Relazione scientifica Programma di ricerca Short Term Mobility 2016.

Proponente: Giuseppe Sconocchia

Fruitore: **Sara Caratelli**

Istituto di afferenza:
Farmacologia Traslazionale, Via Del Fosso Del Cavaliere, 100 00133 Roma

Istituzione ospitante: University of North Carolina (UNC), Lineberger Comprehensive Cancer Center, 125 Mason Farm Road, Chapel Hill, NC 27599.

Titolo del programma: Targeting of coloretal carcinoma utilizing atypical Fc gamma-CAR-T cells combined with EGFR monoclonal antibodies

Descrizione del progetto e risultati: Di recente nel nostro laboratorio sono stati generati 3 recettori chimerici per l'antigene (CAR) atipici CD16-CAR, CD32-CAR, CD64-CAR, formati dalle regioni extracellulari dei recettori FcγRIIIa (CD16), FcγRIIa (CD32) e FcγRI (CD64) fuse alla regione transmembrana del CD8 e ai domini di segnalazione intracellulari del CD28 e del CD3ζ. Tali recettori sono stati disegnati con l'obiettivo di impiegarli per ingegnerizzare linfociti T umani al fine di renderli in grado di eliminare cellule di tumore del colon retto (CRC) attraverso un meccanismo di citotossicità mediata da anticorpo (ADCC). L'ingegnerizzazione delle cellule T può avvenire sostanzialmente tramite due principali metodiche che sono la trasduzione retrovirale o l'elettroporazione. Tra le due metodiche l'infezione retrovirale è quella più ampiamente utilizzata dalla comunità scientifica. Tale procedura risulta di fondamentale importanza ai fini del raggiungimento degli obiettivi del nostro progetto e per questo motivo si è reso necessario per me recarmi presso il laboratorio del Prof. Dotti ad acquisire la suddetta metodologia.

Nelle prima settimana di soggiorno ho seguito le procedure di clonaggio per l'inserimento dei CARs da me generati in Italia all'interno del vettore retrovirale SFG utilizzato dal laboratorio ospitante. Nello specifico, dopo aver amplificato tramite PCR i costrutti CD16-CAR e CD32-CAR, i prodotti dell'amplificazione sono stati digeriti con gli enzimi MluI e NcoI ed inseriti mediante ligazione all'interno del vettore SFG anch'esso digerito con gli stessi enzimi. A seguito della trasformazione batterica abbiamo ottenuto 3 cloni per il CD16-CAR e circa 20 cloni per il CD32-CAR. Il successivo screening mediante analisi di restrizione ha evidenziato un clone su tre positivo per il CD16 e 4 cloni su 4 analizzati positivi per il CD32. L'analisi delle sequenze dei cloni positivi ha mostrato una percentuale di identità del 99% con le sequenze presenti nel data base NCBI. Una volta ottenuti i costrutti CD16-CAR e CD32-CAR correttamente inseriti nel

vettore retrovirale SFG, nelle due settimane successive, ne è stata testata l'espressione attraverso trasduzione retrovirale di cellule T. Il protocollo attuato ha richiesto i seguenti passaggi:

1) produzione del retrovirus maturo mediante co-trasfezione della linea impacchettatriche 293T con i costutti CD16- e CD32-CAR e con i plasmidi codificanti per l'envelope virale (RDF) e per le proteine virali gag/pol necessarie per la produzione dei virioni;
2) attivazione delle cellule T con anticorpi anti CD3 e anti CD28 e stimolazione con IL-7 e IL-15;
3) recupero del supernatante virale dalle cellule impacchettatrici dopo 48h e 72h dalla trasfezione;
4) un ciclo di contatto virus/cellule T in piastra da 24 wells ricoperta di retronectina per 72h.

L'esito della trasfezione delle 293T e dell'infezione delle cellule T è stato valutato al citoflurimetro dopo marcatura con gli anticorpi anti-CD16 e anti-CD32 delle cellule trasfettate/ trasdotte.

L'analisi delle cellule 293T ha evidenziato un'elevata efficienza di trasfezione dei costrutti, che risultano espressi da più del 70% delle cellule (figura 1).

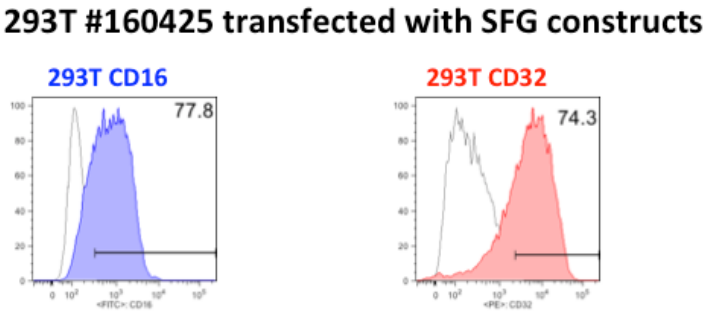

Figura 1. Gli istogrammi mostrano la percentuale di espressione del CD16-CAR e del CD32-CAR in cellule impacchettatrici 293T trasfettate. In blu l'espressione del CD16, in rosso l'espressione del CD32.

Il risultato della trasduzione delle cellule T invece è mostrato dai dot plots presenti in figura 2 in cui si evidenzia, 72h dopo l'infezione, l'espressione del CD16-CAR nel 40% delle cellule T e del CD32-CAR nel 80% delle cellule trasdotte.

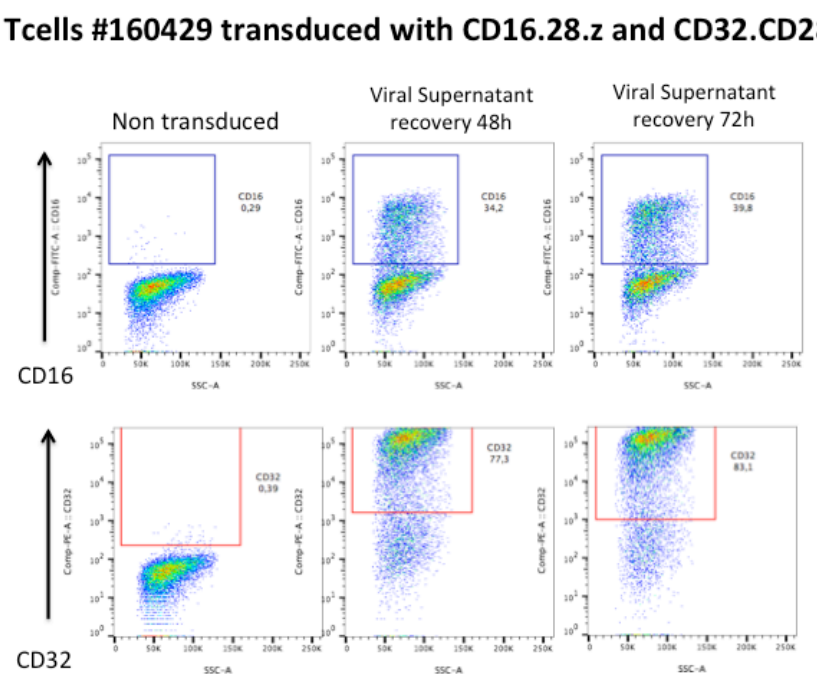

Figura 2. I dot plot mostrano l'avvenuta infezione delle cellule T trasdotte con supernatante retrovirale contenente il CD16-CAR ed il CD32-CAR raccolto a 48 e 72h post-trasfezione.

L'espressione dei CAR è stata testata anche a distanza di 7 giorni dall'infezione ed stata osservata una percentuale di cellule positive per il CD32 analoga a quella vista a 72h post trasduzione (circa 80%) dimostrando la stabilità dell'espressione del transgene. Viceversa, per il CD16 è stata osservata la perdita di circa il 50% delle cellule che erano risultate positive dopo la trasduzione (dati non mostrati). Tale osservazione sarà oggetto di prossime indagini.
Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che, grazie alla metodica di trasduzione retrovirale utilizzata nel laboratorio del Prof.Dotti, è stato possibile ottenere un' espressione efficiente e stabile dei nostri costrutti CD16- e CD32-CAR in cellule T umane. Grazie a questi dati sarà possibile proseguire gli studi nel nostro laboratorio, riproducendo quanto osservato nel laboratorio del Pro. Dotti.

Roma,
05/05/16

In fede,
Sara Caratelli.