

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

**Produção de vetores lentivirais baseados em HIV-1 em
linhagem de célula tronco mesenquimal murina**

Flávia Helena da Silva

**Dissertação submetida ao programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Genética e Biologia Molecular**

Orientadora: Nance Beyer Nardi (PhD)

Porto Alegre, março de 2005.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética (UFRGS) e contou com apoio financeiro da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). Auxílio técnico foi recebido do Laboratório de Virologia da Universidade de Pádua (Itália).

Para meus pais, que me ensinaram a ler e a adorar livros desde cedo.

Agradecimentos



“De qualquer maneira, na hora em que ela foi ao toalete, lá na outra ala, o D.B. me perguntou o que é que eu pensava sobre esse troço todo que acabei de contar. Eu não soube o que dizer. Para ser franco, não sei o que eu acho disso tudo. Tenho pena de ter contado o negócio a tanta gente. Só sei mesmo é que sinto uma espécie de saudade de todo mundo que entra na estória. Até do safado do Stradler e do Ackley, por exemplo. Acho que sinto falta até do filho da mãe do Maurice. È engraçado. A gente nunca devia contar nada a ninguém. Mal acaba de contar, a gente começa a sentir saudade de todo mundo.”

J.D Salinger – “O apanhador no campo de centeio”



Como enlouquecer uma mestranda em 140 mini preps

Abstract

A gente começa sabendo que será uma correria, mas insiste mesmo assim. Existe a sucessão das crises: de depressão, de euforia, de irritações, de alegria... Conhece os professores, os colegas, a ciência da hierarquia. Sobrevive aos *dias de marmota*, a não-entrega das amostras, a necessária criatividade nos protocolos ... Monotonia?! ... talvez para os familiares não-laboratoriais que desconhecem esse universo, que nos churrascos nos olham perplexos: “mas esse mundo tá do avesso! A guria tá feliz pq viu célula colorida! Falei para estudar direito ou medicina! Isso não ta certo!”. (...)
mas para quem escolhe pesquisa, essa é a nossa vida.

Key words: insistência, teimosia, cronograma, correria, desequilíbrio hormonal, café no Antônio, senhas misteriosas, parceria.

Introduction

À família, culpada pelos incentivos infantis que marcam nossos mapas neurais! Menção honrosa aos genes da minha mãe, que segundo meu pai é a origem de toda minha teimosia, e aos genes paternos, que segundo minha mãe é a origem da minha mania organizativa. À vó, a quem eu consultei constantemente, para saber quem estava com a razão. Um *grazie di cuore* a minha irmã, que me apoiou desde a escolha do vestibular. Participaram nessa etapa guris muito especiais: Leonardo Karan Teixeira, meu chefinho e amigo Embratel, a quem recorro quando quero confirmar padrões altamente científicos; Ed Poliça, companheiro de trabalho suado e não-publicado, que não devia ter nos deixado; Bolú Magayver, que me ensinou as coisas mais difíceis sobre maxi preps e vida científica. Outstanding remarks: Nardi,

orientadora de impulsividade; Zeca, direcionador de esforço de trabalho; Kátia, treinadora oficial didática; Marion, companheira de projetos de extensão; Tiago, que topou fazer parte dessa montanha-russa e não deixou a peteca cair enquanto estive fora!

Materials and Methods

À Ciça, à Elvira, à Ale, ao Fafá: saudades sempre. À Família Dobrovolski, pelas jantãs maravilhosas (que sempre me faziam pensar em quantas andava o mestrado), *grazie speciale per* Ricardo, que nunca foi embora; à Melissa “Cassamola”, parceria de todas as horas, de todas liquidações, amiga do peito; à Lú, espelho de vida, exemplo de bom humor e de coleguismo; ao Pedrão, amigo para



todo churrasco e todo repique! À Tati, pelas cores, pelas fitinhas, pelos bolinhos. Ao Dani, que passou boas horas dividindo a mesa das bactérias. À Déia Vargas, amizade que espero cultivar por mais tempo (“*wait for me in the PhD!*”), à Anne, a torturadora, que me deu muita força em momentos de loucura total! À Galera do lab da profa Célia Carlini, que me ajudou até na hora do *Amido Black*; aos demais companheiros do lab...

Results and Discussion

Mais agradecimentos: à Família Danielski di Verona – MUITA força; ao staff do Laboratório di Virologia di Padova – muitos géis; ao meu primo Alan, que mandou artigos até via fax; à Claudia Del Vecchio, pela amizade mais do que científica; ao Elmo e à Elen, pela boa vontade diária; a todos que eu torturei nos momentos de tensão absoluta!; à prof. Karen, que me deu aula extra durante a disciplina de Evolução Molecular. Aos demais professores do programa.

Conclusion

... e aí além de mudar de projeto, ganhei muitos incentivadores constantes: grazie à Letícia, minha bússula militar; à Milena, minha amiga de corredor, à Maríndia, minha mentora da idéia “*made in Brazil*”; à Renata e ao Fabiano, o casal de cariocas mais sulista que conheço, companheiros de todos momentos; à Família Fernandez, um pouco minha

também; ao Luca, pela *tensione costante* (que me fez escrever os melhores parágrafos, depois das observações sobre minha cultura latina). Ao papá, pela casa na praia!!!

Perspectives

Não posso deixar de agradecer ao prof. Guido Lenz, meu futuro boss, pela força, pelas conversas lentivirais e pelo entusiasmo; à Nance (de novo!): tão cedo não vou embora!; ao “Lab”. de Imunogenética, pq um outro microambiente assim será difícil de encontrar! Ao Gio, à Illo, à Vale: meu grande obrigado, por terem sempre me apoiado À Lise, pela arte. À Ilaria, que guarda minha cama no apê de Padova, à outra Ilaria, pela nova amizade, à Giu PIMENTAAA, pelo carinho e pelas risadas no INCA. Te liga no padrão ouro Leo!

Agradeço também aos colegas de departamento, às instituições de fomento e ao Murphy, que deu uma folga nos experimentos depois de 2003/II. Um grazie tri especial, às mágicas do Andrés; ao Lab-irmão: Drosophila e à mutagênese-people!

Financial support: CAPES, PAPÁ e Imunogenética!!!!!!!!!!!!!!!

Sumário

Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
Introdução.....	14
Terapia gênica viral e não viral.....	15
Produção de vetores virais para terapia gênica.....	17
Os lentivetores.....	19
Objetivos.....	25
“HIV meets gene therapy” (artigo de revisão).....	26
“Production of HIV-based vectors in murine mesenchymal stem cell lines” (artigo experimental).....	55
Discussão.....	96
Anexos.....	103
Bibliografia.....	109

Lista de abreviaturas

ADA adenosina deaminase

Beta gal beta galactosidase

Chlor *chloroquine*

FCS *fetal calf serum*

FIV *feline immunodeficiency virus*

gfp *green fluorescent protein*

HIV *Human Immunodeficiency Virus*

IRES internal ribosomal entry site

IU *infection unit*

LTR *long terminal repeats*

MAR *matrix attachment region*

ml mililitro ou *mililiter*

MLV *Murine Leukemia Virus*

MMSC *murine mesenchymal stem cell*

MOI *multiplicity of infection*

MPS I mucopolissacaridose I

MSC *mesenchymal stem cell*

ORF *open reading frame*

PCL *packaging cell line*

PCR *polymerase chain reaction*

RCV *replication competent viruses*

RT *room temperature*

SIN *self inactivating vector*

TG terapia gênica

UI unidade de infecção

VSV *stomatitis vesicular virus*

WPRES *posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus*

Lista de Figuras

Introdução

- Figura 1 (p.18)..... Produção de vírus recombinantes para terapia gênica
- Figura 2 (p.20)..... Esquema representativo da organização do genoma dos retrovírus

“HIV meets gene therapy”

- Figura 1 (p.53)..... Genomic organization of retrovirus genome
- Figure 2 (p.54)..... Production of retrovectors by transient transfection

“Production of HIV-based vectors in murine mesenchymal stem cell lines”

- Figure 1 (p 83)..... Independent transfection experiments with mMSC cultures using 14 µg of DNA on 70% confluent monolayers.
- Figure 2 (p.84)..... Influence of fetal calf serum (FCS) and chloroquine (Chlor) on mMSC transfection
- Figure 3 (p.85)..... Beta gal-positive cells in mMSC PCL and after transduction of K562 cells

Figure 4 (p.86)..... HIV-plasmid detection in transfected mMSC, after PCR

Figure 5 (p.87)..... Provirus detection on transduced cells

Anexos

Figura 1 (p.104)..... Avaliação da quantidade final de DNA plasmidial empregada na transfecção de mMSC

Figura 2 (p.105)..... Títulos obtidos após transfecção de mMSC com 14 µg de DNA plasmidial.

Figura 3 (p.106)..... Transfecção de sistema baseado em *gfp* (sistema FUGW) em linhagem de célula 293T e mMSC

Figura 4 (p.107)..... Eletroporação de células tronco mesenquimais com plasmídeo pEGFP-N1

Figura 5 (p.108)..... Presença de células mMSC entre as células Scal+, no ensaio clonogênico.

Lista de tabelas

“Production of HIV-based vectors in murine mesenchymal stem cell lines”

Table 1 (p.77).....	Comparison between some retroviral systems protocols available
Table 2 (p.79).....	Variation among transfection parameters for six selected protocols from the literature available

Resumo

Para produção de vetores virais utiliza-se uma linhagem celular empacotadora (*packaging cell line* – PCL), que é transfectada com os vetores componentes do sistema. As partículas virais produzidas são, posteriormente, liberadas no sobrenadante de cultura, que é processado, aliquotado e estocado. À exceção de sistemas oncovirais, baseados no vírus da leucemia murina (MLV), não existem PCLs estáveis disponíveis para emprego de vetores baseados em HIV em nível clínico. Desse modo, a transfecção transiente tem sido explorada com o intuito de maximizar a produção de vírus e de minimizar os riscos envolvendo a metodologia. Para tal finalidade, outras linhagens celulares estão sendo testadas como PCL, e variações nos protocolos de transfecção têm sido propostas. Dentro desse contexto, a avaliação da possibilidade de produção de vetores virais em linhagem de célula tronco mesenquimal murina, produzida em nosso laboratório, contribui para a investigação da aplicação potencial dessas células em terapia gênica. Os resultados mostraram que essa linhagem produz vírus em quantidades equivalentes às tradicionais PCL empregadas, sem apresentar aparente efeito sintocidal oriundo da toxicidade de proteínas virais. Tal característica permite que o período de coletas seja expandido, sem comprometimento significativo dos títulos, dentro das normas de biossegurança. Infere-se a partir dessas observações que essa linhagem possa ser uma alternativa interessante como PCL estável. Além dessas características, a sensibilidade à infecção pelos vírus recombinantes sugere que a mesma possa ser também utilizada nos processos de titulação viral. Perspectivas futuras incluem a comparação direta com uma linhagem de célula tronco mesenquimal humana e a caracterização detalhada dos vírus produzidos em ambas linhagens.

Abstract

The production of viral vectors is done with packaging cell lines (PCL), which are transfected with the vectors composing the viral system. The viral particles produced are liberated in the cell culture medium which is then harvested, processed and stored. Stable PCLs are available for the production, in clinical level, of oncoviral vectors based on Moloney Leukemia Virus; this is not the case, however, for HIV-based vectors. Transient transfection has, thus, been explored with the objective of maximizing virus production and minimizing the risks concerning this methodology. Different cell lines are being tested as PCL and variations in transfection protocols are being proposed. This work aimed at the evaluation of the potential presented by a murine mesenchymal stem cell line, produced in our laboratory, to be employed as PCL for the production of viral vectors. Our results showed that this cell line produces titers as high as the traditional PCL based on 293T cells, and do not present the syncytial effects caused by toxic viral proteins which limits the use of other cell lines. This has allowed extended periods of harvesting, without compromising viral titers. This cell lineage may represent an interesting alternative as stable PCL to be used in retroviral-mediated gene therapy. Besides these aspects, the sensibility to lentivirus infection suggests that it may be used in titering process as well. Future perspectives include the comparison with a human mesenchymal stem cell line and the full characterization of the viruses produced in both lineages.

Introdução



“Certainly, an important theme that recurred throughout the meeting was analysis of the chromosomal integration sites of gene transfer vectors. The question of how random is retroviral integration has been addressed numerous times in prior years, but we are learning that the answer depends on what the meaning of “how random is” is. New techniques for integration site recovery and genomic analysis are producing a wealth of information on integration patterns of retroviral, lentiviral and AAV-based vectors, as well as transposons. We are learning about the relative frequency of vector integration, the category of preferred integration sites and the interactions between genetic elements of the vector and juxtaposed cellular sequences. Understanding these properties of each specific gene transfer vector should allow more informed estimations of their relative risks and benefits in clinical applications.”

*Don B. Kohn (president of the American Society of Gene Therapy) –
Gene Therapy in 2003: Breadth and vigor*

Introdução

Terapia gênica viral e não-viral

Terapia gênica (TG) é um procedimento clínico que envolve a administração de material genético em células com o intuito de tratar doenças. Em sua forma mais simples, a terapia gênica consiste na complementação ou no bloqueio funcional de genes defeituosos, em geral responsáveis por uma dada enfermidade. A transferência gênica pode ser *ex vivo* (quando se dá em células extraídas do paciente, para serem manipuladas e então reintegradas ao organismo original) ou *in vivo* (quando a transferência gênica é realizada por administração direta do gene terapêutico ao paciente) (Dani, 1999; Nardi *et al.*, 2002).

Originalmente endereçada ao tratamento de desordens genéticas hereditárias, a TG tem buscado aplicações terapêuticas nas áreas de oncologia, infectologia, doenças cardiovasculares e degenerativas, entre outras (Palù *et al.*, 1999). O primeiro protocolo clínico de TG foi aprovado em 1990, para correção de Imunodeficiência Severa Combinada (SCID) através do fornecimento de cópias funcionais do gene da Adenosina Desaminase (ADA) (Blaese *et al.*, 1990).

Existem diversas maneiras de transferir um gene para células-alvo, em geral através de um vetor (do latim *vector* – aquele que entrega). O vetor ideal deve apresentar características básicas como capacidade de acomodação de um transgene de tamanho considerável, baixa imunogenicidade e citotoxicidade, expressão estável do transgene, direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos, custo baixo, fácil produção e manipulação e ainda, capacidade de regulação da expressão do transgene no tempo e/ou na quantidade requerida do seu produto (Nardi *et al.*, 2002). Esse é um vetor teórico, pois na prática dispomos de sistemas com vantagens e desvantagens, representando aproximações desse vetor ideal. Os sistemas de entrega gênica podem ser enquadrados em três categorias: métodos químicos, físicos e biológicos.

Os métodos químicos podem abranger o uso de lipossomas, dendrímeros e outros complexos (Frézard, 2001). Alguns desses apresentam carga total final positiva, o que permite a formação de um complexo com o DNA, rico em carga negativa. A primeira vantagem desse complexo é a diminuição da força de repulsão entre o DNA e o domínio extracelular das proteínas presentes na membrana, que também apresentam carga total negativa (Nardi *et al.*, 2002) e a segunda vantagem mais evidente é a interação facilitada dessa membrana com a membrana celular. As propriedades de fusão das membranas lipossomais e dos mecanismos de endocitose de tais vesículas são alvo de intenso estudo, uma vez que otimizam a entrega de macromoléculas no interior das células (Frézard, 2001), assim como outros sistemas de compostos catiônicos, como os de origem amidoprotéica e protéica (Brown *et al.*, 2001). O método de precipitação de material genético com fosfato de cálcio também é bastante importante, ainda que pouco aproveitável para uso *in vivo* diretamente. O mesmo é a base do sistema de produção de vírus recombinantes para utilização em terapia gênica (Nardi *et al.*, 2002).

Os métodos físicos baseiam-se principalmente em sistemas de entrada de plasmídeos nas células-alvo, com ênfase em processos mecânicos. São exemplos a microinjeção direta, eletroporação e a biobalística. O dilema envolvendo essas abordagens é a quantidade de células que podem ser atingidas (Dani, 1999).

Os métodos biológicos incluem os vetores de origem viral. As partículas virais, por natureza, são agentes infecciosos capazes de expressar sua informação genética nas células infectadas (Palù *et al.*, 1999). O ciclo vital de um vírus é dividido em duas etapas: a infecção, representando o momento de introdução do genoma viral na célula hospedeira, e a replicação. Para ambas fases são necessários grupos de genes cuja expressão é regulada temporalmente, sendo os genes de função regulatória os primeiros a serem expressos, seguido pelos genes estruturais. A TG viral sustenta-se na produção de vírus recombinantes, a partir do

fornecimento em trans dessas seqüências, às quais são adicionados os elementos relacionados ao cassete de expressão do transgene.

Produção de vetores virais para terapia gênica

Os vírus dependem da célula hospedeira para sintetizar suas proteínas e enzimas, utilizadas na replicação. Na fase extracelular, essas partículas recebem o nome de vírion (uma partícula viral completa, capaz de infectar uma célula).

A estrutura básica viral compreende uma parte central (núcleo), constituída por material genômico e por proteínas associadas, e uma parte de revestimento, composta por subunidades protéicas (protômeros) delimitando o capsídeo. Preenche esse espaço uma matriz, também de origem protéica. Alguns vírus apresentam um componente adicional denominado de envelope viral.

O capsídeo, além de fornecer proteção contra a desnaturação química ou a degradação enzimática do ácido nucléico, confere a forma característica de um vírus, importante para identificação de morfologia. Isso ocorre devido ao arranjo dos protômeros e das proteínas de superfície no espaço. O capsídeo também apresenta os ligantes protéicos para os receptores celulares, o que determina o tropismo da partícula.

O envelope é um fragmento de membrana lipoprotéica modificada pela substituição parcial e/ou adição de proteínas vírus-específicas. Em geral, o envelope é adquirido durante o brotamento da partícula. Esse fenômeno pode ocorrer tanto na membrana nuclear como na membrana celular, e também pode depender de um vacúolo. Em vírus envelopados, é essa estrutura que apresenta proteínas ligantes para os receptores celulares, o que determina o fenômeno de adsorção envelope-célula e, obviamente, o tropismo do vírus. A presença de componentes lipídicos no envelope é responsável pela sensibilidade dos vírus a solventes lipídicos, como éter e clorofórmio (Lanciotti, 2001).

Para produção de vetores virais é necessário fornecer todos elementos mencionados anteriormente através de um sistema de entrega gênica, em geral método químico ou físico. A co-precipitação com fosfato de cálcio de plasmídeos distintos, processo esse denominado de transfecção, é realizada sobre uma monocamada de células aderentes chamadas de células empacotadoras (Pear *et al.*, 1993; Soneoka *et al.*, 1995). Nessas células, os plasmídeos de empacotamento e de envelope têm seus genes transcritos e traduzidos, para produzir as proteínas estruturais e as enzimas necessárias à formação dos vírus (Figura 1).

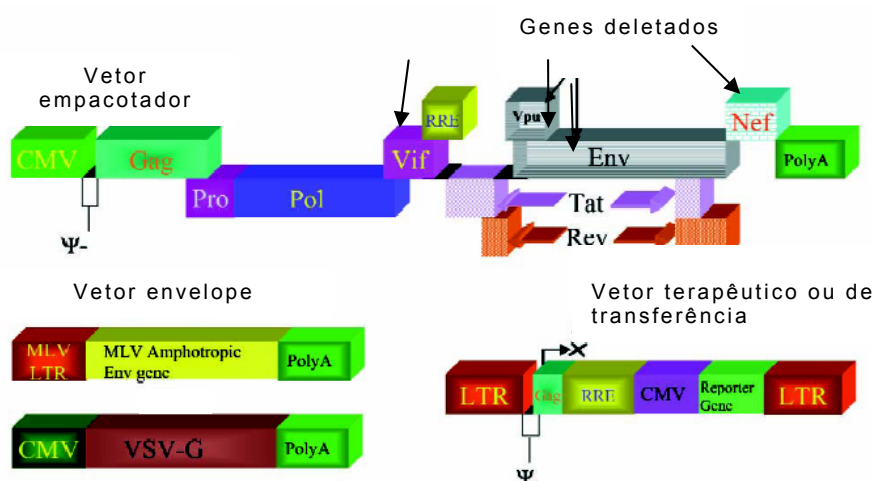


Figura 1 - Produção de vírus recombinantes para terapia gênica. O genoma viral é alterado geneticamente, de forma que o sinal psi (ψ) esteja presente apenas no vetor terapêutico. Os três vetores são co-precipitados sobre as células empacotadoras, de onde os vírus recombinantes são coletados. (Modificado de Daly & Chernajovsky, 2000).

As seqüências regulatórias são separadas das seqüências estruturais, em vetores distintos, de modo que o vírus recombinante obtido seja defectivo para tais seqüências. Seu material genético, portanto, é representado pelo vetor terapêutico, basicamente composto pelo transgene e seus elementos regulatórios, e seqüências virais relacionadas aos eventos de retrotranscrição e de integração (Kay *et al.*, 2001). Apenas o vetor terapêutico contém a seqüência psi de empacotamento.

A grande relevância desse sistema de produção de vírus recombinantes, sustentado na utilização de plasmídeos distintos, é a segurança: quanto mais separadas essas seqüências estiverem, em termos de vetores individuais, mais eventos de recombinação serão necessários para reuni-las outra vez, o que reduz a possibilidade de restauração do tipo selvagem ou o surgimento de novas variantes virais replicação-competentes (Daly & Chernajovsky, 2000). Os ensaios de captura têm por objetivo testar se novas variantes foram produzidas e, assim, avaliar o grau de segurança do sistema (Kay *et al.*, 2001).

Os lentivetoeres

A família *Retroviridae* é caracterizada por apresentar genoma de RNA de polaridade positiva e por converter esse genoma de RNA em DNA, através da transcriptase reversa. São três as subfamílias: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae*. Os oncovírus são bastante utilizados em TG, especialmente o MLV (Vírus da Leucemia Murina). Um oncovírus, entretanto, não é capaz de infectar células quiescentes, como é o caso de neurônios e células tronco hematopoiéticas; assim sendo, os lentivírus passaram a ser intensamente pesquisados para essa finalidade (Miller, 1990; Miller, 1992; Culver & Blaese, 1994; Palù *et al.*, 1999; Buchschacher & Woong-Staal, 2000).

O representante mais conhecido dos lentivírus é o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), cuja utilização em humanos ainda não foi liberada. Em função de suas características biológicas e dos anos de intenso estudo dedicados a sua epidemiologia, o HIV ainda apresenta vantagens frente aos demais lentivírus (Parolin *et al.*, 1994; Naldini, 1998). As restrições usualmente feitas sustentam-se nos seguintes aspectos: a integração sítio-inespecífica (Cornetta *et al.*, 1991), a possibilidade de recombinação homóloga com seqüências retrovirais endógenas (Chong *et al.*, 1998) e a recombinação com o vírus selvagem. Evidências experimentais elucidando (e contrariando tais argumentos) já foram

apresentadas (revisado em Pagès & Bru, 2004) e permanece como fator proibitivo de seu emprego em nível clínico a questão da grave patologia a ele associada, pelo menos até o momento em que todas as condições de biossegurança sejam satisfeitas.

Todos os retrovírus apresentam duas seqüências terminais repetidas (*long terminal repeats* – LTR) nas extremidades do provírus (forma integrativa do vírus). Tais seqüências contêm os elementos regulatórios da expressão gênica e da integração viral. Duas ORFs denominadas de *gag* e *pol* fornecem os elementos estruturais e enzimáticos, respectivamente. Além dessas, o gene *env* é comum a todos retrovírus, em termos funcionais, completando o número mínimo de três ORFs, como no caso do vírus da leucemia murina (Figura 2).

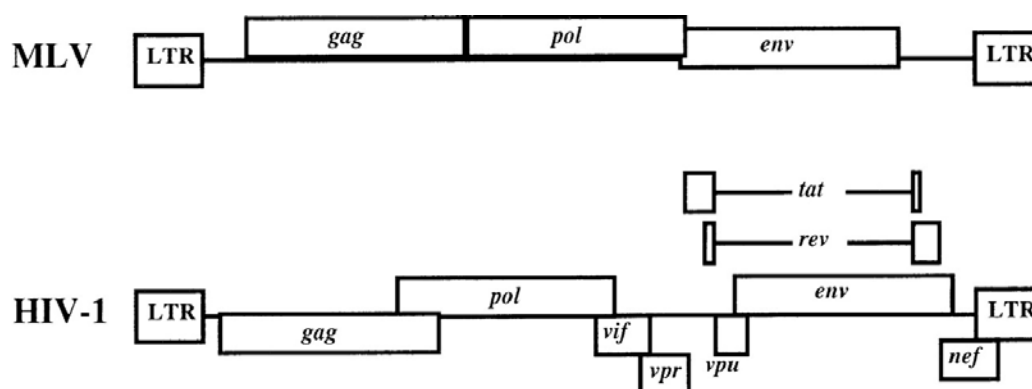


Figura 2 - Esquema representativo da organização do genoma dos retrovírus. Representação do Vírus da Leucemia Murina (MLV), considerado de organização simples, e do Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1), considerado extremamente complexo em função do grande número de genes ditos acessórios. (Modificado de Buchschacher & Woong-Staal, 2000).

Os lentivírus apresentam um genoma mais complexo, com pelo menos dois genes regulatórios adicionais (*tat*, *rev*), essenciais para a expressão gênica no tipo selvagem, e outros genes acessórios, de função ainda não completamente esclarecida (Cornetta *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1996a e 1996b; Miyoshi *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2001).

O ciclo replicativo dos vírus é iniciado com a interação entre os receptores celulares localizados na membrana plasmática e as glicoproteínas do envelope viral. Ocorre adsorção do envelope com a membrana celular e liberação do capsídeo viral no citoplasma celular. O RNA viral é retrotranscrito em DNA e transportado para o núcleo. A integração do provírus no genoma hospedeiro permite que o mesmo seja replicado junto com o DNA hospedeiro e que seja passado para a progênie celular. A partir daqui, novos vírus podem ser produzidos e liberados das células (Klarmann *et al.*, 2003). No caso de vetores virais para terapia gênica, a ausência de genes estruturais e/ou regulatórios no vetor transferido para as células caracteriza a infecção como de ciclo único, ou seja, sem a produção de novas partículas.

A integração do genoma viral no genoma hospedeiro depende da capacidade do provírus penetrar o núcleo da célula. Para grande parte dos retrovírus isso somente é possível durante a divisão celular, quando ocorre rompimento da carioteca. Os lentivírus, contudo, apresentam mecanismo de transporte ativo do seu provírus através dos poros da carioteca (Bukrinsky & Haffar, 1999), em parte sustentado por seqüências de localização nuclear e pela formação de complexos protéicos de transporte dependentes de genes acessórios, como o *vpr* de HIV (Vodicka *et al.*, 1998). Essa é uma das vantagens dos lentivírus frente aos oncovírus, quando se pretende infectar células pós- mitóticas.

As vantagens acima expostas justificam o constante desenvolvimento de lentivetores para TG, sendo que os vetores baseados em HIV-1 têm sido considerados uma grande ferramenta de transferência gênica, que ainda deve sofrer ajustes para poder ser empregada em nível clínico. Os vetores chamados de auto-inativantes são considerados mais seguros, em função da

incapacidade de produção de novas partículas, a partir da célula transduzida, além de reduzir o risco de oncogênese por inserção e de produção de novas variantes (Naldini *et al.*, 1996a e b). O desenvolvimento de sistemas auto-inativantes baseados em HIV continua a receber importantes contribuições experimentais, especialmente no que se refere ao melhoramento das construções e da segurança em tais sistemas (Cui *et al.*, 1999; Iwakuma *et al.*, 1999; Lois *et al.* 2002; Zaiss *et al.*, 2002).

De um modo geral, vetores virais e não-virais podem conter um transgene terapêutico ou um gene repórter, conforme a necessidade do pesquisador. O uso de gene repórter é válido como um marcador de eficiência de construção e de transformação, tanto em vetores virais quanto não virais. Além disso, facilita as análises relacionadas à implantação de uma técnica ou aos estudos em nível pré-clínico. A tecnologia do gene repórter serve para monitoramento de eventos celulares associados a transdução ou a expressão gênica, tendo como principais vantagens alta sensibilidade, confiabilidade, conveniência e adaptabilidade dos métodos de detecção, além da grande variabilidade nos tipos de genes repórter disponíveis (luciferase, fosfatase alcalina, Lac-Z, entre outros) (Naylor, 1999).

No Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da UFRGS já está estabelecido o uso de FIV como vetor lentiviral, sendo que a implementação de um sistema baseado em HIV poderia aumentar as possibilidades de pesquisa do ponto de vista comparativo entre vetores de primatas (HIV) e não-primatas (FIV). A transdução de precursores hematopoiéticos humanos com FIV, por exemplo, mostrou-se ineficiente (Price *et al.*, 2002), levando a uma maior valorização da adequação do vetor viral ao grupo de células-alvo. Considerando que um dos enfoques de pesquisa do laboratório, atualmente, é o emprego de células tronco (hematopoiéticas e mesenquimais) em TG, e que existem projetos em andamento relacionados ao desenvolvimento de um protocolo pré-clínico de terapia gênica para Mucopolissacaridose do tipo I, seria interessante ter um sistema baseado em HIV para comparação entre os demais vetores

utilizados no laboratório. Existem referências experimentais da aplicabilidade desse vetor voltada para MPS I (Fairbairn *et al.*, 1996; Sondhi *et al.*, 2001; Di Natale *et al.*, 2002).

A implementação desse sistema, inicialmente avaliada através do emprego de genes repórter, também poderia permitir a investigação comparativa entre vetores onco e lentivirais, um dos tópicos mais controversos da TG viral. Em 2002, a aplicação de um protocolo clínico envolvendo o MLV ocasionou o desenvolvimento de leucemia em dois pacientes, por mutagênese insercional (Check, 2002a e b; Kaiser 2003). A repercussão desse incidente levou os virologistas a manifestarem-se contra as generalizações a respeito dos retrovírus, visto que diferentes componentes desta família apresentam peculiaridades especialmente no que se refere à biologia viral (Schröder *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Ainda que estudos evolutivos prévios já tenham sido realizados (Greatorex & Lever, 1998; Worobey & Holmes, 1999), estudos comparativos voltados para TG são incipientes (Zaiss *et al.*, 2002).

Decorre desse fato a necessidade de uma maior interação entre os terapeutas geneticistas e os virologistas, valorizando aspectos mais básicos da TG, como as propriedades virais que são mantidas pelo vírus recombinante, apesar das extensas deleções de seqüências do seu genoma; a definição das condições de produção desses vírus, em termos de melhor linhagem celular para utilização como PCL e melhor sistema de transfecção dos vetores. Além desses aspectos, a busca por melhores construções de vetores virais é também incentivada em termos de definição de mecanismos associados à regulação da expressão do transgene, à segurança da aplicação desse método e à adaptação de tal sistema para a maquinaria transcricional humana.

O trabalho aqui apresentado procura avaliar a possibilidade de produção de vetores lentivirais baseados em HIV-1, contendo genes repórter *gfp* e *beta-gal*, em uma linhagem de célula tronco mesenquimal murina (*mesenchymal stem cell* – MSC), estabelecida em nosso laboratório (Meirelles & Nardi, 2003). Entre os aspectos ressaltados durante nossa

investigação estão a resistência da célula às proteínas citotóxicas, o título viral obtido com o emprego do sistema de transfecção baseado na coprecipitação dos plasmídeos com fosfato de cálcio, o monitoramento de variantes virais-replicação competentes e a funcionalidade dos vírus recombinantes produzidos nessa linhagem celular.

Objetivos

Dentro do contexto apresentado, esse projeto de pesquisa teve como objetivo geral a produção de vetores lentivirais baseados em HIV, com os genes repórter *beta-galactosidase* e *gfp*, em uma linhagem de células tronco mesenquimais, estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (Meirelles & Nardi, 2003). Os vetores foram gentilmente cedidos pelo Dr. David Baltimore (Califórnia Institute of Technology, EUA) e pelo *AIDS Research Program* (NIH, EUA).

Para estabelecimento dos parâmetros relacionados à transfecção foi realizada uma extensa revisão bibliográfica considerando a produção dos vetores virais e o emprego dos vírus recombinantes para TG, resultando na redação de um artigo de revisão. Os objetivos específicos podem ser detalhados como segue:

- Produção do vetor lentiviral baseado em HIV contendo os genes *beta-galactosidase* e *gfp*: transformação de bactérias e purificação dos plasmídeos envolvidos; produção de lentivírus em linhagem de célula tronco mesenquimal.
- Transdução de células alvo (MSC, K562, Sca-1+), como teste funcional.
- Avaliação da transdução, através da análise da integração do provírus no genoma das células alvo, via PCR, e análise de expressão do gene repórter.
- Monitoramento do surgimento de formas mutantes recombinantes do vírus (*replication competent viruses* -RCVs), para avaliação da segurança desse sistema.

HIV meets gene therapy



Artigo de revisão submetido a “*Genetics and Molecular Biology*”

“This is one of two transfection protocols you can find in this Web Page set. Largely, the protocols are the same, but they have been prepared by different people at different different time, and contain different hints and notes. They’ll each achieve the same goal, high titre virus from 293T cell-derived retroviral producer lines, so pick which one you like. Yeah, we know, it would be great to have just one set of instructions, but we don’t have all day to make things perfect.”

*MikeRothenberg and Garry P. Nolan –
PhoeNX RetroviralProducer Line Protocol*

HIV meets gene therapy

Flávia Helena da Silva, Tiago Pires Dalberto, Nance Beyer Nardi

Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding author:

Nance Beyer Nardi

Av. Bento Gonçalves, 9500

CEP 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55-51-33166740

Fax: + 55-51-33167311

E-mail: nardi@ufrgs.br

Key words: HIV, MLV, retrovirus, lentivirus, gene therapy

Abstract

Retroviruses are the most efficient and largely used gene transfer systems in gene therapy protocols. The Human Immunodeficiency Virus (HIV), classified as a retrovirus because of its RNA genome and the need of reverse transcriptase to convert it into DNA. HIV is also grouped within the *lentivirinae* subfamily, being able to infect quiescent cells. Being better known for its association with the acquired immunodeficiency syndrome, HIV can also be described as one of the most effective lentivectors. Biosafety concerns, which are present whenever viral vectors are employed, are particularly involved in the development of HIV-based vectors. Insertional mutagenesis and the production of new replication-competent viruses (RCV) have been pointed as major problems, but experimental data have shown that safe protocols can be developed for their production and application. Evolutionary approaches, as well as virology, immunology and cell biology studies must get together to allow the clinical use of HIV vectors. This review will focus on the general properties, production and applications of lentivectors in gene therapy, with particular emphasis on those based on HIV systems.

Introduction

The basic principle of gene therapy is the introduction of exogenous genetic material to correct or modify the function of a cell. The development of methods for the delivery of therapeutic genes to specific target cells has been under exhaustive investigation for the last decade (reviewed in Romano *et al.*, 2000; Amalfitano and Parks, 2002). Although the identification of the appropriate therapeutic gene as well as the target cell are essential for successful gene therapy, pointing to the most suitable gene transfer method is also of fundamental importance.

The vectors used to transfer genes are basically classified into viral or non-viral and each one presents its own benefits/drawbacks. Retroviruses are the most efficient and largely used gene transfer systems (reviewed in Chu *et al.*, 1998), and among them lentiviruses have been increasingly used since they present great efficiency and safety. This review will focus on the general properties, production and applications of one of the most largely employed lentiviruses in gene therapy - the human immunodeficiency virus or HIV.

General properties of lentiviruses and lentivectors

All members of the Retroviridae family present a RNA genome which is retro-transcribed into DNA by the enzyme reverse transcriptase. When this process is concluded (if all the proteins, cellular and viral factors

required for that are present) the provirus is able to integrate into the genome of the host cell. This is possible because regulatory signals are present in both terminal regions of the provirus genome, named long terminal repeats (LTRs) (Figure 1). The viral genome also presents enhancers and other elements that regulate the expression of viral genes, which can be localized within LTRs, or accessory and regulatory genes.

At least three open reading frames are present in the genome of all retroviruses. Each one encodes for a different element, such as the capsid and matrix (*gag* gene), enzymes (*pol* gene), and the envelope (*env* gene). The capsid is important to protect the viral genetic material; the enzymes are needed for its replication and integration of the virus genome, and the envelope consists of glycoproteins that will recognize specific cell receptors and determine the tropism of infection. Members of the *Lentivirinae* subfamily present a more complex genome with other regulatory and accessory genes (Swanstrom and Wills, 1997).

Lentiviruses have the ability to infect quiescent cells (Reiser *et al.*, 1996; Park and Kay, 2001). An elaborated machinery that signals for the active importation of the pre-integration complex is the major responsible for that property, which is very useful for gene therapy purposes. Oncoviruses (such as the Moloney Leukemia Virus, MLV) are also members of the *Retroviridae* family, but they are unable to infect quiescent cells because they lack the mechanism mentioned above. Thus, nuclear access and integration of virus genome are dependent on the cell nuclear membrane brake during cell division (reviewed in Naldini, 1998). These are

very important features in the context of gene therapy, meaning that HIV can be used in a different group of target cells in comparison to MLV-based vectors.

The most famous lentivirus is the human immunodeficiency virus (HIV), historically related to the AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) pandemic, and still poorly understood, despite the large body of knowledge resulting from intense research over the last twenty years (reviewed in Lever *et al.*, 2004). HIV preferentially infects cells that present the CD4 cell surface molecule, such as macrophages and helper T lymphocytes. It may also bind to the co-receptors CCR5 and CXCR4 (Holmes *et al.*, 2001). In order to expand the possible applications of HIV vectors in gene therapy, it is necessary to use different envelope constructions that may enable the infection of different target cells. This process, called pseudotyping (Burns *et al.*, 1993), has been initially designed for vectors based on the MLV (Yee *et al.*, 1994), but is now applied to several other viral vectors. Pseudotyping has also allowed the manipulation and concentration of viral stocks.

Producing retrovectors

The construction of viral vectors imply the removal of some of the genes present in the wild type virus, since the vectors should be able to infect cells, retrotranscribe, integrate its genome into the host DNA and express the therapeutic gene without causing any disease. Specific genes

and sequences related to virulence or unnecessary to transgene expression must be deleted and interesting genes may fill the available space. These minimal helper-packaging elements are the basis for the genetic engineering of virus-based vectors and the procedure itself is called transient transfection (Pear *et al.*, 1993).

The transient transfection procedure depends on the delivery of such constructs, each one expressing a few primary elements for the assembly of viable viral particles. The construct that represents the encapsidated genome is the therapeutic vector, containing all the sequences required for the expression of the transgene in the target cells (reviewed in Delenda, 2004).

In order to reduce helper virus (replication-competent viruses or RCV) formation, the genes required for the assembly of recombinant viruses are transiently and independently transfected into packaging cell lines (PCL) with different constructs (Soneoka *et al.*, 1995) (Figure 2). Stable PCL can express constitutively the genes of choice and may improve viral production from the biosafety point of view (Ory *et al.*, 1996). Recombinant viruses are directly harvested from the cell culture supernatant, which is subjected to a titration procedure – the quantification method used to determine infective viral units in the cell culture.

The development of stable packaging cell lines is also an important issue in the production of retrovectors. The type of cell lineage used is considered one of the critical points of the methodology, since each cell line presents a different susceptibility to transfection (reviewed in Pagès

and Bru, 2004). Presently, Cos and 293 are the most frequently used PCLs, but other cell types are being investigated. We have recently developed an interesting alternative PCL for the production of HIV-based vectors (FH Silva, TP Dalberto, A Delgado-Cañedo, LS Meirelles, C Del Vecchio, G Palù and NB Nardi), using a murine mesenchymal stem cell line previously established in our laboratory (Meirelles and Nardi, 2003).

The approval of viral constructs depends also on safety issues, such as the possible development of RCV during virus production, insertional mutagenesis and potential recombination with human endogenous retroviral sequences (Cornetta *et al.*, 1991). These concerns increase when the wild type virus considered is related to a human severe pathology, such as AIDS. In order to avoid RCV production, research has focused on the development of stable HIV producer cell lines (Corbeau *et al.*, 1996; Klages *et al.*, 2000) by combining elements that have additional regulatory functions (Chen *et al.*, 1996; Farson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001). These efforts have resulted in a more controlled production of viruses. The reduction of overlapping sequences between therapeutic vectors and packaging components has proved to be helpful to reduce RCV formation (Otto *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 2000). Despite these efforts, however, no HIV vectors have been allowed to be used in clinical level yet.

The development of sensitive assays to specifically detect recombinant lentiviral DNA mobilization (Wu *et al.*, 2000; Sastry *et al.*, 2003) is of great value for clinical application, since recombination events between the therapeutic vector and endogenous retroviral sequences have

been reported (Chong *et al.*, 1998). Contamination of vector supernatants with packaging cell line DNA can also be a source of false positive results in tests for RCV detection, if no functional tests are done simultaneously (Chen *et al.*, 2001). These techniques can also help to standardize virus production, providing a reproducible method for lentiviral titration (Sastry *et al.*, 2002), besides improving safety tests. It is expected that new assays for the determination of vector safety will lead to the improvement of HIV vectors.

Producing viral vectors is a difficult task. The transient transfection procedure, briefly described above and commonly used by researchers all around the world, is not as homogenous as it should be in order to allow the industrial scale-up production. The titers achieved through transient transfection are somewhat variable and the concentration of viral stocks is still to be standardized (Pagès and Bru, 2004). These limitations explain why there is a great effort from the scientific community towards the improvement of viral vector production in a standardized manner, which would allow the clinical use of these systems, considering biosafety concerns and therapeutic benefits.

Getting specific to HIV features

The development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy is the most logical application of this system, but the ability of HIV to specifically target CD4⁺ non-cycling cells makes it a promising candidate

for many other situations in which *in vivo* gene delivery is important (Poeschla *et al.*, 1996). In fact, this possibility has led to experimental evidence of its application in transduction of a wide variety of cell types, such as hematopoietic progenitor and stem cells (Reiser *et al.*, 1996; Case *et al.*, 1999), post-mitotic neurons (Naldini *et al.*, 1996a; Reiser *et al.*, 1996), fibroblasts and human primary macrophages (Naldini *et al.*, 1996b), and primary human marrow stroma (Bahner *et al.*, 1997).

Two-plasmid systems, which are based on the delivery of one therapeutic construct and one structural vector, have been described in the past, but few reports present *env* deletion in the structural vector (Page *et al.*, 1990; Landau *et al.*, 1991; Reiser *et al.*, 1996). A three-plasmid system, including one therapeutic vector, one structural vector without the wild type HIV *env* gene and one additional VSV-G envelope vector, was tested by Naldini *et al.* (1996a) with encouraging *in vivo* results. Blömer *et al.* (1997) have also presented strong experimental evidences in favor of this system applied *in vivo* to the murine central nervous system through a comparative study comprehending oncoviral (based on MLV), adenoviral and adeno-associated viral systems. Only the lentiviral vector was able to efficiently and stably infect quiescent cells with the *β-galactosidase* transgene expression for over six months. Mordelet *et al.* (2002) were able to reproduce with modifications this same protocol.

Even though these data represent the first positive results towards the *in vivo* use of lentiviral gene therapy, some modifications have been proposed in order to improve the system. Many suggestions have been

based on the knowledge of the HIV biology, a legacy from different fields of science, such as molecular virology, cell biology, immunology, and so on. Almost all genes from the HIV genome (structural, accessory or regulatory genes) have been tested for possible advantages in gene therapy vectors, and the minimal requirements for the construction of HIV-based vectors started to be defined.

A minimal HIV-based vector has been developed presenting lower number of viral sequences (Kim *et al.*, 1998), which represents a safer construct in comparison to the examples mentioned above. Later on, however, other modifications led to the development of self-inactivating (SIN) vectors, which are characterized by one-way infection of target cells, an important advance for safer gene therapy protocols (Miyoshi *et al.*, 1998; Iwakuma *et al.*, 1999). These lentivectors have deletions of specific regions of the viral genome, which impair their replicative potential but do not alter their gene transfer efficiency. Another important aspect of this new approach is that the viral promoter does not interfere with the heterologous one.

The number of known *cis* regulatory elements is still increasing, and thus enables the improvement of SIN vectors (Déglon *et al.*, 2000; Ismail *et al.*, 2000; Ramezani *et al.*, 2000; Yam *et al.*, 2002). Sequential deletions of regulatory regions of the HIV genome have been tested. Some elements were still recognized as necessary for efficient gene transfer (Parolin *et al.*, 1994; Hildinger *et al.*, 1999; Sirven *et al.* 2000; Manganini *et al.*, 2002), but some were considered unnecessary in contrast to previous results (Cui

et al., 1999). Corroboration of such observations *in vivo* has also been reported (Baekelandt *et al.*, 2002).

Splicing signals, constitutive RNA transport elements, and posttranscriptional regulatory elements of woodchuck hepatitis virus (WPRE) have been inserted in this genetic engineering investigation process, in order to achieve effective expression of protein-coding transgenes (Schambach *et al.*, 2000). Even the matrix attachment region (MAR) has been tested, in order to improve the levels of protein expression up to a therapeutic level (Park and Kay, 2001). Multiexpression vectors based on differential splicing and translational control, depending on an internal ribosomal entry site (IRES) sequence did not decrease virus titers or its ability to infect quiescent cells (Zhu *et al.*, 2001).

Besides molecular modifications of viral vectors, other factors may vary according to the target cell type and the intended future applications, such as changes in culture conditions of transduced and producer cells (Iwakuma *et al.*, 1999). Defining the boundaries between onco and lentivectors is also of great value; the best cell type to produce oncoviruses, for example, may not be the best one to produce lentiviruses (Reiser, 2000; Pagés and Bru, 2004). Also, the best packaging cell line for HIV in a clinical level is still to come.

Applications of HIV-based vectors

The ability of lentivectors to infect nondividing cells has been shown in different target cells, such as primary cultures and human progenitor

cells. More specifically, HIV vectors have been shown to be very efficient in infecting different targets, such as hematopoietic stem cells (HSC) (Case *et al.*, 1999; An *et al.*, 2000; Demaison *et al.*, 2002) and peripheral-blood monocyte-derived dendritic cells (Chinnasamy *et al.*, 2000). The best results concerning the transduction of HSC have been obtained with HIV-based vectors, and other lentiviruses such as the feline immunodeficiency virus (FIV) have been considered inadequate to deliver genes to this type of progenitor cells (Price *et al.*, 2002).

Promising results have been found for the *in vivo* transduction of airway epithelia (Johnson *et al.*, 2000), as well as *in situ* application of HIV vectors in human and mice corneal tissue (Wang *et al.*, 2000; Bainbridge *et al.*, 2001; Kostic *et al.*, 2003). One of the most interesting results in these reports was the absence of toxic effects or immune responses after the *in vivo* administration of HIV vectors (Miyoshi *et al.*, 1998; Naldini, 1998; Han *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2002). Recent experiments with heart grafts in mice have also corroborated these conclusions (Kearns-Jonker *et al.*, 2004).

The remarkable efficacy of HIV-based vectors for globin gene transfer observed in Cooley anemia shows once again the potential of this tool (Rivella *et al.*, 2003), which is also employed in studies concerning the gain of function of certain genes in early human development processes, through the transduction of human embryonic stem cells (Ma *et al.*, 2003). Zhang *et al.* (2002) have reported the transduction of mesenchymal stem cells (MSC) with the maintenance of their

differentiation status. Adipocytes have also been efficiently transduced with HIV-based vectors without showing any collateral effects (Carlotti *et al.*, 2004). Experimental data using adeno-associated vectors have not resulted in similar benefits. These studies present important implications on obesity gene therapy research, and suggest once again that HIV may be more adequate than other vectors depending on the target cell considered (Carlotti *et al.*, 2004). Other examples for *in situ* and *in vivo* retroviral gene therapy between HIV and MLV-based vectors have been compared by Blesch (2004).

Final remarks

We discussed here some of the primary concerns involved in the use of HIV-based vectors as gene transfer tools. An open debate comparing the use of primate or non-primate lentivectors remains essential for the development of safety tests and the generation of more information about HIV vectors. Better and safer agents for clinical trials can be explored with the help of basic research experiments. In fact, the field of retrovector design is starting to invest in the production of such answers. More comparative studies are about to come and new approaches to evaluate issues such as immune responses and side effects of retrovectors will enrich retroviral-mediated gene therapy. In a near future, we hope that phase three clinical trials will be conducted with all the biosafety concern needed, particularly those related to the clinical use of HIV-based vectors.

Acknowledgments

We thank Guido Lenz, José Arthur Bogo Chies, Leonardo Karan Teixeira, Ricardo Dobrovolski, Andréia Vargas and Eduardo Avila for helpful discussions. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho de Aperfeiçoamento Pessoal em Nível Superior (CAPES).

References

- Amalfitano A and Parks RJ (2002) Separating fact from fiction: assessing the potential of modified adenovirus vectors for use in human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2:111-133.
- An DS, Wersto RP, Agricola BA, Metzger ME, Lu S, Amado RG, Chen ISY and Donahue RE (2000) Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34+ cells. *J Virol* 74:1286-1295.
- Baekelandt V, Claeys A, Eggermont K, Lauwers E, Strooper BD, Nuttin B and Debyser Z (2002) Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Human Gene Ther* 13:841-853.
- Bahner I, Kearns K, Coutinho S, Leonard EH and Kohn DB (1997) Infection of human marrow stroma by human immunodeficiency virus -1 (HIV-1) is both required and sufficient for HIV-1 induced hematopoietic suppression *in vitro*: demonstration by gene modification of primary human stroma. *Blood* 90:1787-17898.
- Bainbridge JWB, Stehens C, Parsley K, Demaison C, Halfyard A, Thrasher AJ and Ali RR (2001) *In vivo* gene transfer to the mouse eye using an HIV based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene Ther* 8:1665-1668.
- Blesch A (2004) Lentiviral and MLV based retroviral vectors for *ex vivo* and *in vivo* gene transfer. *Methods* 33:164-172.

- Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM and Gage FH (1997) Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71:6641-6649.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M and Yee J-K (1993) Vesicular stomatitis virus g glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to a very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:8033-8037.
- Carlotti F, Bazuine M, Kekarainen T, Seppen J, Pognonec P, Maasen JA and Hoeben RC (2004) Lentiviral vectors efficiently transduce quiescent mature 3T3-L1 adipocytes. *Mol Ther* 9:209-218.
- Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Haas DL, Xu D, Stripecke R, Naldini L, Kohn DB and Crooks GM (1999) Stable transduction of quiescent CD34+CD38- human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:2988-2993.
- Chen J, Reeves L, Sanburn N, Croop J, Williams DA and Cornetta K (2001) Packaging cell line DNA contamination of vector supernatants: implication for laboratory and clinical research. *Virology* 282:186-197.
- Chen S-T, Lida A, Guo L, Friedmann T and Yee J-K (1996) Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:10057-10062.

- Chinnasamy N, Chinnasamy D, Toso JF, Lapointe R, Candoti F, Morgan RA and Hwu P (2000) Efficient gene transfer to human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells using human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *Human Gene Ther* 11:1901-1909.
- Chong H, Starkey W and Vile RG (1998) A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs and endogenous retroviral sequences. *J Virol* 72:2663-2670.
- Chu P, Lutzko C, Stewart AK and Dubé ID (1998) Retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *J Mol Med* 76:184-192.
- Corbeau P, Kraus G and Wong-Staal F (1996) Efficient gene transfer by a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived vector utilizing a stable HIV packaging cell line. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:14070-14075.
- Cornetta K, Morgan RA and Anderson WF (1991) Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Human Gene Ther* 2:5-14.
- Cui Y, Iwakuma T and Chang LJ (1999) Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function. *J Virol* 73:6171-6176.
- Déglon N, Tseng JL, Bensadoun J-C, Zurn AD, Arsenijevic Y, De Almeida LP, Zufferey R, Trono D and Aebischer P (2000) Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential

- gene transfer system in Parkinson's disease. *Human Gene Ther* 11:179-190.
- Delenda C (2004) Lentiviral vectors: optimisation of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6:S125-S138.
- Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M and Trasher AJ (2002) High level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promotor. *Human Gene Ther* 13:803-813.
- Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A and Naldini L (2001) A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Human Gene Ther* 12:981-997.
- Han JJ, Mhatre AN, Wareing M, Pettis R, Gao W-Q, Zufferey RN, Trono D and Lalwani AK (1999) Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by lentivirus-derived gene transfer. *Human Gene Ther* 10:1867-1873.
- Hildinger M, Abel KL, Ostertag W and Baum C (1999) Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* 73:4083-4089.
- Holmes, EC (2001) On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV) *Biol Rev* 76:239-254.
- Ismail SI, Kingsman SM, Kingsman AJ and Uden M (2000) Split-intron retroviral vectors: enhanced expression with improved safety. *J Virol* 74:2365-2371.

- Iwakuma T, Cui Y and Chang L-J (1999) Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261:120-132.
- Johnson LG, Olsen JC, L Naldini and Boucher RC (2000) Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia *in vivo*. *Gene Ther* 7:568-574.
- Kearns-Jonker M, Fischer-Lougheed J, Shulkin I, Kleihauer A, Mitsuhashi N, Kohn DB, Weinberg K, d'Apice A, Starnes VA and Cramer DV (2004) Use of lentiviral vectors to induce long-term tolerance to gal+ heart grafts. *Transplantation* 71:1748-1754.
- Kim VN, Mitrophanous K, Kingsman S and Kingsman AJ (1998) Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:811-816.
- Klages N, Zufferey R and Trono D (2000) A stable system for the high titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2:170-176.
- Kostic C, Chiodini F, Salmon P, Wiznerowicz M, Deglon N, Hornfeld D, Trono D, Aebischer P, Schorderet DF, Munier FL and Arsenijevic Y (2003) Activity and analysis of housekeeping promoters using self-inactivating lentiviral vector delivery into the mouse retina. *Gene Ther* 10:818-821.
- Landau NR, Page Ka and Littman DR (1991) Pseudotyping with human T-cell leukaemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J Virol* 65:162-169.
- Lever AM, Strappe PM and Zhao J (2004) Lentiviral vectors. *J Biomed Sci* 11:439-449.

- Ma Y, Ramezani A, Lewis R, Hawley RG and Thomson JA (2003) High level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 21:111-117.
- Manganini M, Serafini M, Bambacioni F, Casati C, Erba E, Follenzi A, Naldini L, Bernasconi S, Gaipa G, Rambaldi A, Biondi A, Golay J, Introna M (2002) A Human Immunodeficiency Virus type 1 pol gene-derived sequence (cPPT/CTS) increases the efficiency of transduction of human nondividing monocytes and T lymphocytes by lentiviral vectors. *Human Gene Ther* 13:1793-1807.
- Meirelles LS and Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Brit J Haematol* 123:702-711.
- Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH and Verma IM (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72:8150-8157.
- Mordelet E, Kissa K, Calvo C-F, Lebastard M, Milon G, Van der Werf S, Vidal C and Charneau P (2002) Brain engraftment of autologous macrophages transduced with a lentiviral flap vector: an approach to complement brain dysfunctions. *Gene Ther* 9:46-52.
- Naldini L (1998) Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* 9:457-463.
- Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D and Verma IM (1996a) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the

transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proc Nat Acad Sci USA 93:11382-11388.

Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM and Trono D (1996b) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272:263-267.

Ory DS, Neugeboren BA and Mulligan RC (1996) A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus g pseudotypes. Proc Nat Acad Sci USA 93:11400-11406.

Otto E, Jones-Trower A, Vanin EF, Stambaugh K, Mueller SN, Anderson WF and McGarrity GJ (1994) Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vector sequences. Human Gene Ther 5:567-575.

Page KA, Landau NR and Littman DR (1990) Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. Proc Nat Acad Sci USA 64:5270-5276.

Pagès JC and Bru T (2004) Toolbox for retrovectorologists. J Gene Med 6:S67-S82.

Pan D, Gunther R, Duan W, Wendell S, Kaemmerer W, Kafri T, Verma IM and Whitley CB (2002) Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of *in vivo* transduction of bone marrow. Mol Ther 6:19-29.

- Park F and Kay MA (2001) Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 4:164-173.
- Parolin C, Dorfman T, Palù G, Gottlinger H and Sodroski J (1994) Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol* 68:3888- 3895.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML and Baltimore D (1993) Production of high titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:8392-8396.
- Poeschla E, Corbeau P and Wong-Staal F (1996) Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:11395-11399.
- Price MA, Case SC, Carbonaro DA, Yu X-J, Petersen D, Sabo KM Curran MA, Engel BC, Margarian H, Abkowitz JL, Nolan GP, Kohn DB and Crooks GM (2002) Expression from second-generation feline immunodeficiency virus is impaired in hematopoietics cells. *Mol Ther* 6:645-652.
- Ramezani A, Hawley TS and Hawley RG (2000) Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2:458-469.
- Reiser J (2000) Production and concentration of pseudotyped HIV-1 based gene transfer vectors. *Gene Ther*, 7:910-913.

- Reiser J, Harmison G, Stahl SK, Brady RO, Karlson S and Schubert M (1996) Transduction of nondividing cells by using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:15266-15271.
- Rivella S, May C, Chadburn A, Rivière I and Sadelain M (2003) A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human b-globin gene transfer. *Blood* 101:2932-2939.
- Romano G, Micheli P, Pacilio C and Giordano A (2000) Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18:19-39.
- Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B and Cornetta K (2002) Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9:1155-1162.
- Sastry L, Xu Y, Johnson T, Desai K, Rissing D, Marsh J and Cornetta K (2003) Certification assays for HIV-1 based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol Ther* 8:830-839.
- Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, Bohne J, Kräusslich H-G and Baum C (2000) Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* 2:435-445.
- Sheridan PL, Bodner M, Lynn A, Phuong TK, DePolo NJ, Vega DJ, O'Dea J, Nguyen K, McCormack JE, Driver DA, Townsend K, Ibañez CE, Sajjadi NC, Greengard JS, Moore MD, Respass J, Chang SMW,

Dubensky TW, Jolly DJ and Sauter SL (2000) Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production and clinical application: improved safety and high titer. *Mol Ther* 2:262-2775.

Silva EA (2002) O vírus da imunodeficiência felina (FIV) como vetor de transferência gênica para células de linhagem hematopoética e estroma de medula óssea murina. MSc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart-Kupferschmitt A, Charneau P (2000) The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96:4103-4110.

Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM and Kingsman AJ (1995) A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucl Ac Res* 23(4):628-633.

Swanstrom R and Wills JW (1997) Retroviral gene expression: synthesis, assembly and processing of viral proteins. In: Varmus HE, Coffin JM and Hughes SH (eds) *Retroviruses*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp 263-334.

Wang X, Appukuttan B, Ott S, Patel R, Irvine J, Song J, Park J-HC, Smith R and Stout JT (2000) Efficient and sustained transgene expression in

human corneal cells mediated by a lentiviral vector. *Gene Ther* 7:196-200.

Wu X, Wakefield JK, Liu H, Xiao H, Kralovics R, Prchal JT and Kappes JC (2000) Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol Ther* 2:47-55.

Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM and Kafri T (2001) Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 3:97-104.

Yam PY, Li S, Wu J, Hu J, Zaia JA and Yee J-K (2002) Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells. *Mol Ther* 5:479-484.

Yee J-K, Miyanohara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC and Friedman T (1994) A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:9564-9568.

Zhang X-Y, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P and Reiser J (2002) Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol Ther* 5:555-565.

Zhu Y, Feuer G, Day SL, Wrzesinski S and Planelles V (2001) Multigene lentiviral vectors based on differential splicing and translational control. *Mol Ther* 4:375-382.

Legends

Figure 1 - Genomic organization of retrovirus genome. Additional genes are present in lentiviruses, such as HIV.

Figure 2 - Production of retrovectors by transient transfection (adapted from Silva, 2002). Packaging cell lines are transiently transfected with the vectors responsible for recombinant viruses assembly. In cases (A) and (B), retrovectors are not functional. Complete vectors, able to infect and transduce target cells, are produced only when the packaging cells are transfected with the three plasmids (C).

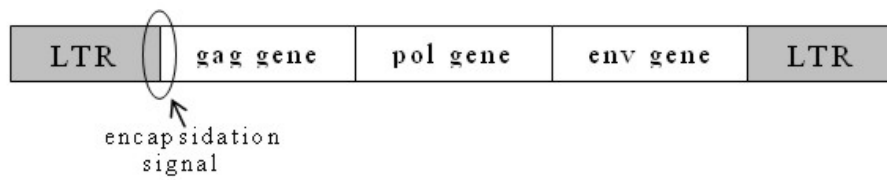


Fig 1

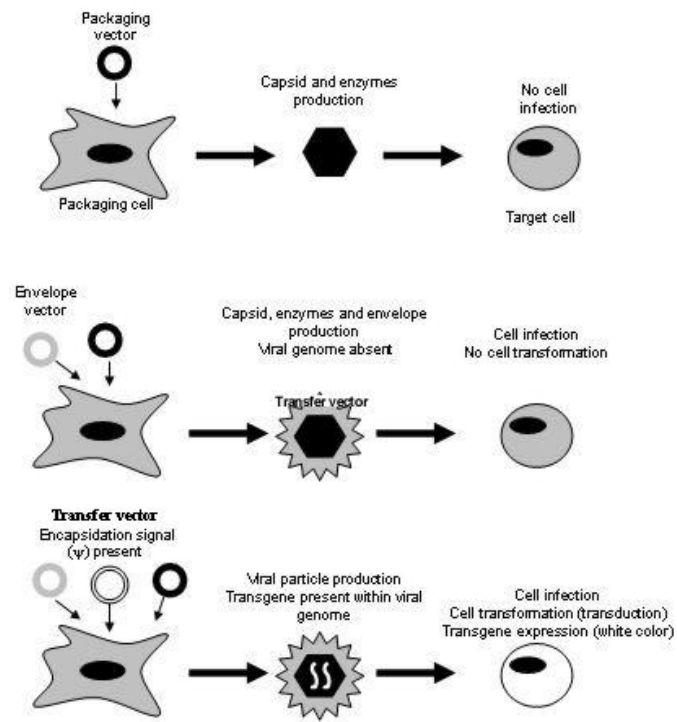


Fig 2

Discussão



“The way in which Alain Fischer, marina Cavazzana-Calvo and their collaborators acted upon the discovery of the tragic complication seen in two of their patients has been exemplary. Their willingness to share in real time with scientific colleagues as well as regulatory agencies and advisory boards in multiple countries meets the standard to which all medical scientists should strive: placing health, safety and rights of the human subjects of gene therapy research as an unwavering primary consideration.”

*Don B. Kohn (President of The American Society of Gene Therapy) –
Gene Therapy in 2003: Breadth and vigor*

Discussão

A produção de vetores virais para terapia gênica tem valorizado aspectos mais básicos da pesquisa, nos últimos anos. A adequação dos protocolos de entrega de plasmídeos relacionados à etapa de produção de vírus considera a origem das células empacotadoras e o sistema de transfecção empregado como os pontos chave do processo. Revisões atuais destacam tais aspectos (Lever *et al.*, 2004; Merten, 2004). Nesse contexto, a investigação do potencial de novas linhagens celulares para a produção de lentivetores disponibiliza um nicho de pesquisa que volta a ser valorizado, juntamente com a virologia básica dos lentivetores e a resposta imune aos mesmos.

A linhagem de célula tronco mesenquimal murina, estabelecida em 2003, apresenta-se como material muito rico para pesquisa, sendo que suas potencialidades estão sendo avaliadas em projetos individuais, valorizando biologia básica, terapia celular e terapia gênica. O presente projeto foi executado com o intuito de avaliar se essa linhagem poderia produzir lentivetores da mesma forma que as linhagens convencionais (Cos, 293 e derivadas, entre outras), buscando aspectos que pudessem ser contrários ou favorecedores dessa hipótese. Os títulos virais obtidos colocam essa linhagem no nível das demais linhagens empacotadoras disponíveis.

Formas sinciciais, consequência da expressão de proteínas lentivirais e principalmente da proteína VSV-G, não foram observadas. Ao contrário do que ocorre com uma cultura de células 293T, fracamente aderente, as mMSC mantém sua aderência ao longo de todo o processo de produção de vírus, o que facilita a manipulação das culturas para coleta de sobrenadante viral. Esses aspectos – altos títulos, ausência de formas sinciciais e forte aderência – tornam essa linhagem um atrativo para a investigação quanto à possibilidade de desenvolvimento de PCLs estáveis, para emprego em TG.

PCLs estáveis ainda não atingiram os objetivos máximos da TG viral: produzir vírus em boa quantidade, com segurança, de modo homogêneo

(revisado em Pagés & Bru, 2004). Lentivirus apresentam proteínas tóxicas, que podem comprometer a durabilidade das PCLs, bem como a constante expressão de VSV-G, que obriga o emprego de um sistema controlado como alternativa à transfecção transiente (Arai *et al.*, 1998; Haselhorst *et al.*, 1998) . Ainda assim, sistemas estáveis estão sendo avaliados para futura liberação em nível clínico (Ikeda *et al.*, 2003), mas nenhuma linhagem foi ainda autorizada pelas agências competentes a ser empregada como sistema padrão, baseado em lentivírus, em todos centros de pesquisa.

Licenciadas para produção de vírus foram as linhagens NIH3T3 e PG13 (ambas murinas); no entanto, sabe-se que o *background* dessas células pode favorecer a formação de RCVs e gerar estoques que não sejam aprovados nos testes de biosegurança (Chakraborty *et al.*, 1994; Chakraborty *et al.*, 1995; Patience *et al.*, 1998). Para produção de adenovírus foi autorizado o emprego de 293 e derivativas, para transfecção com precipitação de fosfato de cálcio (Lee *et al.*, 1995), além de ter sido recomendada como linhagem padrão para titulação de vetores contendo o gene *gfp* (Sastry *et al.*, 2002). Ainda assim, outras linhagens estão sendo avaliadas, como TE 671 e CEM (Cosset *et al.*, 1995; Pizzato *et al.*, 2001) e propostas de novas PCLs tendem a gerar estudos em série, que vão desde a repetição dos experimentos, até a avaliação de métodos alternativos de transfecção.

O protocolo otimizado para a linhagem celular empregada neste trabalho desconsiderou os altos títulos obtidos com 24 μg de DNA plasmidial (fig. 1 do anexo), uma vez que o valor intermediário se mostrou mais consistente, permitindo maior homogeneidade entre os títulos (fig. 2 do anexo) e melhor cinética de cultura. As linhagens celulares apresentam suscetibilidades distintas à transfecção com fosfato de cálcio e é importante ressaltar que para uma avaliação completa do potencial da mMSC no campo da produção de lentivetores outros sistemas de entrega gênica deveriam ser considerados.

A eletroporação poderia ser vantajosa pela possibilidade de emprego de grandes quantidades de DNA (30 μg) sem os efeitos negativos para a

transfecção com fosfato de cálcio com tais quantidades (Jordan & Wurm, 2004). Refinamentos da co-precipitação com fosfato de cálcio também poderiam ser avaliados, como a transfecção reversa e a calfecção (Yoshikawa *et al.*, 2004; Lindell *et al.*, 2004). Reagentes alternativos como o FUGENE, considerado bastante adequado para células mais resistentes ao fosfato de cálcio, poderiam melhorar a eficiência de transfecção (Jacobsen *et al.*, 2004). Talvez, no futuro da terapia gênica, seja importante considerar o tipo celular específico a ser empregado como PCL para definição do sistema de transfecção. Isso pode não parecer prático do ponto de vista da padronização das técnicas, mas pode contribuir significativamente para a definição de protocolos em nível clínico com mais chances de produção de estoques dentro dos objetivos da TG viral: boa quantidade de vírus e ausência de contaminantes (RCVs).

Para a implementação do sistema viral baseado em HIV-1, foram selecionados genes repórter, que facilitaram enormemente a análise das transfecções e transduções, especialmente no que diz respeito ao emprego de mMSC como PCL. Conforme mencionado no artigo, a produção de vetores baseados no sistema FUGW forneceu títulos equivalentes aos de PCL baseada em linhagem 293T, apesar de a expressão de *gfp* nas culturas de mMSC transfectadas ter sido bastante baixa (fig. 3 do anexo). Já que a eletroporação dessas células, com plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech, Biosciences) demonstrou que é possível expressar *gfp* nessas células (fig. 4 do anexo), resta confrontar a construção FUGW com outro sistema viral também baseado em HIV-1, como por exemplo derivações do sistema Lentilox (Wiznerowicz & Trono, 2003), que apresenta taxas de infecção próximas a 100% e forte expressão do gene *gfp*. Esse construto é um dos últimos melhoramentos realizados sobre os vetores auto-inativantes derivados de HIV-1 e é um excelente referencial para investigar a questão da expressão do transgene *gfp* durante a transfecção de mMSC.

Os *backbones* dos construtos tendem a influenciar fortemente os níveis de expressão do transgene, em função de promotores e transativadores presentes nos mesmos. A interação desse construto com o

background das células empacotadoras pode remeter a títulos mais altos ou mais baixos, bem como a uma maior propensão à formação de variantes virais replicação-competentes. Já foram descritos problemas oriundos da interação de um *background* celular murino e sistemas retrovirais, basicamente oscilação de título e formação de RCVs. De fato não existem estudos aprofundados sobre as conseqüências mais diretas do emprego de linhagens celulares murinas para produção de lentivetores baseados em HIV-1, especificamente. É possível, contudo, empacotar seqüências retrovirais endógenas murinas em partículas retrovirais, o que favorece a formação de RCVs (Torrent *et al.*, 1994). Cabe ressaltar que células humanas não apresentam retrovírus endógenos murinos (Rigg *et al.*, 1996; Forestell *et al.*, 1997).

Nesse contexto, o estabelecimento de uma linhagem de MSC de origem humana poderia favorecer os estudos comparativos, que ainda são incipientes em termos de terapia gênica viral. A comparação entre os resultados oriundos dos testes de biosegurança, incluindo a quantificação de p24, para a linhagem murina e para a linhagem humana são de grande valia. Não sabemos, por exemplo, se o *background* dessa linhagem favorece a recombinação homóloga entre os plasmídeos ou entre seqüências endógenas. Sobreposições pequenas, de 8 nucleotídeos, já são suficientes para formação de RCVs por recombinação homóloga (Otto *et al.*, 1994).

Os testes de segurança realizados durante a execução do projeto consideraram principalmente a mobilização de seqüências virais de envelope e de sinal de encapsidação *psi*, conforme descrito no artigo. Ainda assim, a detecção dessas seqüências por PCR não é uma abordagem segura, se realizada isoladamente, e testes complementares são necessários (Sastry *et al.*, 2003). O quanto tais protocolos são válidos para produção de vetores em grande escala ainda é questionável. Sistemas de detecção de RCVs voltados especificamente para produção de lentivetores baseados em HIV-1 produzidos em larga escala já estão disponíveis (Escarpe *et al.*, 2003); tal metodologia, no entanto, não pode ser adaptada aos volumes de

sobrenadante viral processados em nossas instalações. O sistema proposto por Sastry *et al.* (2003) é mais adequado, sob esse aspecto .

O único caso positivo de RCV foi proporcionado pela contaminação das células Sca-1+ não-aderentes com células mMSC oriundas da linhagem empacotadora. Quando as células Sca-1+ foram transferidas para o ensaio clonogênico, com o intuito de avaliar a capacidade de diferenciação dessas células, colônias de mMSC foram estabelecidas (fig. 5 do anexo). Tais colônias representaram, seguramente, a razão pela qual os testes de mobilização de seqüências de envelope e de encapsidação *psi* resultaram positivos, apesar de as células indicadoras não terem expressado os genes repórter. O cocultivo de células-alvo com células empacotadora requer ajustes que reduzam a possibilidade de formação de RCVs. A PCL deveria ter sido irradiada antes do estabelecimento do cocultivo, mas ainda assim não se poderia garantir a ausência de contaminação da cultura em suspensão. A contaminação com DNA plasmidial oriundo da PCL poderia também resultar em testes positivos para detecção de RCVs (Chen *et al.*, 2001).

A última etapa do projeto consistiu na transdução de células mMSC com vírus produzidos em nosso laboratório, para estabelecimento de uma linhagem homogênea para expressão de *beta galactosidase*. Após a diluição limitante da cultura inicial, clones foram cultivados isoladamente e expandidos, até que fossem examinados para a expressão do gene repórter. As culturas com níveis próximos a 100% de células transduzidas foram novamente expandidas e essas linhagens se encontram disponíveis, para emprego em pesquisa com célula tronco mesenquimal. Do ponto de vista da TG viral, a análise da expressão do transgene antes e após a indução a diferenciação celular pode ser válida para estudos de silenciamento. A literatura relata casos de silenciamento do transgene ocasionados por remodelamento de cromatina (Chen *et al.*, 1997; Chen & Townes, 2000). Tais estudos não consideraram, contudo, um *background* lentiviral baseado em HIV-1, especialmente em um *background* de célula tronco mesenquimal. De um modo geral, lentivetores baseados em HIV são considerados

extremamente estáveis, não sendo silenciados durante a gametogênese ou desenvolvimento (Lois *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2003). No caso das culturas isoladas, há 5 meses, a expressão do transgene ainda é detectável em grande parte das células. A redução da intensidade de expressão é evidente, especialmente se comparada aos cultivos de mMSC originados de camundongos transgênicos ROSA 26, que expressam *beta galactosidase* constitutivamente. É possível que o local da inserção do provírus seja o responsável por tal variação de expressão; ainda não foram programados experimentos para a comprovação de tal hipótese. Uma abordagem semelhante de isolamento de mMSC transduzidas com sistema contendo o gene *gfp* (LentiLox) está sendo realizada. O objetivo final é o mesmo mencionado anteriormente: avaliar a manutenção da expressão do transgene após a diferenciação dessas células, no caso de não ocorrer interferência na biologia da célula tronco mesenquimal.

Ainda que esse trabalho tenha sido proposto com o intuito de estabelecimento de uma técnica, a disponibilização de uma ferramenta de transferência gênica como os lentivectores baseados em HIV-1 pode favorecer enormemente os estudos de TG desenvolvidos no nosso laboratório, através da comparação entre sistemas onco e lentivirais, conforme mencionado anteriormente. Além disto, essa ferramenta pode ser de interesse a outros grupos de pesquisa, favorecendo o desenvolvimento de projetos multidisciplinares. De fato, espera-se que o interesse pela potencialidade do emprego dessa linhagem para TG viral seja manifestado por outros pesquisadores, possibilitando que esses vetores sejam avaliados frente a diferentes células-alvo. Futuramente, espera-se também que seja avaliada a potencialidade dessa linhagem como PCL estável, para TG

Anexos



(Informações complementares referentes ao projeto executado que não puderam ser incluídas no artigo experimental).

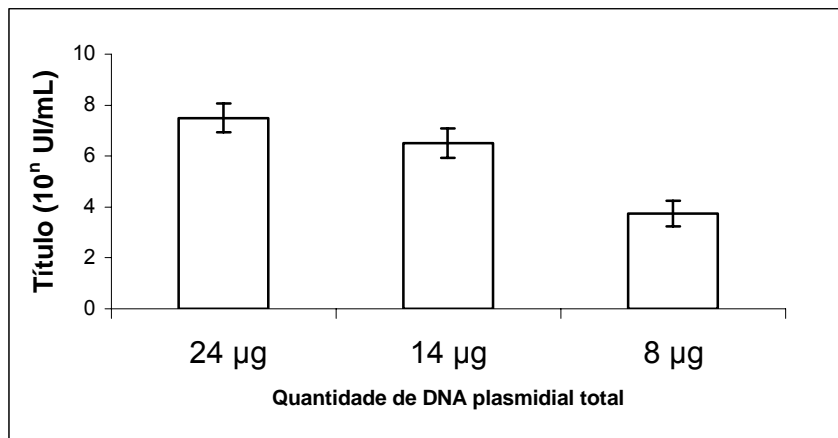
Resultados adicionais referentes à transfecção de mMSC

Figura 1: Avaliação da quantidade final de DNA plasmidial empregada na transfecção de mMSC. Os valores representam a proporção entre vetor empacotador, vetor de transferência e vetor envelope utilizados no estabelecimento da PCL baseada em mMSC. Os dados representam dois experimentos realizados em duplicatas.

Títulos obtidos em mMSC PCL após definição das condições de transfecção

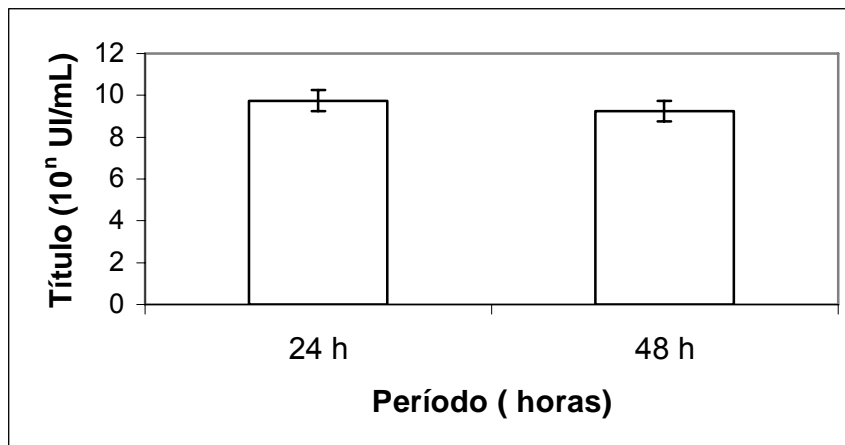


Figura 2: Títulos obtidos após transfecção de mMSC com 14 μ g de DNA plasmidial. Os valores apresentados representam a média entre quatro experimentos independentes.

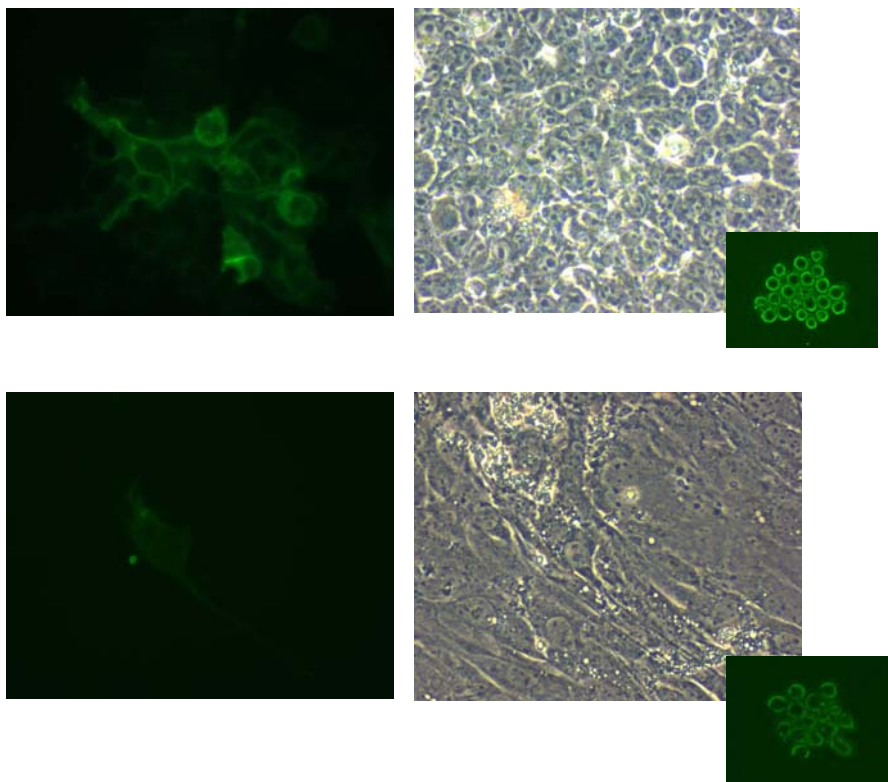
Sistema FUGW em PCL baseada em célula 293T e mMSC

Figura 3: Transfecção de sistema baseado em *gfp* (sistema FUGW) em linhagem de célula 293T e mMSC. Microscopia de fluorescência (esquerda) e de contraste de fase (direita). Acima: células 293T. Abaixo: células mMSC. Detalhe: células K562 transduzidas com estoques oriundos das respectivas PCLs. Não foram observadas diferenças em relação ao título viral obtido ou a eficiência de infecção. Aumentos de 40X; detalhe de 20X.

Eletroporação de mMSC com plasmídeo pEGFP-N1

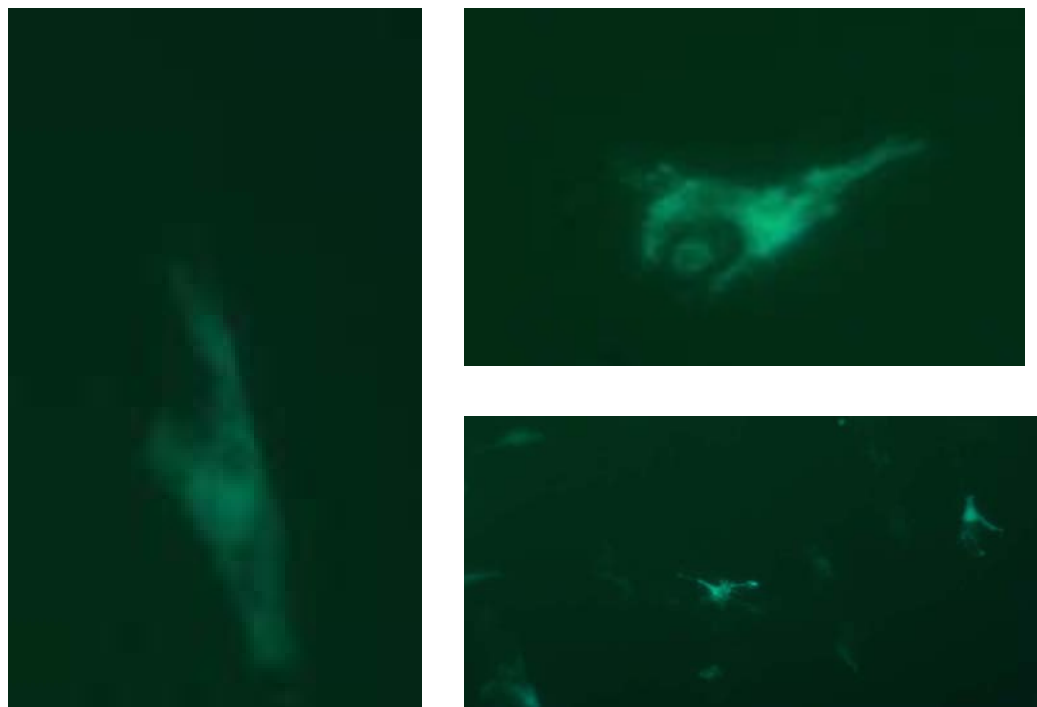


Figura 4: Eletroporação de células tronco mesenquimais com plasmídeo pEGFP-N1. A metodologia empregada ainda está em fase de ajustes, motivo pelo qual não foi descrita nessa dissertação. Aumento: de 10X.

Sistema de cocultivo de célula Sca1+ e linhagem mMSC utilizada como PCL

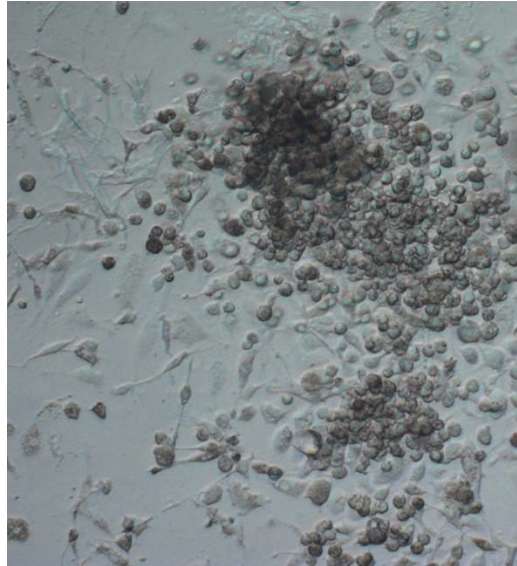


Figura 5: Presença de células mMSC entre as células Sca1+, no ensaio clonogênico. Resultado provável de contaminação da fração de células transduzidas com células oriundas da PCL. Aumento de 5X.

Bibliografia



*"... fechou o livro (sinal de identificação de uma irmandade secreta)
e ela teve vontade de saber o que ele estava lendo".*

Milan Kundera - A insustentável leveza do ser

Bibliografia

Arai T, Matsumoto K, Saitho K, Ui M, Ito T, Murakami M, Kanegae Y, Saito I, Cosset FL, Takeuchi Y & Iba H (1998) A new system for stringent, high titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines. *Journal of Virology*, 72: 1115-1121.

Blaese RM, Anderson WF, Culver KW & Rosenberg SA (1990) The ADA human gene therapy clinical protocol. *Human Gene Therapy*, 1: 327-362.

Brown MD, Schätzlein AG & Uchegbu IF (2001) Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 229: 1-21.

Buchsacher GL & Wong-Staal F (2000) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, 95: 2499-2504.

Bukrinsky MI & Haffar OK (1999) HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Frontiers of Bioscience*. 4:772-781.

CDC – Center for Disease Control and Prevention; National Institute of Health (1999) *Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories*. 4th ed. U.S. Government Printing Office, EUA, 250p.

Chakraborty AK, Zink MA & Hodgson CP (1994) Transmission of endogenous VL30 retrotransposons by helper cells used in gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 1:113-118.

Chakraborty AK, Zink MA & Hodgson CP (1995) Expression of VL30 vectors in human cells that are targets for gene therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209: 677-683.

Check E (2002 a) A tragic setback. *Nature*, 420: 116-118.

Check E (2002 b) Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer. *Nature*, 419: 545-546.

Chen J, Reeves L, Sanburn N, Croop J, Williams DA & Cornetta K (2001) Packaging cell line DNA contamination of vector supernatants: implication for laboratory and clinical research. *Virology*, 282: 186-197.

Chen WY & Townes TM (2000) Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin

condensation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97: 377-382.

Chen WY, Bailey EC, McCune SL, Dong J-Y & Townes TM (1997) Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibition of histone deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94: 5798-5803.

Chong H, Starkey W & Vile RG (1998) A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs and endogenous retroviral sequences. *Journal of Virology*, 72:2663-2670.

Cornetta K, Morgan RA & Anderson WF (1991) Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Human Gene Therapy*, 2:5-14.

Cosset F-L, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA & Collins MKL (1995) High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human complement. *Journal of Virology*, 69: 7430-7436.

Cui Y, Iwakuma T & Chang LJ (1999) Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function. *Journal of Virology*, 73: 6171-6176.

Culver KW & Blaese RM (1994) Gene therapy for cancer. *Trends in Genetics*, 10: 174-178.

Daly G & Chernajovsky Y (2000) Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. *Molecular Therapy*, 2: 425-434.

Dani SU (1999) The challenge of vector development in gene therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32:133-145.

Di Natale P, Domenico CD, Villani GRD, Lombardo A, Follenzi A & Naldini, L (2002) In vivo gene therapy of mucopolysaccharidosis type I by lentiviral vectors. *European Journal of Biochemistry*, 269: 2764-2771.

Escarpe P, Zayek N, Chin P, Borellini F, Zufferey R, Veres G & Kiermer V (2003). Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparation. *Molecular Therapy*, 8: 332-341.

Fairbairn LJ, Lashford LS, Spooer E, McDermot RH, Lebens G, Arrand JE, Arrand JR, Bellantuono I, Holt R, Hatton CE, Cooper A, Besley GT, Wraith JE, Anson DS, Hopwood JJ & Dexter TM (1996) Long-term in vitro correction of Alfa-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in

human bone marrow. Proceedings of the National Academy of Science USA, 93: 2025-2030.

Forrestell SP, Dando JS, Chen JVP, de Vries P, Bohlein E & Rigg RJ (1997) Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene Therapy*, 4: 600-610.

Frézard F (2001) Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 181-189.

Greatorex J & Lever A (1998) Retroviral RNA dimer linkage. *Journal of General Virology*, 79: 2877-2882.

Haselhorst D, Kaye JF & Lever AML (1998) Development of cell lines stably expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins for studies in encapsidation and gene transfer. *Journal of General Virology*, 79: 231-237.

Hoffmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E & Pfeifer A (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *European and Molecular Biology Organization*, 4: 1054-1060.

Ikeda Y, Takeuchi Y, Martin F, Cosset FL, Mitrophanous K & Collins M (2003) Continuous high titer HIV-1 vector production. *Nature Biotechnology*, 21:569-572.

Iwacuma T, Cui Y & Chang LJ (1999) Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology*, 261: 120-132.

Jacobsen LB, Calvin SA, Colvin KE & Wright MJ (2004) FUGENE 6 transfection reagent: the gentle power. *Methods*, 33: 104-112.

Jordan, M & Wurm, F (2004) Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 33:136-143.

Kaiser J (2003) Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science*, 299: 495.

Kay MA, Glorioso JC & Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7: 33- 40.

Klarmann GJ, Chen X, North TW & Preston BD (2003) Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand

synthesis initiation during lentiviral reverse transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 7902-7909.

Lanciotti E (2001) *Microbiologia Clínica*. 2ed. Casa Editrice Ambrosiana, Itália, 421pp.

Lee H, Kremer E and Perricaudet M (1995) Adenoviral vectors. In *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*, Hall C (ed). George Disckson Press, 424p.

Lever AML, Strappe PM & Zhao J (2004) Lentiviral vectors. *Journal of Biomedical Science*, 11: 439-449.

Lindell J, Girard P, Muller N, Jordan M & Wurm F (2004) Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1676: 155-161.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ & Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 295: 868-872.

Meirelles LS & Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *British Journal of Hematology*, 123: 702-711.

Merten O-W (2004) State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *The journal of Gene Medicine*, 6: S105-S124.

Miller AD (1990) Retrovirus packaging cells. *Human Gene Therapy*, 1: 5-14.

Miller AD (1992) Human gene therapy comes of age. *Nature*, 357: 455-460.

Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM & Torbett BE (1999). Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science*, 283:682-686.

Naldini L (1998) Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-diving cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 457-463.

Naldini, L.; Blömer, U.; Gage, F.H.; Trono, D. & Verma, I.M. (1996a) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93: 11382-11388.

Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F.H.; Verma, I.M. & Trono, D. (1996b) *In vivo* gene delivery and stable

transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272: 263-267.

Nardi NB, Teixeira LK & Silva EF (2002) Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7(1): 109- 116.

Naylor LH (1999) Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology*, 58: 749-757.

Otto E, Jones-Trower A, Vanin EF, Stambaugh K, Mueller SN, Anderson WF & McGarrity GJ (1994) Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vector sequences. *Human Gene Therapy*, 5: 567-575.

Pagès JC and Bru T (2004) Toolbox for retrovectorologists. *The Journal of gene Medicine*, 6: S67-S82.

Palù G, Bonaguro R & Marcello A (1999) In pursuit of new developments for gene therapy of human diseases. *Journal of Biotechnology*, 68: 1- 13.

Parolin C, Dorfman T, Palù G, Gottlinger H & Sodroski J (1994) Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *Journal of Virology*, 68: 3888- 3895.

Patience C, Takeuchi Y, Cosset FL & Weiss RA (1998) Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *Journal of Virology*, 72: 2671-2676.

Pear WS, Nolan GP, Scott ML & Baltimore D (1993) Production of high titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 90: 8392-8396.

Pizzato M, Merten OW, Blair ED & Takeuchi Y (2001) Development of a suspension packaging cell line for production of high titer, serum-resistant murine leukemia virus vectors. *Gene Therapy*, 8: 737-745.

Price MA, Case SC, Carbonaro DA, Yu X-J, Petersen D, Sabo KM, Curran MA, Engel BC, Margarian H, Abkowitz JL, Nolan GP, Kohn DB and Crooks GM (2002) Expression from second-generation feline immunodeficiency virus is impaired in hematopoietic cells. *Mol Ther* 6:645-652.

Rigg RJ, Chen J, Dando JS, Forestell SP, Plavec I & Bohnlein E (1996) A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety. *Virology*, 218: 290-295.

Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B & Cornetta K (2002) Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Therapy*, 9: 1155-1162.

Sastry L, Xu Y, Johnson T, Desai K, Rissing D, Marsh J & Cornetta K (2003) Certification assays for HIV-1 based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Molecular Therapy*, 8: 830-839.

Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR & Bushman F (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110: 521-529.

Sondhi D, Hackett NR, Apblett RL, Kaminsky SM, Pergolizzi RG & Crystal RG. (2001) Feasibility of gene therapy for late neuronal ceroid lipofuscinosis. *Archives of Neurology*, 58: 1793-1798.

Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM & Kingsman AJ (1995) A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research*, 23(4):628-633.

Torrent C, Bordet T & Darlix JL (1994) Analytical study of rat retrotransposon VL30 RNA dimerization in vitro and packaging in murine leukemia virus. *Journal of Molecular Biology*, 240: 434-444.

Vodicka MA, Koepf DM, Silver PA & Emerman M (1998) HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Development*, 12: 175-185.

Wiznerowicz & Trono (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector mediated drug-inducible RNA interference. *Journal of Virology*, 77: 8957-8961.

Worobey M & Holmes EC (1999) Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80: 2535-2543.

Wu X, Li Y, Crise B & Burgess SM (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 300: 1749-1751.

Yoshikawa T, Uchimura E, Kishi M, Funeriu DP, Miyake M & Miyake J (2004) Transfection microarray of human mesenchymal stem cells and on-chip siRNA gene knockdown. *Journal of Controlled Release*, 96:227-232.

Zaiss AK, Son S, & Chang LJ (2002) RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *Journal of Virology*, 76: 7209-7219.