



Office de la propriété
intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An Agency of
Industry Canada

(11) © **1,341,258**

(21) 595,347

(22) 1989/03/31

(45) 2001/06/19

(52) 195-1.20
C.L. CR 195-1.235
195-1.35

(51) Int.Cl. ⁷ C12N 15/00

(19) (CA) **BREVET CANADIEN** (12)

(54) **Rétrovirus Recombinant Défectif et son Utilisation pour l'Intégration de Séquences Codantes pour des Protéines Déterminées dans le Génome de Cultures Cellulaires**

(72) Heidmann, Thierry, France
Nicolas, Jean-François, France

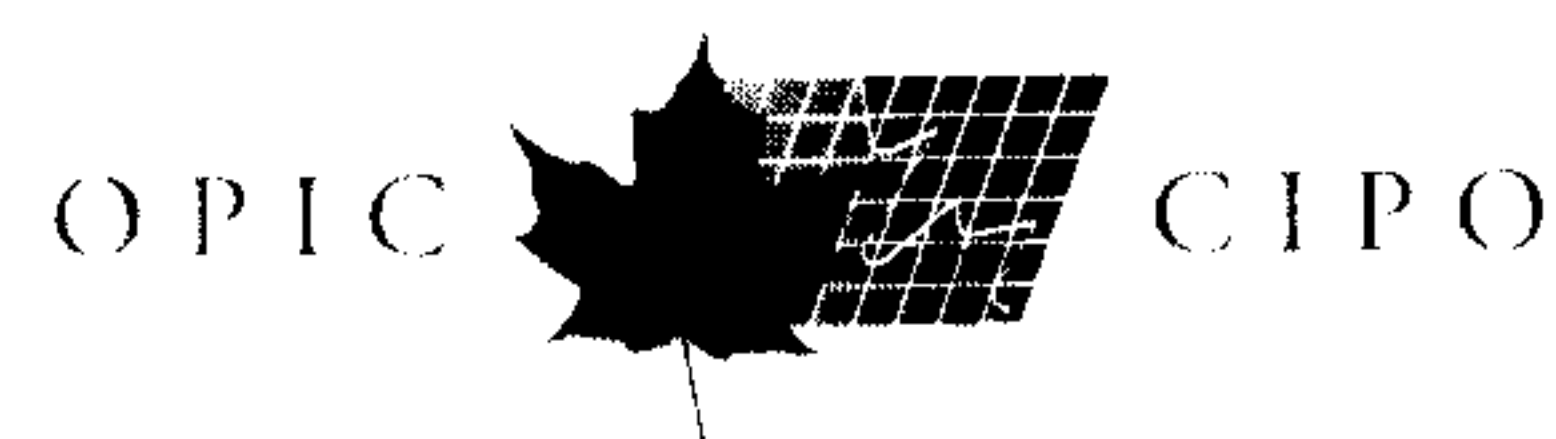
(73) INSTITUT PASTEUR, France
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE
MÉDICALE, France

(30) (FR) France 88 04332 1988/03/31

(57) 13 Revendications

Canada

<http://opic.gc.ca> • Ottawa-Hull K1A 0C9 • <http://cipo.gc.ca>
OPIC • CIPQ 191



134 1258 -

RÉTROVIRUS RECOMBINANT DÉFECTIF ET SON UTILISATION POUR
L'INTÉGRATION DE SÉQUENCES CODANTES POUR DES PROTÉINES
DÉTERMINÉES DANS LE GÉNOME DE CULTURES CELLULAIRES

ABREGE

L'invention concerne un rétrovirus recombinant défectif contenant une séquence codante pour une protéine déterminée dans le génome des cellules. L'ADN du rétrovirus recombinant contient la séquence codante pour la protéine intercalée entre un site accepteur d'épissage et un site donneur d'épissage, l'ensemble étant placé sous le contrôle d'un promoteur approprié, et ceci dans des conditions telles que l'infection desdites cellules par ce rétrovirus recombinant s'accompagne de l'incorporation de la séquence codante pour la protéine dans le génome des cellules infectées.

(Fig. 1)

RÉTROVIRUS RECOMBINANT DÉFECTIF ET SON UTILISATION POUR
L'INTÉGRATION DE SÉQUENCES CODANTES POUR DES PROTÉINES
DÉTERMINÉES DANS LE GÉNOME DE CULTURES CELLULAIRES

5

L'invention concerne des moyens permettant
l'intégration de séquences codantes pour des protéines
déterminées dans le génome de cellules de lignées cel-
lulaires eucaryotes, notamment de mammifères, plus
particulièrement de lignées cellulaires infectables par un
rétrovirus sauvage.

Plus particulièrement, l'invention concerne
l'intégration de telles séquences codantes, dans des
conditions telles qu'elles puissent être exprimées au sein
même de ces lignées cellulaires infectées.

Dans sa forme finale, les moyens selon l'invention
consistent en un rétrovirus recombinant défectif dérivé
d'un rétrovirus sauvage ou natif capable d'infecter l'hôte
cellulaire concerné, ce rétrovirus contenant les parties
correspondant à celles qui, dans ce rétrovirus, agissent
en "cis" du virus sauvage et assurent normalement l'empa-
quetage du rétrovirus, sa reverse-transcription en une
molécule ADN et son intégration dans le génome de la cel-
lule-hôte, ainsi que le site de polyadénylation de cet
ARN, ce rétrovirus recombinant étant plus particulièrement
caractérisé par la substitution à la partie déléetée d'une
séquence hybride de rétrotransposition comportant une
séquence d'ADN codant pour un polypeptide déterminé sous
le contrôle direct d'un promoteur intérieur à cette sé-
quence hybride de rétrotransposition et reconnaissable par
une polymérase de l'hôte cellulaire infectable par le
susdit rétrovirus natif, cette séquence hybride de

35

5 rétrotransposition étant elle-même placée sous le contrôle d'un promoteur extérieur à cette séquence hybride de rétrotransposition et inclus dans le génome du rétrovirus défectif, ce rétrovirus recombinant défectif étant caractérisé en ce que les positions relatives de la séquence
10 codante à l'intérieur de la séquence hybride de rétrotransposition et du promoteur extérieur sont telles que la transcription et l'expression de ladite séquence codante, sous le contrôle du promoteur intérieur, dans un hôte cellulaire infecté par ledit rétrovirus recombinant défectif, soit susceptible d'être effectuée dans une direction inverse vis-à-vis de la direction de transcription de la séquence hybride de transposition sous le contrôle dudit promoteur extérieur.

15 Le rétrovirus recombinant défectif ainsi défini peut être mis en oeuvre aux fins indiquées ci-dessus par un procédé comprenant l'infection avec ce rétrovirus recombinant de cellules de mammifères infectables par le rétrovirus natif correspondant et, le cas échéant, la récupération des cellules dans lesquelles la séquence co-
20 dante est exprimée.

Du fait de son caractère défectif, le rétrovirus recombinant selon l'invention ne peut se répliquer dans ces cellules tout en conservant son caractère infectieux à leur égard. Il peut également s'intégrer sous forme de
25 provirus dans le génome des cellules-hôtes. La séquence codante contenue dans la séquence hybride de rétrotransposition peut alors être exprimée sous le contrôle du "promoteur intérieur" à la séquence hybride de rétrotransposition.
30

Le promoteur intérieur peut être constitué par tout promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte infectieux, par exemple un promoteur de SV40 ou de thymidine kinase, dans le cas de cellules appartenant à des
35 lignées de cellules de mammifères supérieurs, par exemple humaines ou de hamsters (par exemple cellules CHO).

Un rétrovirus recombinant défectif conforme à un mode de réalisation préféré de l'invention est caractérisé en ce que le promoteur extérieur distinct est celui de la région LTR^{5'} du rétrovirus correspondant.

5 Plus particulièrement, le génome d'un rétrovirus recombinant défectif de ce type comprend successivement :

- la région LTR^{5'} du rétrovirus sauvage correspondant suivie de la région d'empaquetage ;
- le site d'initiation de l'ARN correspondant aux
10 protéines virales normalement codées par les gènes gag, pol et env ;
- la séquence hybride de retransposition dans l'orientation sus-définie, en lieu et place de tout ou partie de la région rétrovirale comportant ces gènes gag,
15 pol et env, cette séquence hybride de rétrotransposition étant placée sous le contrôle d'un promoteur extérieur approprié inclus dans le génome du rétrovirus, le cas échéant de la région LTR^{5'} elle-même ;
- la région LTR^{3'}, qui coïncide avec le site de
20 polyadénylation du rétrovirus sauvage correspondant.

L'invention concerne plus particulièrement des ADNs recombinants (et parties d'ADNs recombinants) permettant la production des susdits rétrovirus recombinants défectifs, ainsi qu'un procédé de fabrication des rétro-
25 virus recombinants susdits.

Au titre d'un ADN recombinant (ci-après désigné sous l'expression "ADN de rétrovirus recombinant défectif"), lui-même dérivé d'un rétrovirus sauvage ou natif utilisable pour la production du susdit rétrovirus
30 recombinant défectif, on mentionnera plus particulièrement un ADN contenant les parties correspondant à celles qui agissent en "cis" du virus sauvage et assurent normalement l'empaquetage de ce rétrovirus, sa reverse-transcription en une molécule ADN et son intégration dans le génome de

la cellule-hôte, ainsi que le site de polyadénylation de cet ARN, cet ADN de rétrovirus recombinant étant plus particulièrement caractérisé par la délétion d'une région correspondant à au moins une partie sinon de la totalité des séquences codant pour les protéines virales du virus sauvage ou natif, la partie délétée étant suffisamment importante pour que soit interdite la réplication du rétrovirus défectif susceptible d'être produit dans une cellule-hôte compétente correspondante transformée avec cet ADN de rétrovirus recombinant défectif, celui-ci étant caractérisé par la substitution à la partie délétée d'un gène recombinant dont la structure est définie ci-après et qui est susceptible d'être transcrit sous le contrôle d'un promoteur distinct inclus dans l'ADN de rétrovirus recombinant, cependant extérieur vis-à-vis de ce gène recombinant.

Ce gène recombinant est plus particulièrement caractérisé par le fait qu'il contient une séquence codant pour le peptide déterminé recherché, celle-ci étant - à l'intérieur de ce gène recombinant - placée en aval d'un promoteur intérieur dans la direction de transcription imposée par ledit promoteur et en outre caractérisé par l'intercalation entre ledit promoteur intérieur et ladite séquence codante d'un fragment hybride comprenant lui-même une séquence apte à bloquer ladite transcription, cette séquence bloquante étant elle-même, au sein de ce fragment hybride, flanquée à ses deux extrémités opposées d'un site donneur d'épissage du côté de la séquence codante, d'une part, et d'un site accepteur d'épissage du côté du susdit promoteur, d'autre part. Les susdits éléments intercalaires interdisent par conséquent la transcription de la séquence codante sous le contrôle du promoteur intérieur susdit. En revanche lorsque ce gène recombinant est dans son entier placé sous le contrôle d'un promoteur extérieur

distinct du précédent, dans des conditions telles que ce gène recombinant puisse (en l'absence de codon d'interruption) être transcrit dans une direction inverse (direction reverse) à celle imprimée par le promoteur intérieur, on obtient que dans un hôte cellulaire compétent le gène recombinant entier soit transcrit sous le contrôle du promoteur extérieur en un ARN messager dont est excisée la région intercalaire entre le promoteur intérieur et la séquence codante, c'est-à-dire la région contenant la séquence bloquante, flanquée à ses deux extrémités opposées des susdits sites donneurs et accepteurs d'épissage. Dans l'ARN messager obtenu, la séquence d'ARN correspondant à la séquence codant pour le polypeptide déterminé est alors placée sous le contrôle direct de la région correspondant à la région promotrice interne.

Ledit gène recombinant est inséré dans l'ADN de rétrovirus recombinant défectif, de façon telle que l'orientation de ce gène recombinant au sein de l'ADN rétroviral, d'une part, et les positions relatives de ce gène recombinant et du promoteur extérieur, d'autre part, soient telles que la transcription dudit gène recombinant sous le contrôle de ce promoteur extérieur soit susceptible d'être effectuée dans des cellules-hôtes d'assurer la production du rétrovirus recombinant défectif ainsi constitué dans une direction inverse de celle sous laquelle s'effectuerait la transcription de la séquence codante pour le peptide recherché, si elle n'en était pas empêchée par la séquence intercalée susdite.

Partant alors d'un tel ADN de rétrovirus recombinant défectif, il est possible de produire le susdit rétrovirus recombinant défectif par transfection d'une lignée cellulaire auxiliaire contenant, incorporées à son propre génome :

- une séquence nucléique (ci-après dénommée "séquence de complémentation") capable de suppléer à

l'absence dans le vecteur recombinant défectif des séquences codant pour les protéines virales autorisant sa propagation dans les cellules qu'il est susceptible d'infecter ;

5 - la culture de la lignée cellulaire auxiliaire ainsi transfectée dans des conditions permettant la réplication de ce rétrovirus recombinant in situ, grâce à l'apport par complémentation "en trans" des protéines virales codées par la susdite "séquence de complémen-
10 tion" ;

 - la récupération du virus recombinant défectif produit dans le surnageant de culture de ladite lignée cellulaire auxiliaire.

 En particulier, la séquence de complémentation
15 contient plus particulièrement la partie de l'ADN génomique du rétrovirus sauvage correspondant, codant notamment pour les protéines virales, à savoir les gènes gag, pol et env du rétrovirus sauvage correspondant, dont le rétrovirus recombinant défectif est lui-même dépourvu.

20 La transcription du susdit gène recombinant, sous l'effet du promoteur extérieur contenu dans l'ADN de rétrovirus défectif, comme suite à une transfection d'un hôte cellulaire compétent, dans les conditions qui ont été indiquées plus haut, permet alors la fabrication du rétro-
25 virus recombinant défectif correspondant, dans lequel la séquence codant pour le polypeptide déterminé se trouve placée sous le contrôle direct du promoteur intérieur sus-défini.

 La "séquence bloquante" contenue dans le gène
30 recombinant tel qu'il a été défini plus haut est avantageusement constituée par un site de polyadénylation . Il va de soi que toute autre séquence bloquante peut être utilisée. Elle peut être constituée par une séquence comportant plusieurs codons d'initiation et d'arrêt dans
35 la direction de transcription imposée par le promoteur

intérieur. Il va de soi que dans ce qui précède les enchainements de nucléotides dont est formé ledit gène recombinant sont, le cas échéant, choisis de façon telle que la totalité du gène recombinant puisse être transcrit à partir d'un promoteur extérieur dans la susdite direction reverse.

Avantageusement le gène recombinant, tel qu'il a été défini plus haut, est placé dans les conditions sus-indiquées à l'intérieur de l'ADN rétroviral défectif, sous le contrôle d'une région promotrice correspondant à la région LTR^{5'} du rétrovirus sauvage. Un ADN rétroviral recombinant défectif préféré de l'invention comprend par conséquent et successivement :

- la région LTR^{5'} du rétrovirus sauvage correspondant, suivie de la région d'empaquetage ;
- le site d'initiation de l'ARN correspondant aux protéines virales normalement codées par les gènes gag, pol et env ;
- le gène recombinant susdéfini dans l'orientation susdéfinie, en lieu et place de tout ou partie de la région rétrovirale comportant ces gènes gag, pol et env, ce gène recombinant étant placé sous le contrôle d'un promoteur extérieur approprié, le cas échéant de la région LTR^{5'} elle-même ; et
- la région LTR^{3'}, qui coïncide avec le site de polyadénylation de l'ARN du rétrovirus sauvage correspondant.

Dans l'une des applications préférées de l'invention, la séquence codante placée sous le contrôle du promoteur intérieur dans le gène recombinant susdit, code pour une protéine toxique à l'égard de cellules susceptibles d'être infectées par le rétrovirus. On appréciera qu'à l'occasion de la production du rétrovirus recombinant défectif dans les susdites lignées cellulaires auxiliaires, celles-ci seront en fait protégées contre la protéine toxique, en raison du blocage de la transcription de cette

séquence codante sous l'effet du promoteur intérieur à ce gène recombinant, en raison de l'intercalation de la séquence de blocage. En revanche, des cellules infectables par le rétrovirus natif, et naturellement également par le rétrovirus recombinant défectif selon l'invention, peuvent devenir sensibles, voire être détruites, lorsque ces cellules ayant été infectées avec le rétrovirus recombinant défectif, on assure l'intégration du provirus qui en résulte dans le génome desdites cellules et obtient l'expression de la séquence codante sous le contrôle du promoteur intérieur.

D'autres séquences codantes peuvent naturellement être incorporées dans le rétrovirus recombinant défectif ci-dessus décrit. Il s'agit par exemple de marqueurs. L'invention fournit alors dans ce cas une technique de marquage de cellules susceptibles d'être infectées par un rétrovirus correspondant à un rétrovirus sauvage déterminé, la séquence codante se comportant alors comme un "indicateur" de la possibilité de ces cellules d'être infectées.

Une autre application de l'invention s'adresse à la destruction sélective de cellules cancéreuses au sein d'un tissu sain, en particulier lorsque les cellules cancéreuses portent un antigène spécifique à ces cellules cancéreuses. Cette destruction sélective devient possible dès lors que l'on dispose d'anticorps reconnaissant, d'une part, les antigènes spécifiques de ces cellules cancéreuses et, d'autre part, des protéines virales du rétrovirus recombinant et enfin, lorsque ces anticorps ayant été fixés sur les antigènes et protéines virales en question, on les amène en contact étroit, avec possibilité d'internalisation du virus défectif dans les cellules cancéreuses, par l'intermédiaire d'une deuxième catégorie d'anticorps contenant les deux premiers types d'anticorps.

D'autres caractéristiques de l'invention appa-

tront encore au cours de la description qui suit d'essais visant à démontrer le caractère opérationnel de rétrovirus recombinants défectifs conformes à l'invention, et ce à l'aide des dessins, dans lesquels :

5 Les figures 1A et 1B montrent de façon schématique les structurations d'un gène recombinant conforme à l'invention et son insertion dans un vecteur rétroviral défectif.

10 La figure 2 représente schématiquement les étapes successives de l'intégration, sous forme de provirus, d'un rétrovirus recombinant défectif, obtenu à partir de l'ADN recombinant de la figure 1, dans une cellule infectée et les étapes de sa transcription en ARN messenger et sa reverse-transcription, puis intégration dans le génome, de
15 la cellule infectée.

Les figures 3 et 4 sont des représentations schématiques de fractionnement sur gel des différents fragments d'ADNs testés, après digestion des ADNs extraits des cellules infectées par diverses enzymes de restriction.

20 Les expérimentations dont la description suit ont ont été effectuées en mettant en oeuvre un provirus défectif dérivé du rétrovirus Moloney leucémique de souris, dont la structure est représentative de la plupart des rétrovirus capables d'infecter des cellules de mammifères supérieurs. L'homme du métier comprendra que les essais
25 dont la description suit peuvent être étendus de la même façon à d'autres types de rétrovirus.

Une description plus détaillée des figures facilitera la compréhension de la description qui suit des essais qui suivent :

30 figure 1 : Les éléments de base pour la détection de la rétrotransposition.

(A) La structure de (néo)^{RT}, un gène indicateur pour la rétrotransposition, y est représenté. Ce gène indicateur
35 correspond au "gène recombinant" incorporé, destiné à

être incorporé en lieu et place de l'une des régions qui, dans le génome du rétrovirus natif, code pour ses protéines structurales, en particulier le gène ENV. L'orientation de chaque élément génétique est indiquée
5 par des flèches dans les bandes :

tk représente le promoteur du gène de la thymidine kinase de HSV ;

polyA représente la séquence de polyadénylation du gène précédemment cité ;

10 neo représente la séquence du gène codant pour la résistance à la néomycine ;

S.D. et S.A. représentent respectivement les sites d'épissage donneur et accepteur.

15 En (B) est montrée la structure de pMo-MLV-(neo)^{RT} du rétrovirus recombinant, dans lequel le gène recombinant susdit a été incorporé ; la partie rétrovirale de la construction provient du provirus pMov3 cloné ; la figure montre également les fragments neo (fragment "indicateur" du rétrovirus recombinant dans
20 lequel le gène recombinant susdit a été incorporé) et polyA (séquence de blocage).

En (A) et (B) les sites de restriction utilisés pour la construction des plasmides sont marqués avec un astérisque lorsqu'ils sont éliminés.

25 La figure 2 représente les étapes successives de la production du rétrovirus défectif selon l'invention, impliquant le passage par une transcription de l'ADN rétroviral recombinant en ARN (ARNg épissé) pour aboutir au provirus qui s'intègre dans le génome d'une
30 cellule infectée par le rétrovirus recombinant défectif.

Figure 3 : Analyse par la technique de "Southern blot" de l'ADN du genome des cellules G418-résistantes infectées avec le virus obtenu à partir de cellules transfectées avec pMo-MLV(neo)^{RT}.
35

Les cellules provenant du clone 3T3gptMo(neo)-
RT-A (un clone 3T3 obtenu par transfection de pSV2gpt et
pMo-MLV(neo)^{RT} ont été infectées avec les virus Mo-MLV ;
après sept jours le surnageant a été récupéré, et 100 μ l
5 de ce surnageant ont été utilisés pour infecter 10^4 cel-
lules test 3T3 ; deux jours plus tard les cellules ont
été soumises à une sélection en présence de G418. Les
cellules G 418-résistantes ont été analysées soit sous
forme d'une population de clones mélangés (population
10 3T3 Mo(neo)^{RT}), soit sous forme de clones individuels
(3T3 Mo(neo)^{RT} cl1 à cl17).

Les enzymes de restriction utilisées sont XbaI
(X), ou XbaI+SacI (X+S). Elles ont permis de vérifier
que l'épissage s'est correctement effectué. 10 ou 25 μ g
15 d'ADN ont été utilisés (deux premières bandes). Les
filtres ont été hybridés avec, soit la sonde neo (frag-
ment BglII-SmaI,A), soit la sonde polyA (fragment SmaI-
NcoI,B).

Figure 4 : Analyse par Southern blot de l'ADN du genome
20 de cellules résistantes à G418 isolées à partir de
clones transfectés avec 3T3gptMo(neo)^{RT} ; séquence d'une
jonction d'épissage.

(A et B) 10^7 cellules provenant des clones 3T3gptMo-
(neo)^{RT} A et B ont été soumises à une sélection en pré-
25 sence de G 418 (10^6 cellules / 10 cm de plaque). 0-2
clones résistant à G418 par plaque sont obtenus (voir
par exemple 3T3 gptMo(neo)^{RT} clone A-1 à A-5, et clone
cl1 B-1) ; l'ADN a été analysé comme décrit à propos de
la figure 2, après restriction à l'aide de XbaI et
30 XbaI+SacI afin de tester que l'épissage est correctement
effectué. Les nouvelles copies dans le clone B-1 et dans
le clone A-5 co-migrent avec respectivement les frag-
ments XbaI de 2,6kb et de 2.7kb des clones Mo(neo)^{RT} cl3
(*) et cl2(**) de la figure 3. Les filtres ont été
35 hybridés avec la sonde neo (A) ou la sonde polyA (B).

(C) Jonction d'épissage dans une copie provi-
rale transposée de pMo-MLV(neo)^{RT}.

Le fragment XbaI de 2.7kb provenant de l'ADN
de 3T3 gptMo(neo)^{RT}-A-5 a été cloné dans λ gt10, et un
5 fragment de 662 paires de bases, délimité par le site
PvuII situé dans la région neo codante et par le site
EcoRI situé dans le promoteur tk, a été sous-cloné dans
M13 et séquencé. Le nouveau site SacI apparu au niveau
de la jonction d'épissage est indiqué.

10 1) Matériels et méthodes

a) Constructions des plasmides

Afin de construire l'indicateur de rétro-trans-
position (neo)^{RT}, la séquence codant pour la polyadényla-
tion du gène de la thymidine kinase du virus Herpès
15 Simplex a été isolée à partir du plasmide pAGO
(COLBERE-GARAPIN, F. et al, J. Mol. Biol., 150, 1-14
(1981)) sous forme d'un fragment SmaI-NcoI de 310 paires
de bases de longueur, et a été insérée au niveau de
l'unique site BamHI du plasmide pZip(CEPKO, C. L., et al,
20 Cell. 37, 1053-1062 (1984)), entre les sites d'épissage
donneur et accepteur de Moloney, après traitement par
l'enzyme de Klenow des deux fragments. Le fragment
contenant la séquence de polyadénylation et les sites
d'épissage, a ensuite été isolé à partir d'un fragment
25 KpnI-KpnI, et inséré entre le promoteur SVtk et la région
codante pour le gène (neo) au niveau du site BglII de
pSVtk-neobeta (NICOLAS, J. S. et BERG, P., in Cold Spring
Harbor Conferences on Cell Proliferation, eds. Silver,
L.M. MARTIN, G.R & Strickland, S. S., 10, 469-485 (1983)),
30 après traitement par l'enzyme de Klenow des deux frag-
ments ; le gène indicateur neo^{RT} (fig. 1A) a été isolé à
partir d'un fragment HindIII-SmaI.

De manière à supprimer les gènes env dans le
plasmide pMov3 (HARBERS, K., et al, Proc. Natl. Acad.
35 SCI., USA, 78, 7609-7613 (1981)), le fragment EcoRI du

plasmide pMVO3 à tout d'abord été recloné dans le fragment EcoRI de 3,4 kb du pSVtk-neobeta ; le fragment BamHI-ClaI (correspondant respectivement aux paires de bases 6537 et 7674 décrites dans RNA Tumor Viruses eds. WEISS, R. TEICH, N., VARMUS, H & COFFIN, J. , 2, 766-767 (1985)) codant pour une partie de la protéine gp70 et pour la protéine entière p15E a alors été éliminé par digestion complète à l'aide de ClaI et par digestion partielle à l'aide de BamHI.

La construction finale (pMo-MLV(neo)^{RT}) a été obtenue par ligature du vecteur pMov3, dont les gènes env ont été supprimés de la manière indiquée ci-dessus, avec le gène indicateur (neo)^{RT} après traitement par l'enzyme de Klenow (fig. 1B).

b) Culture de cellules, transfection et infection

Ces méthodes sont décrites dans JACOB, H. et NICOLAS , J.S., in Methods in Enzymol., 151, 66-81 (1987)). Les cellules utilisées sont NIH 3T3 et FG10 (FINSHINGER et al, Virology, 59, 217-229 (1974)), et les lignées virales utilisées sont la 3T3 Mo-MLV pour Moloney et E4OpsiB pour Mo-MLVneo (RUBEINSTEIN, J.L.R. et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 7137-7140 (1984)). La sélection des cellules résistantes G418 a été réalisée en présence de 600 µg/ml de geneticine (G418), et les cellules contenant pSV2gpt (MULLIGAN, R.C. et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 2072-2076 (1981)) ont été sélectionnées en présence de 25 µg/ml d'acide mycophénolique et 250 µg/ml de Xanthine.

Les infections ont été réalisées comme il est décrit dans JACOB., H et NICOLAS, J.F. (1987) précédemment cité en présence de 5 µg/ml de polybrène.⁽⁸⁾

c) Analyse de l'ADN des cellules

Pour l'analyse de Southern, l'ADN génomique traité par des enzymes de restriction appropriées, a été soumis à une électrophorèse, transféré sur des membranes de nylon

Hybond-N[®] (AMERSHAM), et hybridé à des sondes marquées radioactivement à l'aide de p^{32} (kit MULTIPRIME commercialisé par AMERSHAM).

d) Clonage et séquençage de la jonction du site d'épissage

50 μ g de l'ADN provenant du clone 3T3 gptMo(neo)^{RT}-A-5 a été digéré avec XbaI et soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose à 0,7 %. Une bande d'agarose comprenant des fragments de 2,5 à 2,9 kb a été découpée, et l'ADN extrait par électroélution a été utilisé pour construire une banque génomique partielle dans le vecteur λ gt 10, selon des procédés standards et en ayant recours à des adaptateurs (linkers) EcoRI (HUYNH et al, DNA Cloning, ed. Glover, D.M., N.Y., IRL Press, 1, 49-78 (1985)). Les clones ont été sélectionnés par hybridation avec la sonde neo marquée au p^{32} sur un filtre support. Des fragments PvuII-EcoRI provenant de clones positifs ont été sous-clonés dans le vecteur M13mp10 et séquencés par la méthode décrite dans SANGER, F. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977)).

2) Résultats

a) Principe du test

Le principe du test repose sur l'utilisation d'un gène de sélection qui peut être activé par une transposition médiée par un ARN (fig. 1). Un gène (tkneo) est inactivé en insérant entre le promoteur (tk) et la partie structurelle du gène, un signal et un site pour la polyadénylation (polyA) ; la séquence pour la polyadénylation est entourée sur le brin d'ADN non codant par les sites d'épissage donneur et accepteur (neo^{RT}, fig. 1A). Lorsque la séquence polyA est insérée suivant une orientation opposée dans un rétro-transposon (pMo-MLV(neo)^{RT}, fig. 1B), la transcription réverse de l'ARN neo^{RT} épissé non codant conduit à la formation d'un ADN de structure dans lequel le gène neo est placé sous le contrôle du

promoteur tk. Une cellule contenant une copie rétro-transposée devient par conséquent résistante à G418 (fig. 1C).

5 Dans le gène neo^{RT} (1) l'expression du gène sélectionné doit subsister tant que la région polyA est présente dans la séquence intronique et (2) la suppression de la région polyA devrait créer une structure conférant à une cellule hôte une résistance à G418.

10 Ces deux derniers points et la rétro-transposition non virale des rétrovirus ont été testés par insertion du gène neo^{RT} dans un provirus Mo-MLV cloné et dont les gène codant pour les composants majeurs de l'enveloppe virale ont été supprimés.

15 b) $\text{pMo-MLV(neo)}^{\text{RT}}$ ne confère pas de résistance à G418

Afin de prouver que $(\text{neo})^{\text{RT}}$ satisfait aux deux points précédemment cités, il a été introduit dans des cellules NIH 3T3 par transfection de $\text{pMo-MLV(neo)}^{\text{RT}}$. pSV2gpt a été co-transfecté de manière à isoler des clones
20 dans lesquels $\text{pMo-MLV(neo)}^{\text{RT}}$ n'est pas sélectivement introduit (clones 3T3 $\text{gptMo(neo)}^{\text{RT}}$, et de manière à mesurer les efficacités de transfection.

Dans un premier test d'inactivation du gène neo dans neo^{RT} , la population de cellules transfectées a été
25 directement soumise à une sélection dans un milieu contenant l'antibiotique G418, et le nombre de clones résistants a été comparé à ceux obtenus par transfection d'un plasmide dans lequel le gène neo est actif (pMo-MLVneo , RUBENSTEIN, J.L.R. et al (1984) précédemment cité).
30 $\text{pMo-MLV(neo)}^{\text{RT}}$ ne permet que l'obtention de 0-3 clones résistants à G418 par transfection (3 expériences), alors que plus de 75 clones résistants à G418 sont obtenus avec le plasmide pMo-MLVneo (une sélection parallèle dans un milieu contenant un acide mycophénolique indique que les
35 efficacités de transfection sont identiques (tableau 1)).

L'analyse du type Southern de la structure de 5 clones individuels résistants à G418 indique la présence de ré-arrangements (probablement dus à la transfection) d'un fragment XbaI de 3,5 kb qui contient le gène indicateur (indiqué à la fig. 1a).

Dans un second test, les clones ont été sélectionnés par l'expression de gpt, et 7 d'entre eux contenant un gène (neo)^{RT} non ré-arrangé (voir par exemple les clones 3T3gptMo(neo)^{RT}-A et -B, de la fig. 3) ont été soumis à G418: aucun d'entre eux ne sont résistants à G418 (voir également les paragraphes suivants).

Ces expériences montrent que le gène (neo)^{RT} ne confère pas de résistance à G418, à moins qu'il ne soit ré-arrangé.

15 c) Séquence résultant de la transcription réverse de pMo-MLV(neo)^{RT} confère une résistance à G418

Une fraction de l'ARN produit par pMo-MLV(neo)^{RT} dans les cellules transfectées doit être épissé, et par conséquent ne contient pas la séquence de polyadénylation. Cet ARN conserve les caractéristiques d'un ARN d'un génome viral, qui par un mécanisme de trans-complémentation de produits viraux doit être emballé à l'intérieur de particules virales. Afin de tester si les copies obtenues par transcription réverse (fig. 1C) peuvent conférer une résistance à G418, le surnageant des cellules 3T3gptMo-(neo)^{RT} infectées avec le virus Mo-MLV a été transféré aux cellules test NIH 3T3.

Des colonies résistantes à G418 ont été obtenues à partir de surnageants de 7 clones 3T3gpt(neo)^{RT} transfectés sus-mentionnés. Le titre des surnageants varie de 0,5 à 2×10^3 neo^Rfu/ml. La structure des nouveaux provirus a été analysée par la méthode de Southern (Southern blot).

Comme il est décrit dans la figure 2a, le fragment XbaI contenant (neo)^{RT} observé dans les clones 3T3gptMo(neo)^{RT} avec la sonde neo a une taille réduite dans

la population de cellules infectées (population Mo(neo)^{RT}) ou dans les sous-clones (Mo(neo)^{RT} c11 à c17). On peut observer jusqu'à quatre bandes d'intensités inégales dans la population, deux d'entre elles (de 2,7 et 2,6 kb) étant majoritairement représentées dans les sous-clones. Sur 25 clones infectés et analysés, 8 contiennent la bande de 2,7 kb et 12 la bande de 2,6 kb. Les deux autres bandes observées sont plus petites (2,5 kb et 2,0 kb), et la bande originale 3,5 kb n'a jamais été observée. Aucune de ces quatre bandes ne s'hybrident avec la sonde polyA du domaine intronique (fig. 2b).

La bande de 2,7 kb a été plus particulièrement étudiée afin de déterminer si elle contient le site SacI qui devrait apparaître au site de jonction d'épissage (MANN, R. et al, J. Virol., 54, 401-407 (1985); fig. 1c). Le fragment de 2,7 kb est effectivement réduit à un fragment de 1,9 kb lorsque l'ADN génomique est digéré par les enzymes de restriction XbaI et SacI et soumis à un test d'hybridation en utilisant la sonde neo. Au contraire la bande de 2,6 kb ne contient pas de site sacI, et doit correspondre à des événements d'épissage impliquant des sites cryptiques D-A ou à des réarrangements durant la transcription réverse.

En conclusion, pMo-MLV(neo)^{RT} permet le passage, par l'intermédiaire d'un ARN intermédiaire, à des structures dans lesquelles le gène neo est actif.

d) Rétrotransposition du provirus Moloney env⁻
10⁸ cellules provenant de quatre clones 3T3gpt(neo)^{RT} indépendants ont été soumises à la sélection G418. Dans chaque cas, 1 à 10 clones résistants, sur 10⁷ cellules, ont été obtenus, et leur ADN a été analysé (fig. 3). Ils peuvent être regroupés en deux catégories.

Dans la première (13 clones parmi 37 clones résistants à G418), le fragment XbaI de 3,5 kb (correspondant au plasmide transfecté de la fig. 1A) est remplacé par un

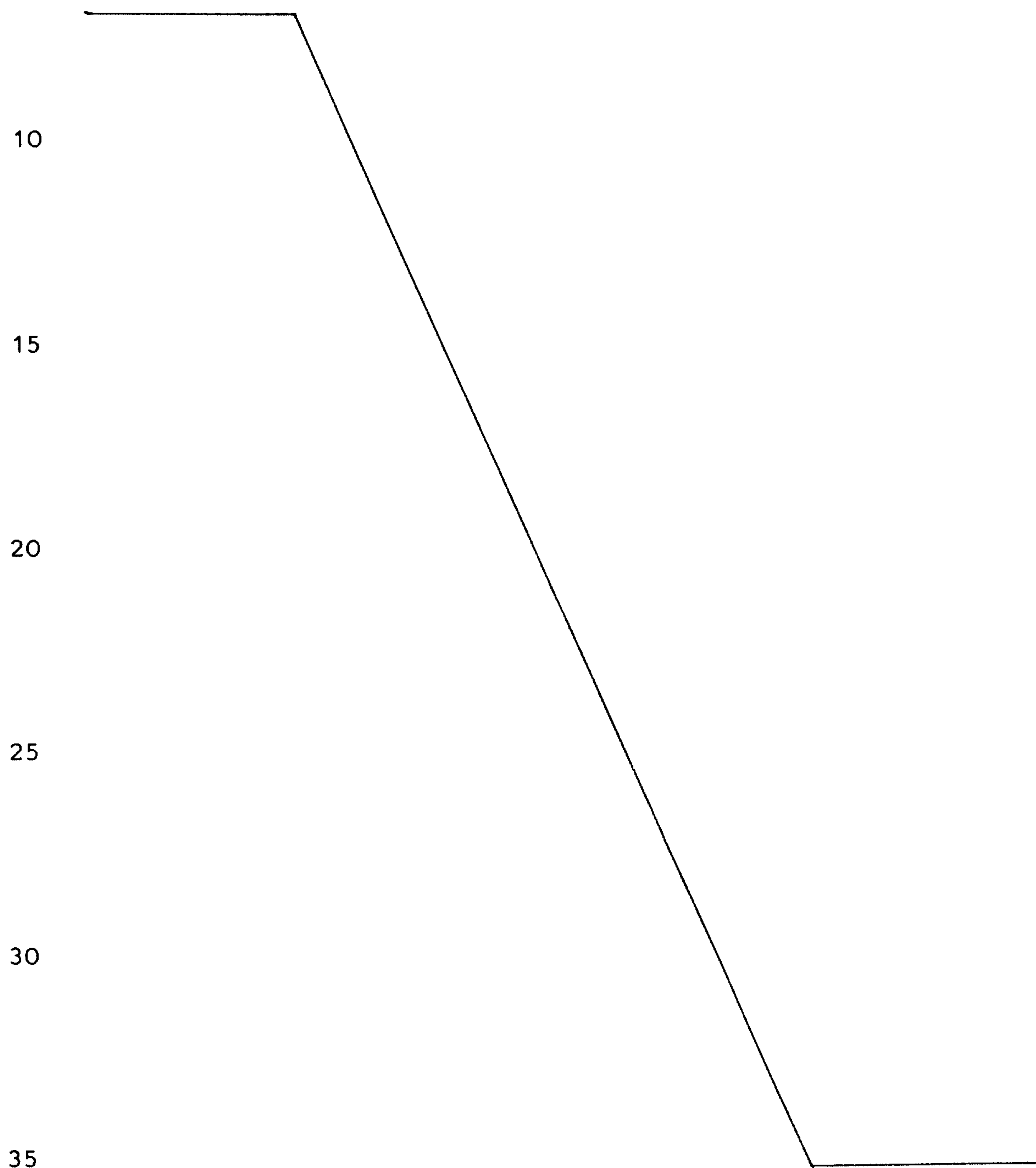
nouveau fragment (fig. 3, c11 et c12), qui ne s'hybride pas avec la sonde intronique polyA (fig. 3B) ; ces clones peuvent donc être considérés comme des réarrangements des copies initiales dans lesquelles au moins la séquence polyA est supprimée.

Dans la seconde catégorie (24 clones parmi les 37 clones analysés), une et parfois deux bandes hybridant avec la sonde neo sont observées en plus de la bande initiale de 3,5 kb des clones transfectés (fig. 3A, clones A-3 à A-5, et B-1). Ces bandes additionnelles ne s'hybrident pas avec la sonde polyA (fig. 3B). Dans plusieurs cas, (respectivement 5 et 2 clones), ces bandes co-migrent soit avec la copie d'épissage de 2,6 kb, soit avec celle de 2,6 kb des clones infectés (fig. 3A, clones A-5, et B-1). La mise en évidence du fait que la bande de 2,7 kb provient de la transcription réverse d'une séquence de transcription correctement épissée du provirus transfecté a été réalisée par digestion de l'ADN par XbaI et SacI qui génère une bande de 1,9 kb (fig. 3A, clone A-5). Cette conclusion est confirmée par le clonage d'un fragment XbaI de 2,7 kb à partir d'un des clones G418 résistant à 64,8 (clone A-5) et par le séquençage du site de jonction d'épissage (fig. 3C).

Il résulte donc des essais qui précèdent que l'on peut obtenir un ARN recombinant qui, après retranscription reverse, produit un ADN recombinant apte à fournir un ARN messenger contenant une séquence d'ARN correspondant à la séquence neo qui peut à son tour être traduite sous le contrôle du promoteur intérieur qui lui est alors associé, à partir du gène neo^{RT} dans un rétrovirus défectif (se comportant comme un rétrotransposon) dans une orientation telle que les sites d'épissage soient contenus dans une séquence nucléique transcrite à partir d'un promoteur extérieur du rétrovirus dans une direction inverse de la direction normale de transcription du marqueur neo, sous

le contrôle du promoteur interne de neo^{RT}.

Il est à remarquer que des lignées transcomplémentantes dans lesquelles le rétrovirus recombinant déficient de l'invention pouvant être produites sont disponibles à l'American Type Culture Collection (ATCC) sous la désignation $\phi 2$.



1. ADN rétroviral recombinant défectif comprenant de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', un LTR en 5', un gène recombinant et un LTR en 3', où ledit gène recombinant contient, de 5' en 3' par rapport à l'orientation du rétrovirus :

une séquence codant pour un polypeptide;

une séquence de polyadénylation qui bloque la transcription de la séquence codant pour ledit polypeptide, une telle séquence de polyadénylation étant flanquée de part et d'autre par un site donneur d'épissage en 5' et un site accepteur en 3' dans lequel ledit site donneur d'épissage et ledit site accepteur d'épissage sont orientés dans le sens inverse de la séquence codant pour ledit polypeptide; et

un promoteur interne reconnu par une ADN polymérase présente dans une cellule hôte eucaryote compétente, un tel promoteur interne contrôlant la transcription de la séquence codant pour ledit polypeptide ;

ledit promoteur interne et la séquence codant pour ledit polypeptide étant insérés dans l'ADN rétroviral recombinant dans une orientation opposée à la direction dudit 5' LTR et dudit 3' LTR.

2. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1 dans lequel ladite séquence codant pour

ledit polypeptide, ladite séquence de polyadenylation, ledit site accepteur d'épissage et ledit site donneur d'épissage sont substitués aux gènes rétroviraux gag, pol et env.

3. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1, dans lequel l'ADN dudit rétrovirus comprend en outre la région d'empaquetage de l'ADN dudit rétrovirus et le site d'initiation de l'ARN correspondant aux gènes rétroviraux gag, pol et env.
4. ADN rétroviral selon la revendication 1 dans lequel les gènes gag, pol, env du rétrovirus correspondant sont absents dans ledit ADN rétroviral recombinant défectif.
5. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1 comprenant en outre un gène marqueur entre un promoteur extérieur et ledit site donneur d'épissage.
6. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 5 dans lequel le gène marqueur est un gène encodant une résistance à la néomycine.
7. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1, dans lequel ladite cellule hôte eucaryote compétente est une cellule hôte de mammifère.
8. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1 dans lequel ledit rétrovirus est un rétrovirus natif.

9. ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1, dans lequel ledit rétrovirus comprend en outre :

des moyens d'emballage dudit rétrovirus;
des moyens pour assurer la transcription inverse, et
des moyens pour l'intégration dans le génome de ladite cellule hôte.

10. Procédé d'incorporation d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide donné dans le génome de cellules infectables par un rétrovirus natif, comprenant la mise en contact desdites cellules avec un ADN rétroviral recombinant défectif selon la revendication 1.

11. Procédé de production d'un rétrovirus recombinant défectif comprenant les étapes suivantes :

la transfection d'une lignée cellulaire auxiliaire avec l'ADN rétroviral recombinant défectif de la revendication 1 ;
la culture de ladite lignée cellulaire auxiliaire transfectée; et
la récupération dudit virus recombinant défectif à partir du surnageant de la culture de ladite lignée cellulaire auxiliaire.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la lignée cellulaire auxiliaire contient un ou plusieurs ADN (s) comprenant les gènes gag, pol et env du rétrovirus correspondant.

13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel un ou plusieurs desdits ADN(s) sont intégrés dans le génome de ladite lignée cellulaire auxiliaire.

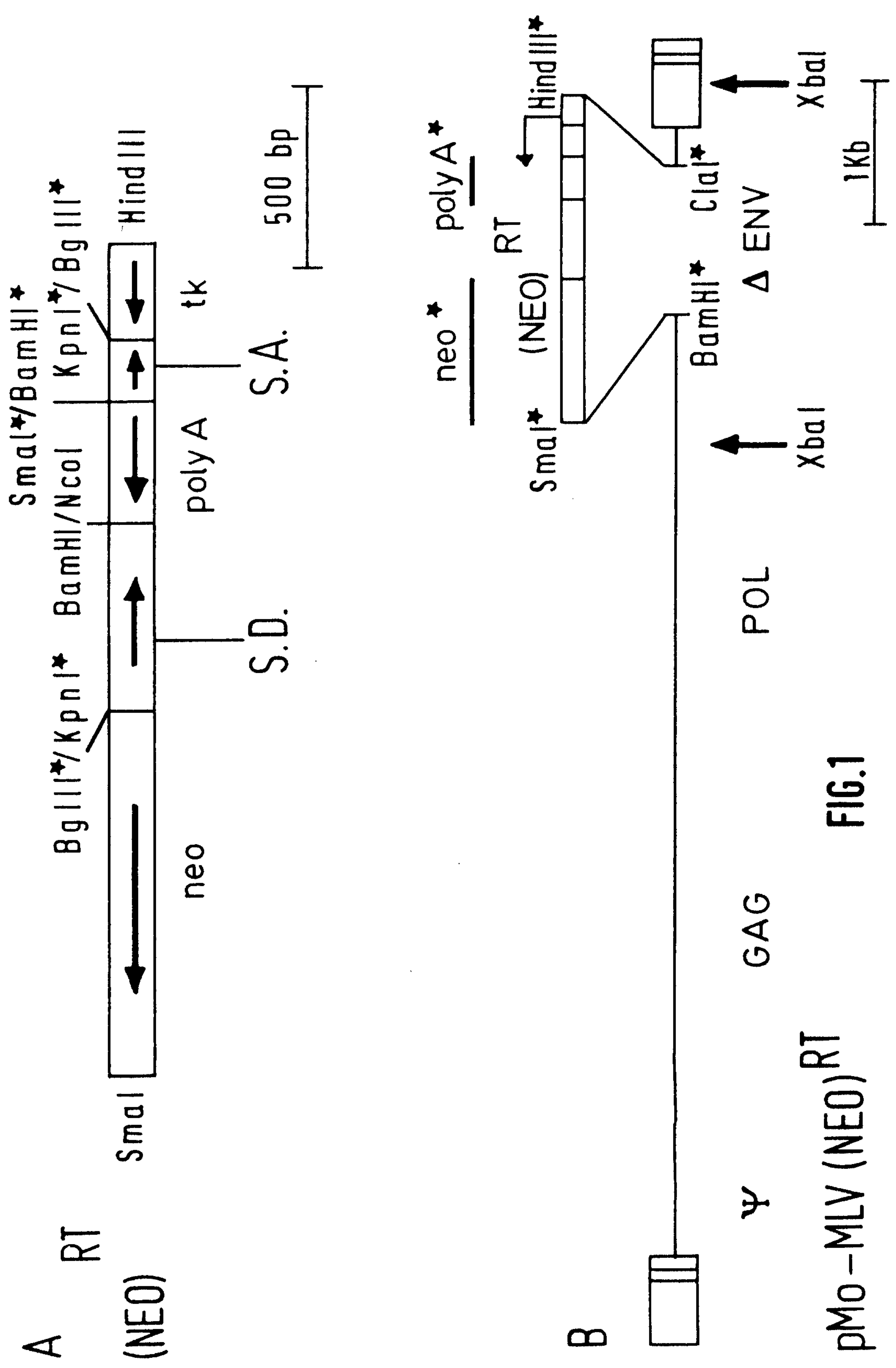
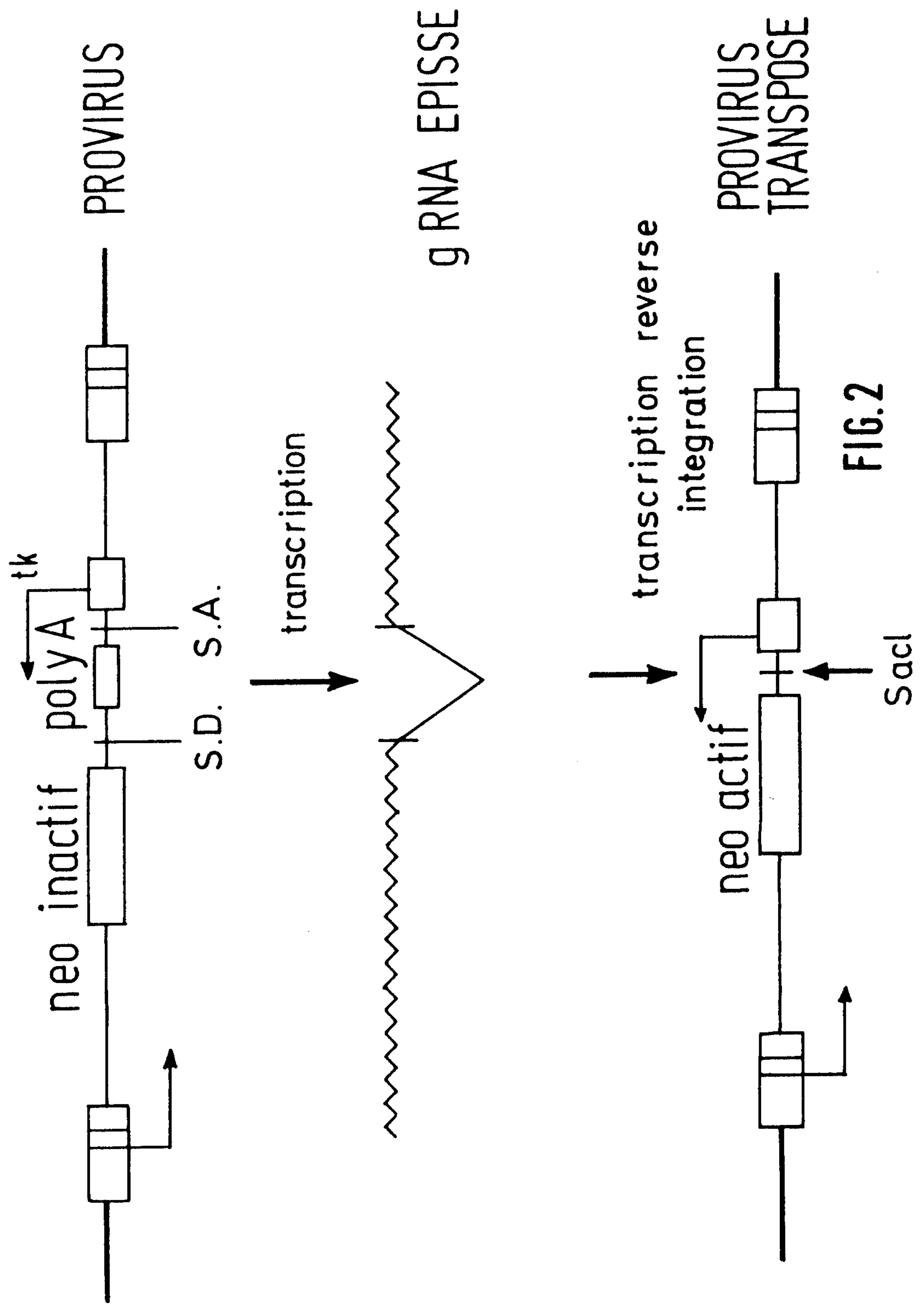


FIG.1

Gordonage Dubuc & Yvonne Walker



Gaudreau, Page Dubuc & Martinian Walker

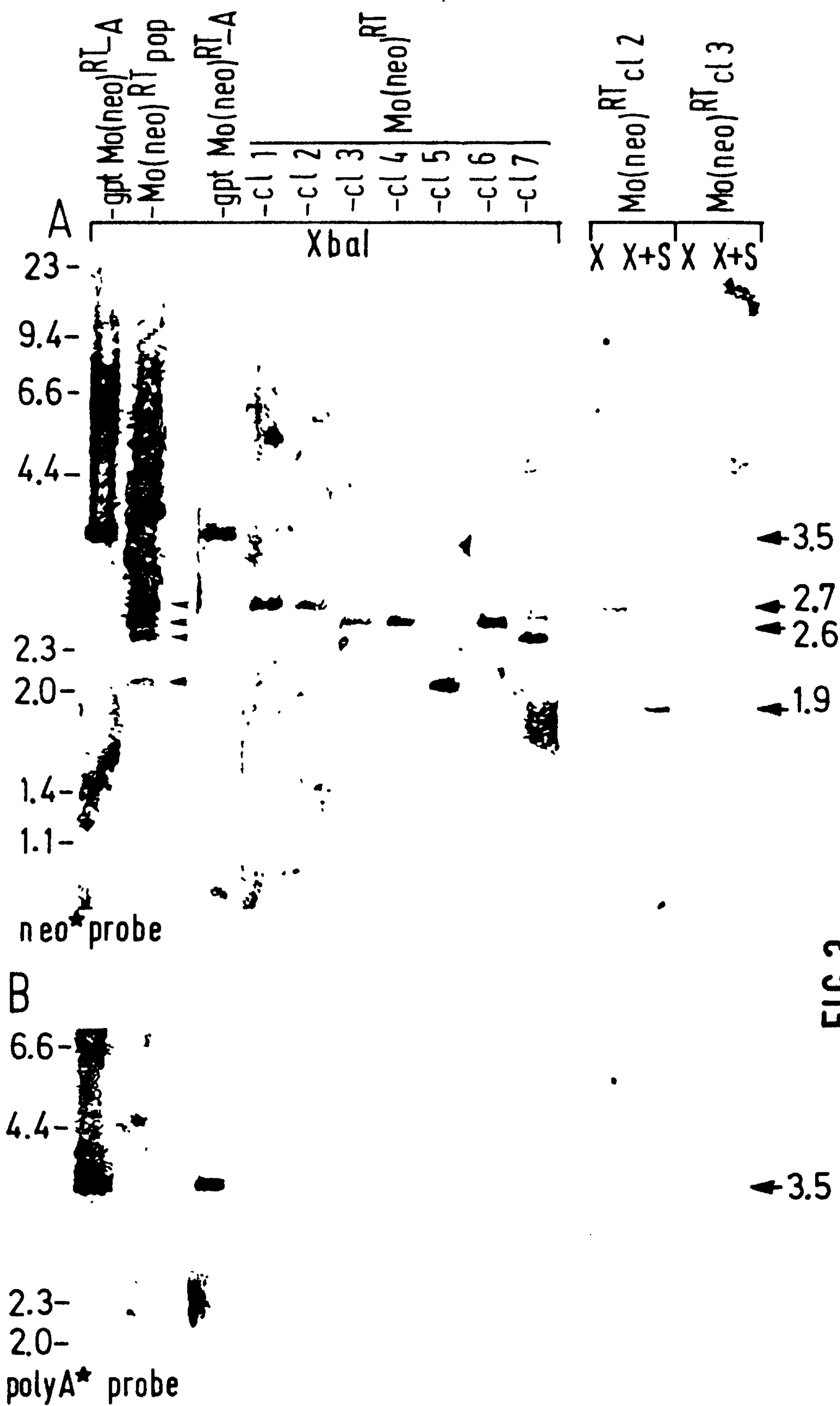


FIG. 3

Gudrun Sage Dubuc & Jeffrey Walker

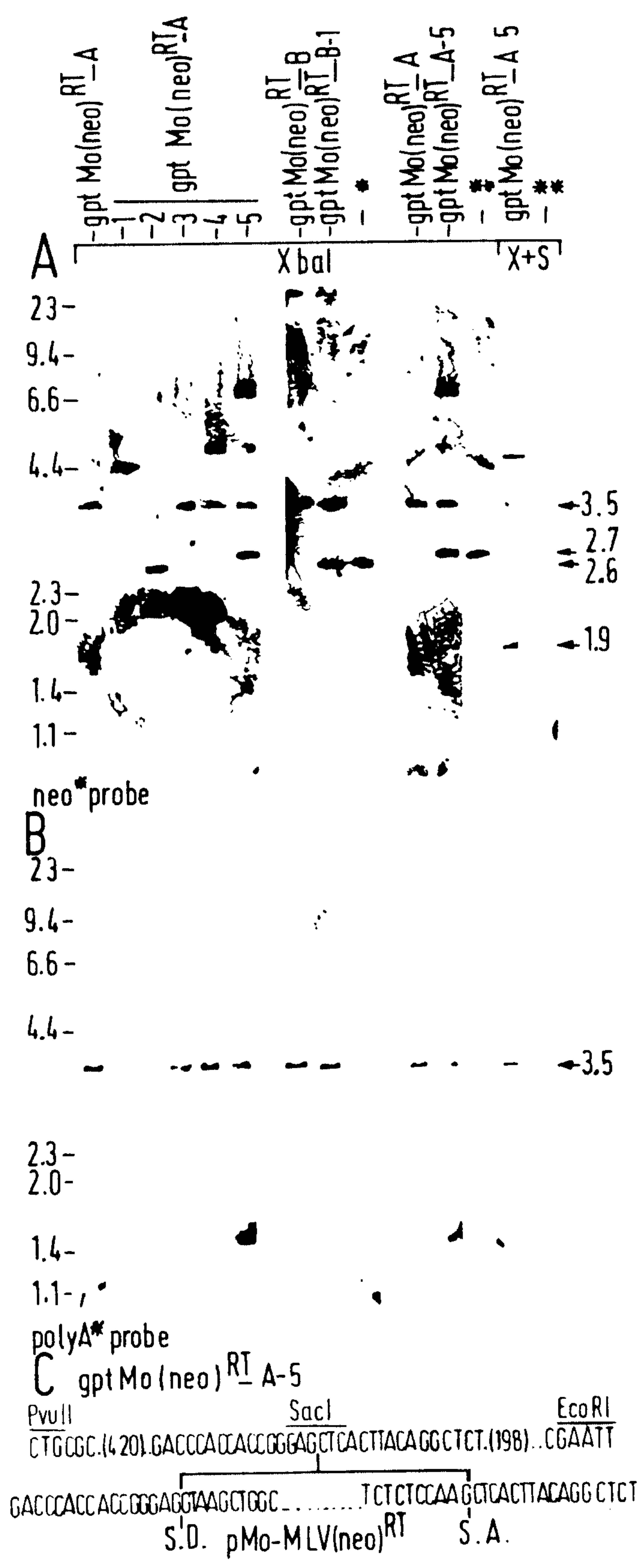


FIG.4

Andreas Sage Dubois & Martin Walker