoma di una cellula ospite, che risolve alcuni dei problemi associati con gli schemi di co-amplificazione noti dalla tecnica anteriore. L'unità di espressione contenente il gene di interesse è polimerizzata in vitro in maniera controllata, e poi introdotta direttamente nella cellula ospite, evitando il passaggio di "packaging" che diminuisce considerevolmente l'efficienza del sistema. Il sistema permette potenzialmente l'amplificazione di qualsiasi gene in qualsiasi cellula ospite competente per la trasformazione.

Utilizzando come sistema campione il gene codificante per l'enzima CAT (cloramfenicoloacetiltrasferasi) in cellule umane HeLa, gli autori della presente invenzione hanno dimostrato che tutti i

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

trasformanti ottenuti dall'amplificazione in vitro esprimono alti livelli dell'enzima ricombinante. Questo sistema di amplificazione in vitro è stato applicato anche all'espressione della endotelina (ET-1) in cellule umane A617, cellule vascolari della muscolatura liscia, che sono cellule bersaglio per l'azione di ET-1, ma non la producono. Utilizzando il metodo dell'invenzione, sono state ottenute cellule ricombinanti A617 che esprimono ET-1, mentre con sistemi convenzionali eseguiti in parallelo non si sono prodotti livelli evidenziabili di espressione della proteina ricombinante.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante, che comprende i seguenti passaggi:

- a. clonare la sequenza codificante che si desidera esprimere in un sito per un primo enzima di restrizione di un primo vettore procariotico, sotto il controllo di un promotore in grado di funzionare in cellule di mammifero, e a monte di un sito di poliadenilazione, in cui detto primo vettore ha, a monte del promotore e a valle del sito di poliadenilazione, un sito per un secondo enzima di restrizione che riconosce una sequenza di almeno sei basi nucleotidiche;
- b. clonare, con le stesse modalità del passaggio precedente, una sequenza codificante per un marcatore selezionabile in cellule eucariotiche in un secondo vettore procariotico, sostanzialmente simile al primo vettore descritto nel passaggio precedente, che

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

comprende ulteriormente un sito per un terzo enzima di restrizione che riconosce una sequenza di almeno sei nucleotidi, a valle del sito di poliadenilazione e a monte del sito per il secondo enzima di restrizione; in cui il secondo enzima di restrizione è diverso dal primo e dal terzo enzima di restrizione, e il primo e il terzo enzima di restrizione sono diversi tra loro;

- c. incubare con il secondo enzima di restrizione il primo vettore, per ottenere una prima "cassetta" comprendente la sequenza codificante che si desidera esprimere;
- d. incubare con il secondo enzima di restrizione il secondo vettore, per ottenere una seconda "cassetta" comprendente la sequenza codificante per il marcatore selezionabile in cellule di mammifero;
- e. incubare con DNA ligasi la prima e la seconda cassetta in un rapporto $n:1$, rispettivamente, in cui n è maggiore di 1, per ottenere un concatenamero;
- f. incubare con il quarto enzima di restrizione il concatenamero, per ottenere una miscela di polimeri comprendenti una copia della seconda cassetta e m copie della prima cassetta, in cui m è maggiore di 1;
- g. introdurre nelle cellule ospiti di mammifero la miscela di polimeri e selezionare per il marcatore.

Preferibilmente il promotore in grado di funzionare in cellule di mammifero è compreso nel seguente gruppo: promotore precoce di SV40, promotore di CMV, promotore inducibile per la

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

tetraciclina; il promotore precoce di SV40 è maggiormente preferito.

Preferibilmente la sequenza codificante per un marcatore selezionabile in cellule eucariotiche è quella per la resistenza alla neomicina o al suo analogo G418.

Preferibilmente il secondo enzima di restrizione riconosce una sequenza di almeno otto basi nucleotidiche; l'enzima di restrizione preferito è Sfil.

Preferibilmente il terzo enzima di restrizione riconosce una sequenza di almeno otto basi nucleotidiche; l'enzima di restrizione preferito è NotI.

Preferibilmente n è maggiore o uguale a 10, più preferibilmente n è compreso tra 10 e 20, inclusi.

Preferibilmente l'introduzione della miscela di polimeri nelle cellule ospiti avviene a mezzo di una delle seguenti procedure: precipitazione in calcio-fosfato, lipofectina, elettroporazione.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un corredo diagnostico comprendente:

- detto primo vettore di clonaggio;
- frammento purificato di DNA comprendente detta seconda cassetta;
- detto secondo enzima di restrizione;
- tampone di digestione per detto secondo enzima di restrizione;
- detto terzo enzima di restrizione;
- tampone di digestione per detto terzo enzima di restrizione.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Preferibilmente detto corredo diagnostico comprende:

- vettore di clonaggio pSfiSV19
- frammento purificato Sfil-Sfil del plasmide pSfiSVneo (seconda cassetta)
- enzima Sfil
- tampone di digestione per Sfil, 10x
- enzima NotI
- tampone di digestione per NotI, 10x
- polimeri ligati di controllo, per elettroforesi in campo pulsato
- marcatori di peso molecolare, per elettroforesi in campo pulsato
- manuale di istruzioni.

La presente invenzione verrà ora descritta in riferimento a sue forme di attuazione preferite, da intendersi esplicative ma non limitative, in cui si farà riferimento alle seguenti figure:

- la Figura 1 che rappresenta la struttura degli inserti Sfil dei plasmidi pSfiSV19 e pSfiSVneo; SV40 precoce: promotore precoce di SV40; SV40 poliA: segnale di poliadenilazione di SV40;
- la Figura 2 rappresenta uno schema del sistema di amplificazione in vitro. Le frecce in grigio e nero rappresentano le cassette che contengono i cDNA di interesse e il gene selettivo (NEO), rispettivamente;
- la Figura 3 rappresenta un'elettroforesi in campo pulsato delle miscele di ligazione non tagliate, o tagliate con NotI. Colonne 1, 2, 3: miscele di ligazione a rapporto molare CAT:NEO 1:1, 10:1,

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

100:1 rispettivamente; colonne 4, 5, 6: miscele di ligazione nello stesso ordine, dopo taglio con NotI;

- la Figura 4 rappresenta un diagramma che mostra l'espressione del gene CAT in cloni isolati resistenti a G418. I valori da un esperimento rappresentativo sono forniti come percentuale di cloramfenicolo acetilato. Ciascun pannello mostra gruppi di cloni che derivano dalla stessa piastra trasfettata. I riquadri in grigio corrispondono ai cloni analizzati per Southern blot come descritto in figura 5;
- la Figura 5 rappresenta un'analisi per Southern Blot. Pannello A: DNA genomico isolato da cloni resistenti a G418 e ristretti con HindIII, sondati con un frammento di DNA radioattivo del gene CAT; 10 μ g per colonna di DNA genomico digerito, corrispondente a 3×10^6 cellule. Pannello B: in parallelo, 138, 69 e 6,9 pg di cassetta CAT (2.1 kb), corrispondente a 20, 10 e 1 copia di cassetta CAT per cellula, rispettivamente;
- la Figura 6 rappresenta un istogramma illustrante l'espressione del gene CAT nei cloni isolati dopo 4, 8 e 13 passaggi: i valori da un esperimento rappresentativo sono forniti come % del cloramfenicolo acetilato;
- la Figura 7 rappresenta il profilo di eluizione delle frazioni del terreno condizionato dal clone 28.3.7, separate per HPLC, saggiate per RIA con un siero anti ET-1. Le frecce identificano le posizioni di eluizione della big ET-1 umana come standard e della

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

ET-1 umana standard, saggate per RIA. I valori sono le medie di tre misure e la deviazione standard è minore dell'1.5%.

Materiali e metodi

Costruzioni del DNA

Si utilizzano il ceppo HB101 di E.coli (8) e i plasmidi pEMBL8⁺, pEMBL8⁻ (9), m13mp19 (10), pSV2-cat (11) e pSV2-neo (12). Tutte le manipolazioni del DNA e le costruzioni dei plasmidi sono ottenute secondo procedimenti standard (8). Gli enzimi di restrizione SfiI e NotI sono ottenuti da New England Biolabs, gli inneschi di oligonucleotidi e la DNA ligasi di T4 da Pharmacia; gli altri enzimi da Boehringer Mannheim; enzimi forniti da altre ditte sono ugualmente utilizzabili.

I plasmidi utilizzati derivano dal plasmide pEMBL8⁺, ma qualsiasi plasmide che contenga un'origine di replicazione in procarioti, un marcatore selezionabile e opportuni siti di restrizione per l'inserimento di sequenze esogene può essere utilizzato. Il plasmide pEMBL-Sfi è costruito inserendo l'oligonucleotide sintetico:

5'-AATTGGCCAAAAAGGCCGAATTCAAGCTTATCGATGGCCAAAAAGGCC -3'

e la sua sequenza complementare:

3'-CCGGTTTTTCCGGCTTAAGTTCGAATAGCTACCGGTTTTTCCGGTCGA-5'

tra i siti EcoRI e HindIII di pEMBL8⁺. L'oligonucleotide ha i terminali coesivi compatibili con EcoRI e HindIII, ma i siti non sono riprodotti. Il frammento di 0.3 kb contenente il promotore e l'enhancer di pSV2-cat è trattato con SfiI, poi con la DNA polimerasi di T4 per rimuovere i tre nucleotidi che fuoriescono e riligato per produrre un

Ing. Parrano & Ranardo
Roma s.p.a.

promotore di SV40 modificato che manca di tre nucleotidi e pertanto ha il sito Sfil vicino al sito CAP. Il promotore modificato è trattato con PvuII, ligato con linkers EcoRI e digerito con EcoRI e HindIII. Il frammento di 0.3 kb è inserito in pEMBL-Sfi, già trattato con gli stessi enzimi. Il plasmide risultante pSfiSV-P ha il promotore SV40 affiancato da due siti Sfil.

Un plasmide pEMBL modificato, denominato pEMBL-Bgl, è costruito per taglio parziale di pEMBL8⁻ con PvuI e per inserimento di un linker BglII nel sito presente nel gene lac Z'. Il gene CAT da pSV2-cat è poi inserito tra BglII e HindIII di pEMBL-Bgl introducendo il frammento di 1.6 kb HindIII-BamHI da pSV2-cat. Questo plasmide, denominato pEMBL-cat, contiene la regione multi-linker di pEMBL8⁻ a monte del gene CAT ed ha un sito unico ClaI dopo 1.8 kb da questa regione. In maniera simile, il plasmide pEMBL-neo è costruito inserendo il frammento di 2.3 kb HindIII-BamHI da pSV2-neo nel pEMBL-Bgl ristretto con HindIII e BglI.

Il plasmide pSfiSV-N è costruito inserendo il frammento di 2.5 kb HindIII-ClaI da pEMBL-neo in pSfiSV-P, ristretto con HindIII e parzialmente con ClaI. Ciò fa in modo che il gene per la resistenza alla neomicina sia inserito tra il promotore e il sito di poliadenilazione di SV40. Il plasmide pSfiSV-N è parzialmente ristretto con ClaI e un linker NotI è inserito nel sito ClaI, immediatamente adiacente al sito Sfil, a valle dalla sequenza di poliadenilazione di SV40. Il plasmide risultante, denominato pSfiSVneo, è schematicamente mostrato in figura 1. In maniera

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

simile, il plasmide pSfiSVcat è costruito inserendo il frammento di 1.8 kb HindIII-ClaI da pEMBL-cat in pSfiSV-P ristretto con HindIII e parzialmente con ClaI. Un plasmide modificato pSfiSVcat Δ è ottenuto per restrizione parziale di pSfiSVcat con EcoRI, seguito da incubazione con la DNA polimerasi di Klenow e da riligazione dei terminali non coesivi. Il vettore plasmidico risultante, che contiene un sito unico EcoRI, è tagliato con EcoRI e HindIII ed è inserita la regione multi-linker di mp19 multi-linker, restringendo M13mp19 con gli stessi enzimi. Ciò produce il vettore di clonaggio, amplificazione e espressione in vitro pSfiSV19 mostrato in figura 1. Il plasmide pSfiSVppET è costruito inserendo l'intero cDNA codificante per ppET-1 (13) affiancato da siti BamHI, in pSfiSV19 ristretto con lo stesso enzima.

Preparazione dei polimeri

I plasmidi pSfiSVcat e pSfiSVneo sono tagliati con SfiI e miscelati nei rapporti 1:1, 10:1 e 100:1, rispettivamente. La quantità di frammenti neo è costante. Le miscele di frammenti sono ligate tra loro, o utilizzate per le trasfezioni tal quali. La ligazione ha luogo ad alta concentrazione di DNA (200 mg/ μ l) utilizzando una DNA polimerasi di T4 purificata su FPLC da Pharmacia. Le miscele di ligazione sono incubate a temperatura ambiente per 4 ore, tagliate con NotI, estratte con fenolo/cloroformio e precipitate in etanolo prima della trasfezione. Le miscele di ligazione, sia prima che dopo il taglio con NotI, sono saggate per elettroforesi in campo intermittente su gel di agarosio 1.2 %, utilizzando un apparato Bio-

*Ing. Barrano & Romano
Roma s.p.a.*

Rad Chef DR III. L'elettroforesi è ottenuta a 4.8 V/cm, applicando degli impulsi da 2.5 a 7.5 s per 16 ore a 14°C. Il plasmide pEMBL-Sfi è aggiunto come DNA aspecifico, per portare la concentrazione del DNA fino al valore uniforme di 16 µg per piastra. la miscela di monomeri non ligati ppET/NEO o i polimeri sono ottenuti in maniera simile, utilizzando un rapporto molare di 20:1; la quantità totale del DNA utilizzato è di 20 µg per piastra.

Cellule, trasfezione e selezione

Le cellule HeLa sono mantenute in terreno DMEM + 10% siero fetale bovino + 50 µg/ml di gentamicina + 40 U/ml di nistatina (tutto da Gibco). La trasfezione è effettuata secondo il metodo del calcio fosfato (14). Le piastre da 60 mm di diametro sono seminate con 4×10^5 cellule per piastra, 24 ore prima della trasfezione. Il terreno selettivo contenente 900 µg/ml di G418 (Gibco) è fornito alle cellule due giorni dopo la trasfezione e le colonie resistenti sono visibili dopo 15-20 giorni. Le singole colonie sono trasferite su piastre da microtitolazione e qui espanse in terreno di crescita con 300 µg/ml di G418.

Le cellule A617 sono mantenute nello stesso terreno delle HeLa. Le piastre da 60 mm con 3×10^5 cellule per piastra, inseminate 24 ore prima della trasfezione sono così utilizzate. Il DNA (20 µg in 50 µl di H₂O) è miscelato con lipofectina (Gibco, 40 µg in 50 µl H₂O); la miscela è tenuta a temperatura ambiente per 15 minuti e conseguentemente aggiunta alle cellule ricoperte con 3 ml di terreno Optimem (Gibco). Dopo 8 ore, le cellule sono lavate e

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

riportate in terreno normale. Le cellule trasfettate sono trattate con G418 e i cloni resistenti sono selezionati come descritto per la trasfezione delle cellule HeLa.

Saggio CAT

Le cellule sono piastrate a 0.5×10^6 per piastra da 60 ml. Due giorni dopo le cellule normalmente raggiungono una confluenza precoce. Le cellule vengono staccate in tampone PBS ghiacciato e centrifugate in centrifuga "Minifuge" per 10 secondi. Il sedimento di cellule è risospeso in 250 mM TrisCl pH 7.8, e congelato e scongelato per tre volte. Dopo una centrifuga di 10 minuti, il sovranatante (estratto cellulare) è saggiato per la concentrazione proteica secondo il metodo di Bradford (15). Le aliquote corrispondenti a 50 μ g di proteine sono saggiate per attività CAT, utilizzando ^{14}C -cloramfenicolo come substrato, essenzialmente come descritto in (16). Le forme acetilate del cloramfenicolo sono separate per cromatografia su strato sottile. Le piastre sono autoradiografate e le pellicole scannerizzate utilizzando uno scanner densitometrico Desaga CD60. I risultati sono presentati come percentuale di cloramfenicolo acetilato rispetto al cloramfenicolo totale da un esperimento rappresentativo.

Analisi per Southern blot

Il DNA genomico è estratto dalle cellule come descritto in (17) e digerito con HindIII. I frammenti del DNA sono separati su un gel di 1% di agarosio. Il plasmide pSfiSVcat è tagliato con SfiI e quantità definite del DNA sono caricate sugli stessi gel per

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

permettere una quantizzazione dei risultati. I gel sono trasferiti su membrane di nylon come descritto in (18).

L'ibridazione ad una sonda con un multi-linker corrispondente al frammento Pvull-ScaI del gene CAT (11) è effettuata come descritto in (18). L'autoradiografia è ottenuta a -80°C con uno schermo intensificatore. Il numero di copie approssimativo di ciascun frammento è stimato per paragone di intensità delle bande di 2.1 kb su standard quantitativi.

Saggio RIA

Il procedimento RIA seguito per ET-1 è essenzialmente quello descritto in (13). La proteina ET-1 utilizzata come standard è ottenuta dal Peptide Institute, Osaka, Giappone. Il siero di coniglio anti-ET-1 è ottenuto dal Peninsula Laboratories Inc., Belmont, CA, USA. Il limite di sensibilità del saggio con questo antisiero è di 0.4 pg/100 µl per provetta; la IC₅₀ è di 10 pg. Il legame non specifico non eccede il 3% di radioattività totale. La cross-reattività di questo anticorpo misurata con la big ET-1 è del 9.4%. I risultati sono espressi in pg/ml di materiale immunoreattivo.

Frazionamento per HPLC

I terreni condizionati dalle cellule di controllo A617 non trasfettate e dal clone 28.3.7 sono separate su colonna in fase inversa (SuperPacPrepS, 4x250 mm, Pharmacia) come descritto in (19). Il volume analitico standard è di 100 µl. Frazioni di 0.4 ml sono raccolte (Gilson 201 collettore di frazioni) ed essiccate in un concentratore SpeedVac (Savant) prima di essere risospese in 0.4

Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.

ml di tampone RIA (tampone fosfato a pH 7.2, 0.1% Triton X-100 e 0.3% albumina).

Risultati

Uno schema del sistema di amplificazione in vitro è mostrato in figura 2. Un vettore di espressione dell'amplificazione in vitro pSfiSV19 (figura 1) è stato costruito, in cui la regione multi-linker di mp19 è affiancata da un promotore di SV40 a monte, e da un sito di poliadenilazione di SV40 a valle. Il clonaggio in questa regione assicura alti livelli costitutivi di espressione nella maggior parte di cellule di mammifero (12). La cassetta di espressione è affiancata da due siti Sfi, che danno luogo, a seguito di restrizione, a terminali che protrudono di tipo non palindromico. E' da notare che il promotore di SV40 contiene normalmente un sito Sfi immediatamente a monte del sito CAP (20), che è stato rimosso da una delezione sito-specifica.

Il cDNA da esprimere è inserito nella regione multi-linker di pSfiSV19; il taglio con Sfi produce un frammento con terminali protrudenti AAA/TTT di tipo non palindromico. La cassetta di espressione contiene il cDNA di interesse, affiancato dai segnali di espressione SV40. In parallelo, il vettore plasmidico pSfiSVneo (figura 1) viene ristretto con Sfi per produrre una cassetta con il gene per la resistenza alla neomicina (NEO) con gli stessi terminali protrudenti non palindromici AAA/TTT (figura 2). I due frammenti sono miscelati nel rapporto desiderato e ligati in condizioni che producono lunghi concatenameri lineari. A causa della sequenza dei

*Ing. Parrano & Ranardo
Roma s.p.a.*

siti Sfil, solo le ligazioni testa-coda sono ottenute e il numero di geni resistenti alla neomicina, paragonati al numero di unità di cDNA, è regolato dal rapporto molare delle due cassette nella miscela di ligazione. Un sito unico di restrizione NotI al terminale 3' della cassetta NEO è quindi utilizzato per ottenere polimeri lineari contenenti solo un singolo gene NEO. La miscela ottenuta dopo taglio con NotI è utilizzata per trasformare cellule di mammifero con tecniche standard. I cloni resistenti all'analogo della neomicina G418 sono poi isolati e saggiati per l'espressione del cDNA inserito.

Amplificazione in vitro dell'unità di gene CAT

I polimeri lineari contenenti le cassette NEO e CAT sono ottenuti per ligazione dei frammenti Sfil dai plasmidi pSfiSVcat e pSfiSVneo (figura 1). Tre esperimenti separati sono ottenuti, in cui i rapporti molari dei geni CAT e NEO durante le ligazioni sono di 1:1, 10:1 e 100:1, rispettivamente. Le miscele di ligazione sono saggiate per elettroforesi in campo pulsato, prima e dopo taglio con NotI. Nel caso delle tre miscele non digerite, la lunghezza media è di circa 45 kb; frammenti più corti sono anche ottenuti, come atteso, a seguito di incubazione con NotI delle miscele di ligazione a 1:1 e 10:1 (figura 3). I campioni di DNA di controllo, consistenti delle miscele di 1:1, 10:1 e 100:1 prima della ligazione, sono utilizzati per le trasfezioni di controllo, rappresentando DNA di un protocollo standard di cotrasfezione, in cui il gene selettivo è miscelato in differenti rapporti con il gene non selettivo da esprimere. I tre

Ing. Barriani & Barriani
Roma spa

campioni contenenti il gene CAT amplificato in vitro e le tre miscele di frammenti non ligati sono trasfettati in cellule umane HeLa.

Isolamento e analisi dell'attività CAT in cloni resistenti a G418

Le cellule trasfettate con le miscele di DNA sono mantenute in terreno selettivo contenente 900 µg/ml di G418, per circa da 2 a 3 settimane. Si ottengono da 10 a 20 cloni resistenti per piastra, ad eccezione per la piastra trasfettata con i frammenti monomerici 100:1, nella quale non è ottenuto alcun clone. Quattro o cinque cloni casuali da ciascun esperimento di trasfezione sono trasferiti in pozzetti di piastre da microtitolazione ed espansi in terreno di crescita supplementato con 300 µg/ml di G418. I cloni sono cresciuti per ottenere almeno 10^7 cellule, con quattro passaggi in terreno selettivo (circa 3 settimane). L'attività enzimatica del prodotto del gene CAT è saggiata e i risultati sono mostrati in figura 4: tutti i cloni dai polimeri 10:1 e 100:1 mostrano una attività CAT che raggiunge la saturazione nel sistema di saggio utilizzato, mentre i cloni contenenti i polimeri più corti mostrano una attività considerevolmente più bassa. Al contrario, i cloni contenenti i frammenti monomerici non ligati, in rapporto 1:1 mostrano un'attività CAT molto bassa, mentre la miscela monomerica 10:1 non ligata produce un'alta attività, che però varia considerevolmente tra i trasformanti individuali.

Analisi per Southern blot dei cloni selezionati

Le cellule di uno o due cloni da ciascun gruppo sono ulteriormente analizzate per Southern blot, utilizzando parte del

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

gene CAT come sonda. I cloni selezionati per analisi dei cromosoni sono marcati in figura 4. I cloni comprendono sia cellule trasformate con polimeri da diverse miscele di ligazione, che miscele monomeriche non ligate. Poichè questi cloni di controllo producono una grande variabilità di espressione, sono selezionati per un'analisi più dettagliata sia quelli con un'elevata che quelli con una scarsa produzione di attività CAT. I DNA genomici ristretti con HindIII da diversi cloni sono ibridati con una sonda specifica CAT radioattiva e analizzati per Southern blot. L'enzima HindIII taglia una volta nella cassetta Sfi-CAT, rilasciando frammenti di 2.1 kb solo da cassette intatte e adiacenti. L'autoradiogramma dal materiale trattato con HindIII (figura 5) mostra che la banda attesa di 2.1 kb è ottenuta dai cloni trasformati con i polimeri dalle miscele di ligazione 10:1 e 100:1. In alcuni di questi cloni sono anche visibili bande di peso maggiore e di intensità minore. I cloni dalla ligazione 1:1 e dalle miscele monomeriche non ligate producono bande a pesi molecolari più alti di quelle della cassetta intatta polimerizzata CAT; inoltre, il clone della ligazione 1:1 che ha un'attività CAT mostra anche una debole banda di 2.1 kb. Note quantità della cassetta Sfi-CAT sono incluse nel gel, permettendo così una indicazione del numero di copie integrate: la ligazione 10:1 mostra approssimativamente 10 copie integrate per cellula, mentre i cloni dalla ligazione 100:1 raggiungono mediamente circa 20 copie per cellula.

Stabilità dell'espressione nei cloni isolati

*Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.*

Per determinare la stabilità di espressione dei 9 cloni individuali, le cellule sono mantenute in terreno selettivo a concentrazioni ridotte di G418 per 7 settimane aggiuntive e l'attività CAT è determinata dopo un totale di 8 e di 13 passaggi (cioè 6 e 10 settimane dopo l'isolamento dei cloni, rispettivamente). I risultati del saggio CAT sono presentati in figura 5 e mostrano che i cloni ottenuti dall'amplificazione in vitro mantengono una alta attività enzimatica. E' interessante notare che l'attività dei cloni dalla trasfezione con i monomeri 10:1 è inaspettatamente alta dopo quattro passaggi, ma diminuisce sostanzialmente durante una crescita prolungata delle cellule.

Espressione della prepro endotelina-1 (ppET-1) in cellule A617

Come esempio di una amplificazione in vitro di un cDNA umano, il cDNA per la ppET-1 è introdotto in cellule A617. L'espressione costitutiva di ET-1 in cellule A617 non trasfettate è saggiata per ibridazione Northern blot con RNA totale cellulare, utilizzando una sonda specifica per ET-1, e per saggio RIA su terreno condizionato delle cellule, utilizzando un anticorpo anti-ET-1 matura. I livelli di espressione di ET-1 in cellule A617 sono al disotto dei limiti di evidenziazione con entrambi i metodi.

La regione di DNA codificante per ppET-1 è inserita nel vettore pSfiSV19, per produrre pSfiSvppET-1. Sulla base dei risultati della ligazione ottenuta con la cassetta CAT, la cassetta prepro ET-1 è miscelata con la cassetta neo ad un rapporto molare di 20:1. La miscela è utilizzata come tale per la co-trasfezione di

Ing. Parrano & Ranardo
Roma s.p.a.

controllo, oppure è ligata e trattata con NotI per la amplificazione in vitro. I prodotti della ligazione mostrano una dimensione media simile ai polimeri CAT-NEO, come rivelato da analisi per elettroforesi in campo pulsato.

La trasfezione è effettuata secondo la tecnica della lipofectina. Due giorni dopo la trasfezione, le cellule sono trattate con l'analogo della neomicina G418 e le colonie resistenti sono ottenute dopo 10-15 giorni in coltura. Circa 200 colonie per piastra sono ottenute in tutti i casi. Sei colonie, isolate da ciascun esperimento di co-trasfezione e dall'esperimento di amplificazione in vitro, sono prescelte. Le cellule da ciascuna colonia sono espanse e l'espressione di ET-1 è analizzata per ibridazione su Northern blot con RNA totale cellulare e per RIA su terreno condizionato. Nessuna espressione è evidenziabile con entrambi i metodi nei cloni co-trasfettati, mentre tutti i cloni dall'esperimento di amplificazione in vitro mostrano una banda del peso molecolare atteso per Northern blot e producono del materiale immunoreattivo per saggio RIA. I livelli di espressione sono tra 1110 ± 85 e 3325 ± 1269 pg/ml ($n=3$) per i terreni condizionati raccolti da piastre da 90 mm subconfluenti contenenti una media di 3.5×10^6 cellule per piastra e alimentate con 7.5 ml di terreno per 24 ore (tabella 1).

Tabella 1

Livelli di espressione di ET-1 di cloni isolati di cellule A617

trasfettate con polimeri preproET-1.

Clone

pg/ml

*Ing. Parrano & Parrano
Roma s.p.a.*

28.3.1	1110 ± 85
28.3.2	1527 ± 150
28.3.4	1801 ± 455
28.3.6	1706 ± 145
28.3.7	3325 ± 1269
28.3.8	1799 ± 554

I terreni dopo 24 ore di incubazione in piastre da 90mm con cellule subconfluenti (7.5ml per 3.5×10^6 cellule) sono raccolti e saggiati per RIA con ET-1. I valori rappresentano le medie $\pm$ la deviazione standard di esperimenti effettuati in triplicato.

Caratterizzazione della ET-1 ricombinante

Per caratterizzare le specie molecolari responsabili della immunoreattività verso ET-1, il terreno condizionato raccolto dalla colonia 28.3.7 è separato su colonna HPLC in fase inversa e le frazioni raccolte sono saggate per RIA. Due picchi sono evidenziati alle posizioni corrispondenti alle posizioni di eluizione della ET-1 standard e della big ET-1, rispettivamente (figura 6), mentre il terreno di controllo da cellule A617 non trasfettate non produce alcun materiale positivo per RIA. L'attività contrattile del terreno condizionato dal clone 28.3.7 su strisce della vena cava di coniglio deprivate da endotelio, saggiata essenzialmente come descritto in (18), mostra una contrazione specifica, dose-dipendente, dimostrando l'attività biologica del materiale prodotto dai trasfettanti.

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

Composizione di un kit per la amplificazione in vitro di sequenze codificanti

- vettore di clonaggio pSfiSV19
- frammento purificato Sfil-Sfil del plasmide pSfiSVneo (seconda cassetta)
- enzima Sfil
- tampone di digestione per Sfil, 10x
- enzima NotI
- tampone di digestione per NotI, 10x
- polimeri ligati di controllo, per elettroforesi in campo pulsato
- marcatori di peso molecolare, per elettroforesi in campo pulsato
- manuale di istruzioni.

La presente invenzione è stata descritta, a titolo illustrativo ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, ma è da intendersi che variazioni e/o modifiche potranno essere apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dall'ambito di protezione, come definito dalle seguenti rivendicazioni.

Bibliografia

- (1) Bebbington, C.R. and Hentschel, C.C.G. (1985) Trends in Biotechnol. 3, 314-317
- (2) Hamer, D.H., Smith, K.D., Boyer, S.H. and Leder, P. (1979) Cell 17, 725-736
- (3) Gluzman, Y. (1982) Cell 23, 175-182

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante, caratterizzato dal fatto di comprendere i seguenti passaggi:

- a. clonare detta sequenza codificante in un sito per un primo enzima di restrizione di un primo vettore procariotico, sotto il controllo di un promotore in grado di funzionare in cellule di mammifero, e a monte di un sito di poliadenilazione, in cui detto primo vettore ha, a monte di detto promotore e a valle di detto sito di poliadenilazione, un sito per un secondo enzima di restrizione, rispettivamente, in cui detto secondo enzima di restrizione riconosce una sequenza di almeno sei basi nucleotidiche;
- b. clonare, sostanzialmente con le stesse modalità del passaggio a, una sequenza codificante per un marcatore selezionabile in cellule eucariotiche in un secondo vettore procariotico, sostanzialmente simile a detto primo vettore, comprendente ulteriormente un sito per un terzo enzima di restrizione che riconosce una sequenza di almeno sei nucleotidi, a valle del sito di poliadenilazione e a monte del sito per detto secondo enzima di restrizione; in cui detto secondo enzima di restrizione è diverso da detto primo e da detto terzo enzima di restrizione, e detto primo e detto terzo enzima di restrizione sono diversi tra loro;

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

- c. incubare con detto secondo enzima di restrizione detto primo vettore, per ottenere una prima "cassetta" comprendente detta sequenza codificante;
- d. incubare con detto secondo enzima di restrizione detto secondo vettore, per ottenere una seconda "cassetta" comprendente detta sequenza codificante per il marcatore selezionabile in cellule di mammifero;
- e. incubare con DNA ligasi detta prima e detta seconda cassetta in un rapporto n:1, rispettivamente, in cui n è maggiore di 1, per ottenere un concatenamero;
- f. incubare con detto terzo enzima di restrizione detto concatenamero, per ottenere una miscela di polimeri comprendenti una copia di detta seconda cassetta e m copie di detta prima cassetta, in cui m è maggiore di 1;
- g. introdurre nelle cellule ospiti di mammifero detta miscela di polimeri e selezionare per detto marcatore.

2. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo la rivendicazione 1 in cui detto promotore in grado di funzionare in cellule di mammifero è compreso nel seguente gruppo: promotore precoce di SV40, promotore di CMV, promotore inducibile per la tetraciclina.

3. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo la rivendicazione 2 in cui detto promotore in grado di funzionare in cellule di mammifero è il promotore precoce di SV40.

Ing. Barzani & Barzani
Roma spa

4. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detta sequenza codificante per un marcatore selezionabile in cellule eucariotiche è quella per la resistenza alla neomicina o al suo analogo G418.

5. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detto secondo enzima di restrizione riconosce una sequenza di almeno otto basi nucleotidiche.

6. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo la rivendicazione 5 in cui detto secondo enzima di restrizione è l'enzima Sfil.

7. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detto terzo enzima di restrizione riconosce una sequenza di almeno otto basi nucleotidiche.

8. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo la rivendicazione 7 in cui detto terzo enzima di restrizione è l'enzima NotI.

9. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui n è maggiore o uguale a 10.

10. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo la rivendicazione 9 in cui n è compreso tra 10 e 20, inclusi.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

11. Metodo per l'amplificazione in vitro e l'espressione in cellule di mammifero di una sequenza codificante secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui l'introduzione ddi detta miscela di polimeri nelle cellule ospiti avviene a mezzo di una delle seguenti procedure: precipitazione in calcio-fosfato, lipofectina, elettrotrasfezione.

12. Corredo diagnostico per attuare il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti comprendente:

- detto primo vettore di clonaggio;
- frammento purificato di DNA comprendente detta seconda cassetta;
- detto secondo enzima di restrizione;
- tampone di digestione per detto secondo enzima di restrizione;
- detto terzo enzima di restrizione;
- tampone di digestione per detto terzo enzima di restrizione.

13. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 12 comprendente:

- vettore di clonaggio pSfiSV19
- frammento purificato Sfil-Sfil del plasmide pSfiSVneo (seconda cassetta)
- enzima Sfil
- tampone di digestione per Sfil, 10x
- enzima NotI
- tampone di digestione per NotI, 10x
- polimeri ligati di controllo, per elettroforesi in campo pulsato

Ing. Barzani G. Riccardo
Roma s.p.a.

- marcatori di peso molecolare, per elettroforesi in campo pulsato
- manuale di istruzioni.

Roma, - 1 GIU. 1994

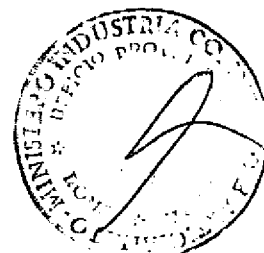
p.p.: Fondazione Centro San Romanello Del Monte Tabor
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A

OC

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

Talierno

*Ing. Barzano & Zanardo
Roma s.p.a.*



1/7

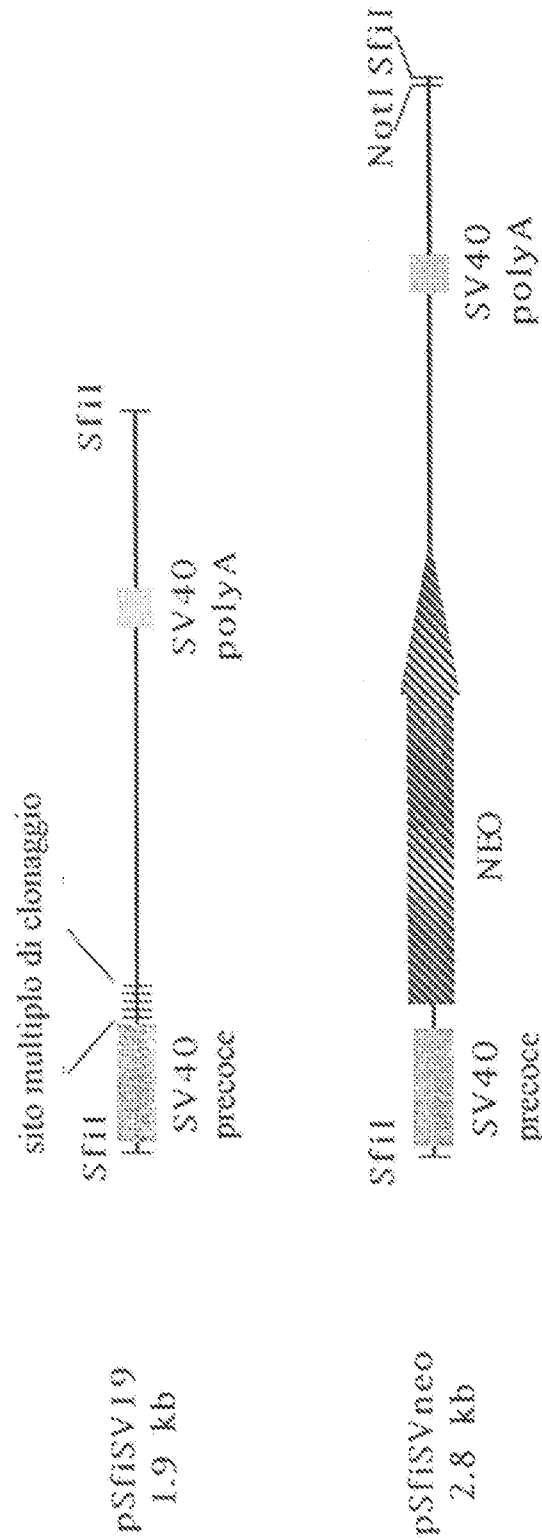
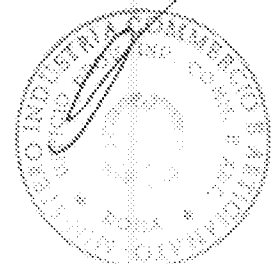


FIG. 1

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

Carlo Luigi Iannone

UN MANDATO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 468)



2/7

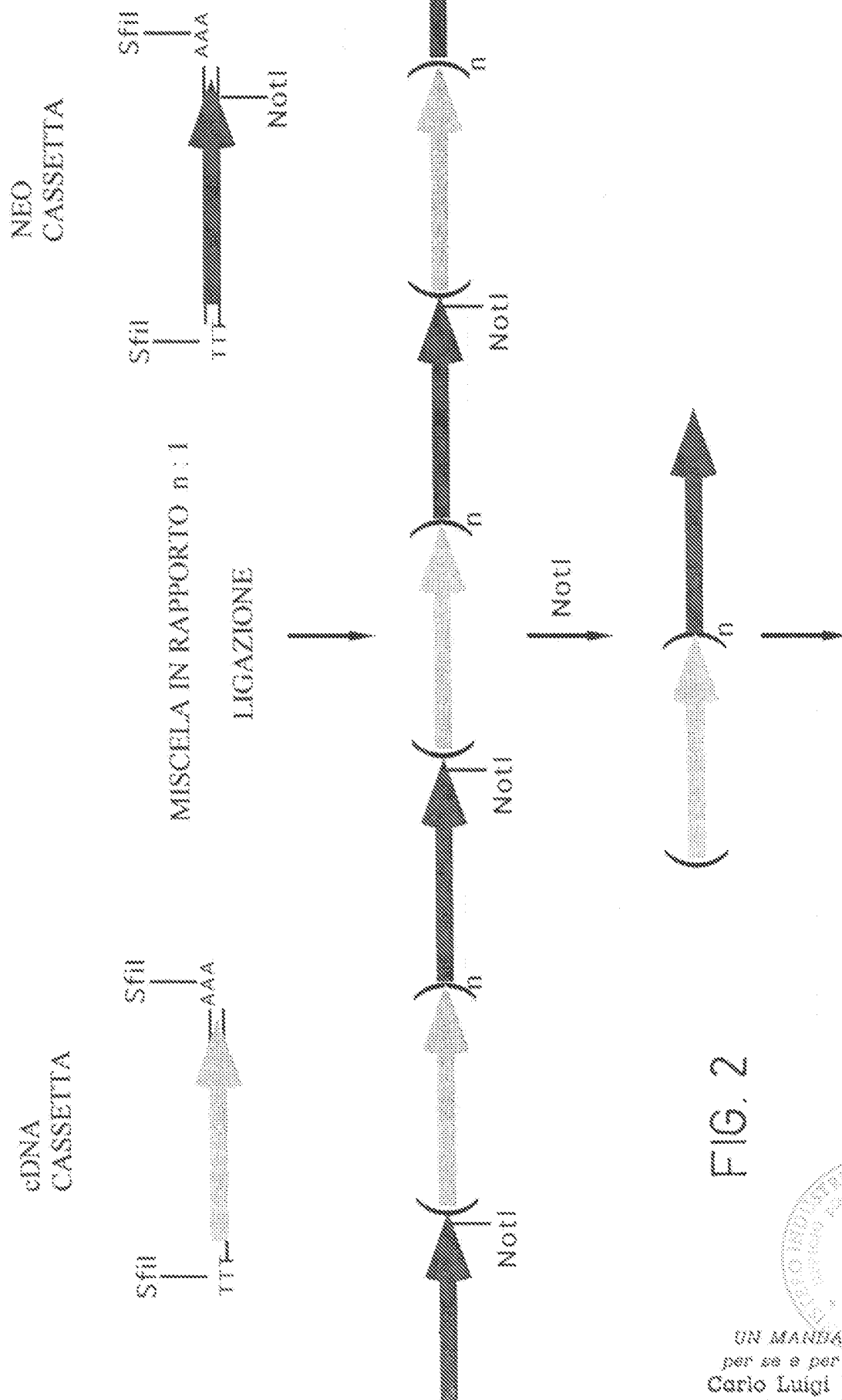
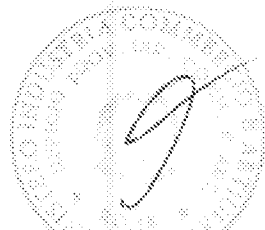


FIG. 2

UN MANDATARIO
per sa e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'istr/488)



Carlo Luigi Iannone

3/7

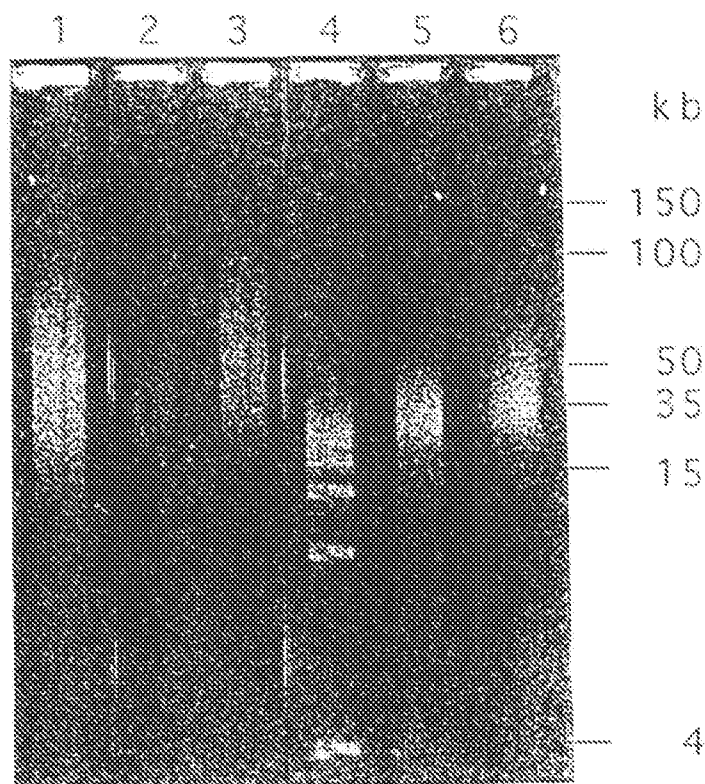
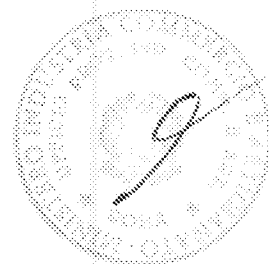


FIG. 3

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

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 488)

Carlo Luigi Iannone



4/7

% di attività CAT

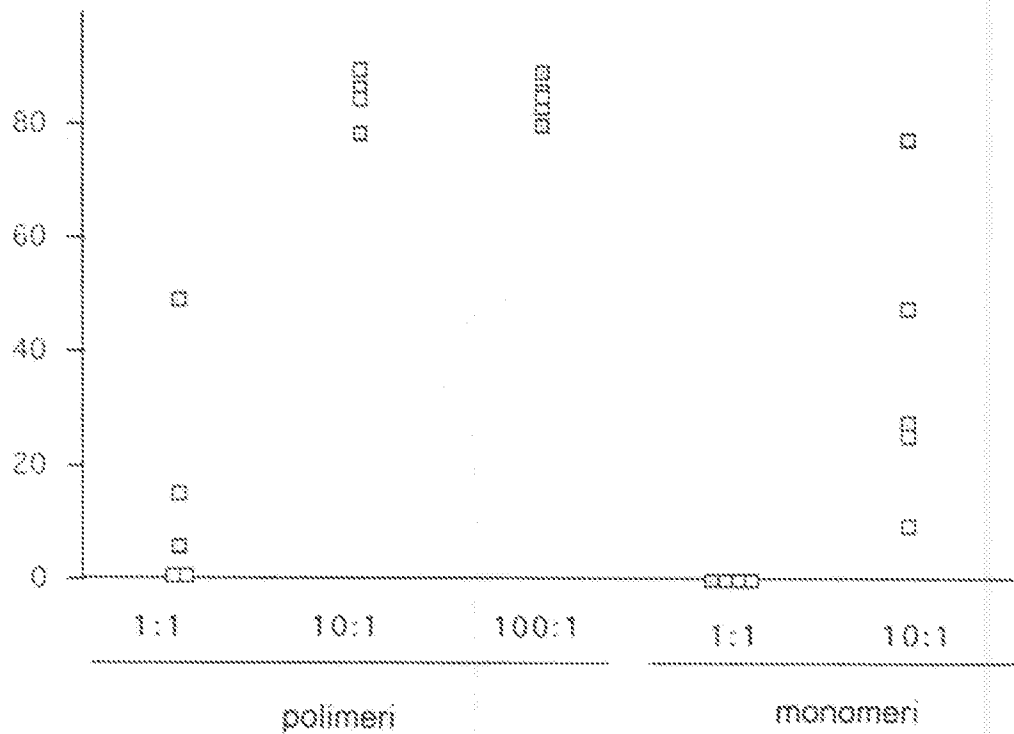
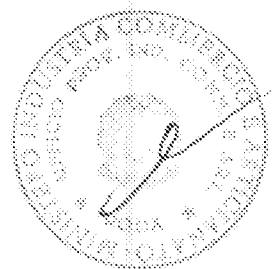


FIG. 4

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

MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(3° d'iscr. 426)



5/7

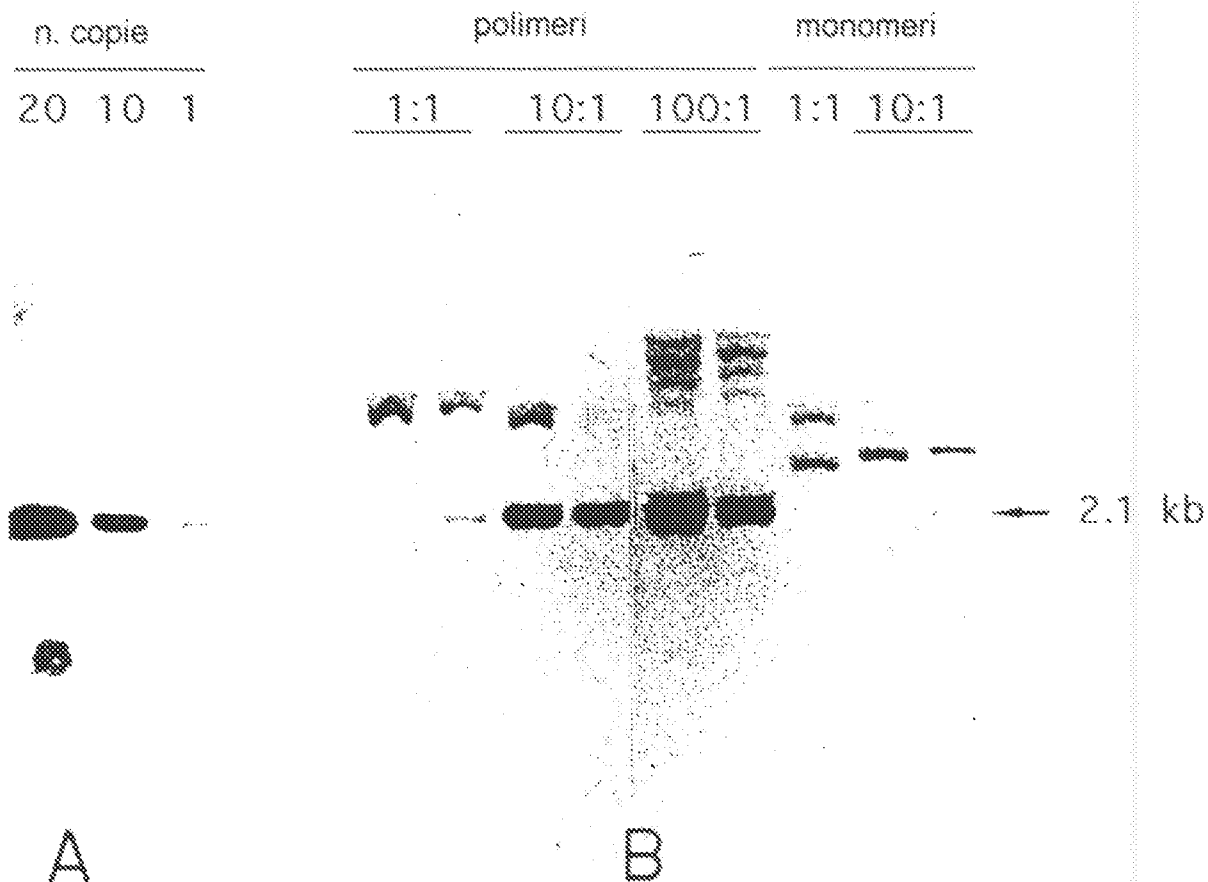
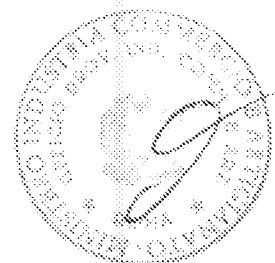


FIG. 5



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

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'act. 486)

6/7

% di attività CAT

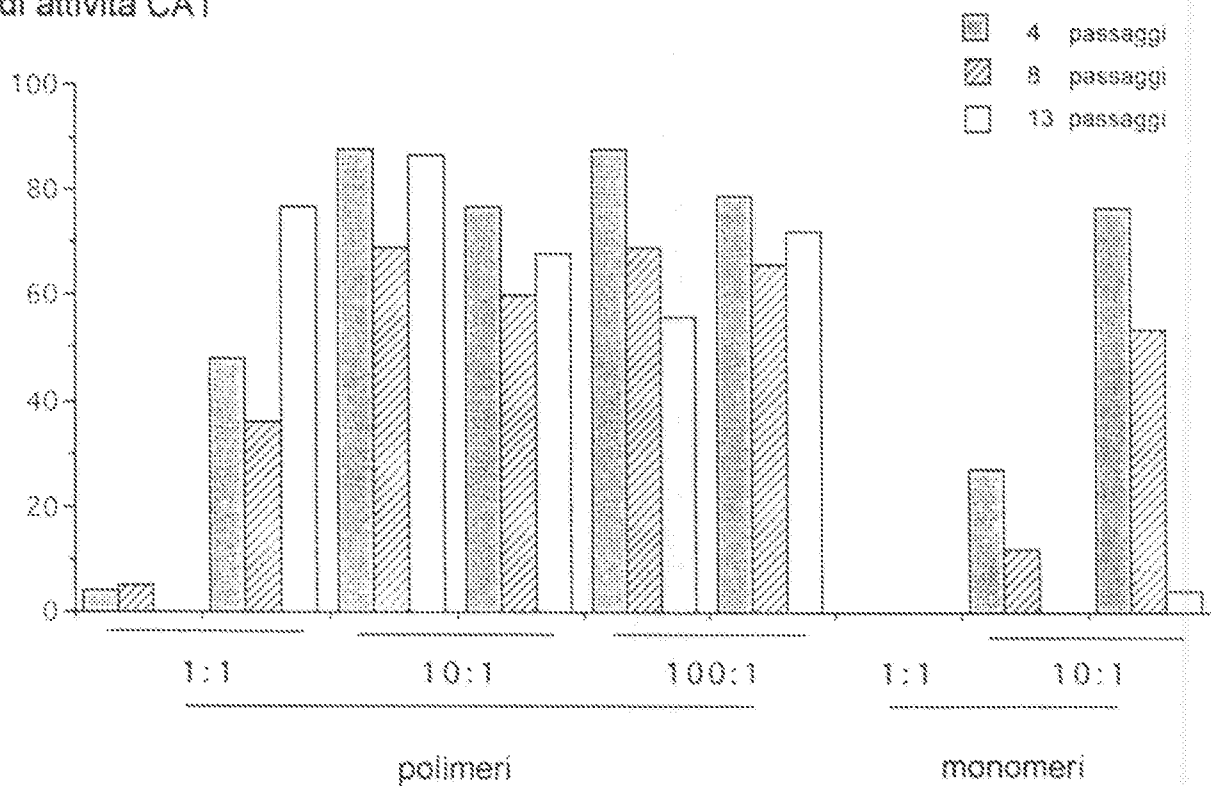
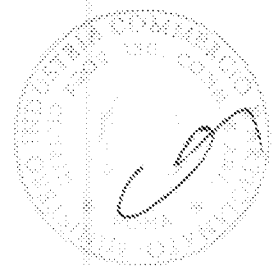


FIG. 6



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

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 486)

7/7

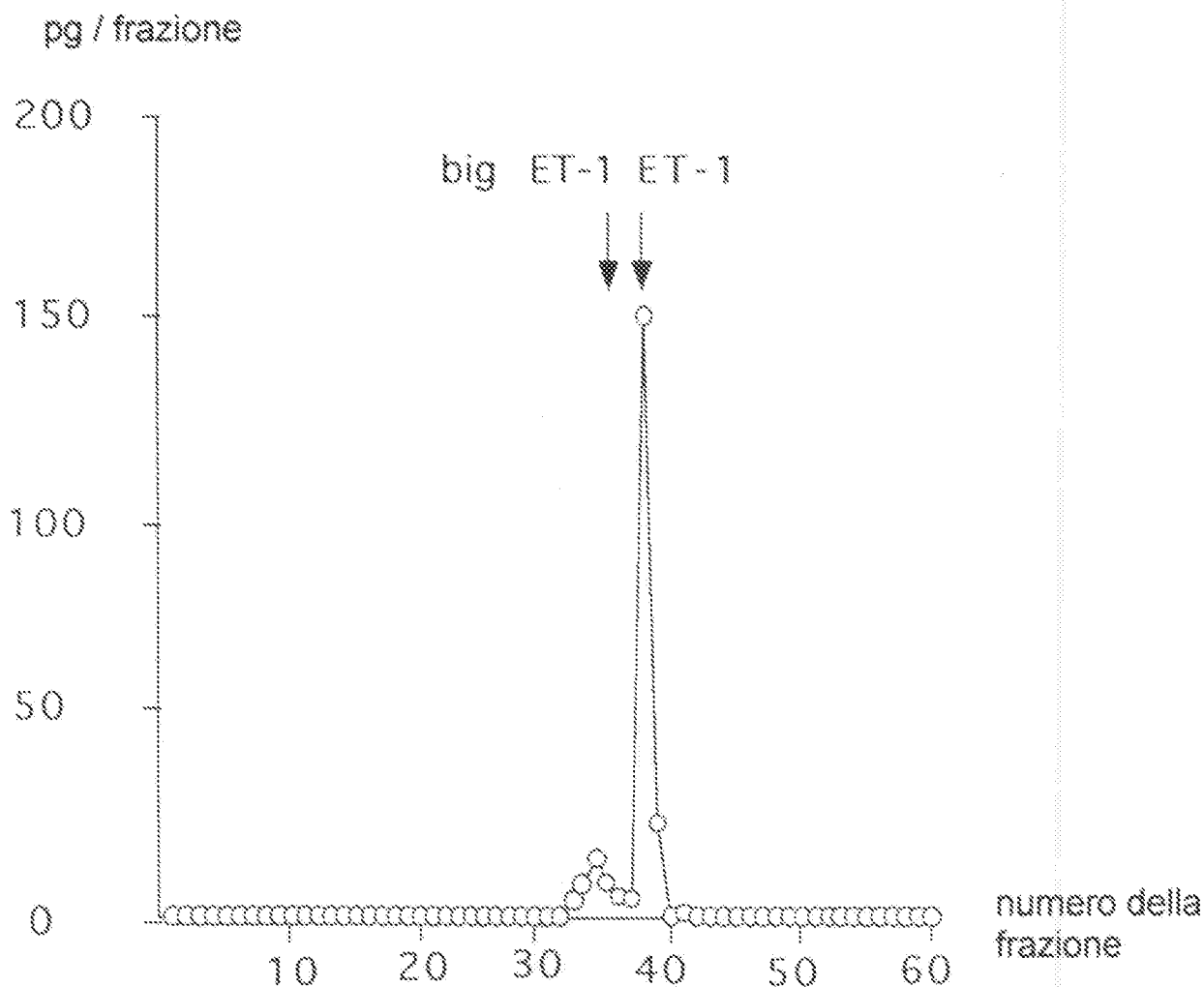
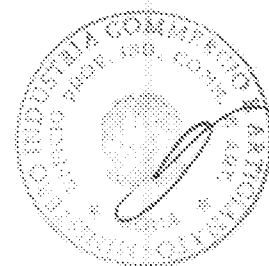


FIG. 7



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 456)

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

[Handwritten signature]