

Université de Montréal

**ÉVALUATION DES ANALOGUES DE LA DÉSOXYCYTIDINE DANS
LA THÉRAPIE GÉNÉRIQUE DU CANCER**

par
Christian Beauséjour
Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie

Décembre, 2000

© Christian Beauséjour, 2000



W
4
U58
2001
v.063

L'Université de Montréal

ÉVALUATION DES ANALOGUES DE LA DOXORUBICINE DANS
LA THÉRAPIE RÉGIMÉ DU CANCER

par
Christine Gauthier
Département de Chimie Analytique
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie (Ph.D.)
en Chimie Analytique

1998



12 - rue des Écoles, 2001

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

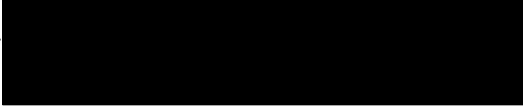
Cette thèse intitulée:

**ÉVALUATION DES ANALOGUES DE LA DÉSOXYCYTIDINE DANS
LA THÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER**

Présentée par

Christian Beauséjour

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Présidente :	Dr Marielle Gascon-Barré
Directeur de recherche :	Dr Richard L. Momparler
Membre du jury :	Dr Martin G. Sirois
Examineur externe :	Dr Jacques Galipeau
Représentant de la F.E.S. :	Dr 

Thèse acceptée le :

Sommaire

Le développement des protocoles en thérapie génique permet d'espérer une amélioration de la médecine moderne à moyen ou long terme. Les différentes possibilités de transferts géniques pourraient s'avérer utiles dans la correction de nombreux désordres génétiques de même que dans le traitement de maladies telles le cancer et des troubles vasculaires. Cette thèse est consacrée principalement à l'étude de l'amélioration de l'utilisation faite des analogues de la désoxycytidine dans le traitement du cancer par la thérapie génique.

En effet, l'efficacité de la chimiothérapie est jusqu'à présent considérablement limitée par les importantes toxicités secondaires, principalement hématopoïétiques, développées suite à l'utilisation d'analogues de la désoxycytidine ou de tout autres agents antinéoplasiques. Il en résulte que la chimiothérapie dans sa forme actuelle est inefficace ou sous-optimale pour un grand nombre de cancers, plus particulièrement les cancers métastatiques. Par conséquent, afin de contourner ces limites, de nouvelles approches thérapeutiques doivent être développées. Il est raisonnable de présumer qu'une amélioration des traitements de chimiothérapie pourrait être obtenue suite à l'augmentation à la fois de la fréquence et de la dose maximale de drogues tolérées par les patients. Une solution intéressante pour améliorer la chimiothérapie du cancer par la thérapie génique consiste à rendre les cellules souches hématopoïétiques résistantes contre les agents anticancéreux. Cette approche permettrait d'intensifier les traitements de chimiothérapie tout en réduisant la toxicité hématopoïétique.

La découverte des mécanismes moléculaires responsables de la résistance aux agents antinéoplasiques permet d'envisager leur utilisation dans le traitement du cancer par thérapie génique. Plusieurs exemples de gène de résistance, tels le gène de multirésistance aux drogues (*multi drug resistance*, MDR) et le gène de la dihydrofolate réductase (DHFR) confèrent une résistance aux drogues lorsque fortement exprimés.

Les analogues de la désoxycytidine, tels la cytosine arabinoside (ARA-C), la 2',2'-difluorodésoxycytidine (dFdC) et la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR), sont des drogues expérimentales approuvées obtenant un certain taux d'efficacité selon le type de cancer ciblé. Le métabolisme de ces analogues est régulé par deux enzymes principales, la désoxycytidine kinase (dCK), pour leur phosphorylation et activation, de

même que la cytidine désaminase (CD), pour leur désamination et inactivation. Des études montrent qu'hausser l'expression du gène de la CD s'avère une approche efficace pour conférer une résistance aux cellules souches hématopoïétiques contre les analogues de la désoxycytidine (Mompalao et al., 1996; Neff et Blau, 1996).

Dans le traitement du cancer, il est fréquent d'administrer conjointement divers agents antinéoplasiques afin d'améliorer les taux de guérison et de réduire les phénomènes de résistance. Par conséquent, il apparaît essentiel de vérifier si les vecteurs présentement à l'essai en thérapie génique peuvent exprimer de façon efficace deux gènes de résistance. Dans cette optique, la présente thèse évalue l'expression conjointe de deux gènes de résistance (CD et DHFR) et ce, à des niveaux suffisamment élevés, afin de conférer une résistance à deux classes distinctes d'agents antinéoplasiques.

Le très grand niveau de résistance conféré par l'expression forcée du gène de la CD permettait d'envisager l'utilisation de ce gène comme marqueur de sélection *in vitro* et *in vivo*. Nous croyons qu'il est possible d'augmenter le nombre de cellules exprimant le transgène CD et son niveau d'expression chez un patient. L'administration d'une série de traitements aux analogues de la désoxycytidine n'éliminerait que les cellules non-modifiées, favorisant ainsi la repopulation du système hématopoïétique du patient par des cellules modifiées à l'aide du gène de la CD principalement. Puisque le transfert initial du nombre de cellules modifiées et l'expression du transgène sont souvent très faibles chez l'humain, cette approche permettrait d'obtenir l'expression du transgène à des niveaux thérapeutiques souhaités. Nos résultats obtenus supportent l'hypothèse de l'utilisation du gène de la CD comme marqueur de sélection.

Par ailleurs, la diminution de l'activité enzymatique de la dCK afin de conférer une résistance aux analogues de la désoxycytidine est une autre avenue très intéressante. Notre étude montre qu'il est possible de réduire l'activité de la dCK *in vitro* chez des cellules leucémiques par l'entremise de ribozymes de type *hammerhead*.

Les résultats de la présente thèse suggèrent que la modulation de l'activité enzymatique de la CD et de la dCK, par des procédés de thérapie génique, peut s'avérer une excellente approche thérapeutique dans le traitement du cancer par les analogues de la désoxycytidine.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
ABRÉVIATIONS.....	xii
DÉDICACE.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION

AVANT-PROPOS.....	2
CHAPITRE 1 : Les analogues de la désoxycytidine.....	3
1.1 Cytosine arabinoside.....	3
1.2 2',2,-Difluorodésoxycytidine.....	4
1.3 5-Aza-2'-désoxycytidine.....	5
1.4 Le métabolisme et les mécanismes de résistance aux analogues de la désoxycytidine.....	6
CHAPITRE 2 : Le potentiel de la thérapie génique dans le traitement du cancer et des maladies génétiques.....	11
2.1 Le cancer.....	11
2.2 Différentes approches thérapeutiques dans la thérapie génique du cancer.....	12
2.3 Principe de chimioprotection	15
2.3.1 Risques associés à la chimioprotection.....	17a
2.4 Principe de sélection et son implication dans le traitement des maladies génétiques.....	20
2.5 Les cellules souches hématopoïétiques comme cellules cibles.....	23

CHAPITRE 3 : Les différents types de vecteurs utilisés en thérapie génique.....	26
3.1 Les rétrovirus.....	26
3.2 Autres principaux vecteurs.....	30
3.2 Cycle de réplication des rétrovirus et production de particules rétrovirales à partir d'une lignée d'encapsidation.....	33
3.4 Les vecteurs bicistroniques.....	36
CHAPITRE 4 : L'utilisation des acides nucléiques pour la suppression de l'expression génique.....	37
4.1 Les ribozymes.....	37
4.1.1 L'utilisation des ribozymes en thérapie génique.....	39
4.2 Les désoxyribozymes	40
4.3 Les oligonucléotides antisens.....	41
CHAPITRE 5 : Les principaux gènes de résistance aux drogues utilisés en thérapie génique.....	43
5.1 Le gène de multirésistance aux drogues.....	43
5.1.1 Potentiel de chimioprotection.....	44
5.1.2 Potentiel de sélection.....	44
5.1.3 Résultats cliniques obtenus à ce jour.....	45
5.2 Le gène de la méthylguanine-ADN méthyltransférase.....	47
5.2.1 Potentiel de chimioprotection.....	48
5.2.2 Potentiel de sélection.....	49
5.3 Le gène de la dihydrofolate réductase.....	50
5.3.1 Potentiel de chimioprotection.....	51
5.3.2 Potentiel de sélection.....	52

5.4	Le gène de la cytidine désaminase.....	53
5.4.1	Potentiel de chimioprotection.....	54
CHAPITRE 6 : Les objectifs de la présente thèse.....		57

DEUXIÈME PARTIE : ARTICLES

CHAPITRE 7 : Article 1.....		59
Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicictronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate.		
Abstract.....		60
Introduction.....		62
Materials and Methods.....		64
Results.....		68
Discussion.....		76
References.....		80
CHAPITRE 8: Article 2.....		86
Selection of drug resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene		
Abstract.....		87
Introduction.....		88
Materials and Methods.....		90
Results.....		93
Discussion.....		103
References.....		108

CHAPITRE 9: Article 3.....	112
----------------------------	-----

Potential of ribozymes against deoxycytidine kinase to confer drug resistance to cytosine nucleoside analogs

Abstract.....	113
Introduction.....	114
Materials and Methods.....	116
Results.....	119
Discussion.....	126
References.....	129

TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION

CHAPITRE 10 : Discussion.....	135
-------------------------------	-----

10.1 Vecteur bicistronique DHFR-CD (article 1).....	136
10.2 Potentiel de sélection du gène CD (article 2).....	139
10.3 Les ribozymes comme agents thérapeutiques (article 3).....	142
10.4 Différentes approches pour améliorer les protocoles de thérapie génique.....	144

RÉFÉRENCES.....	150
-----------------	-----

ANNEXE 1: Curriculum vitae	174
----------------------------------	-----

ANNEXE 2: Article.....	176
------------------------	-----

Gene amplification of human cytidine deaminase proviral cDNA and increased levels of its mRNA produces enhanced drug resistance to cytosine arabinoside in retroviral-transduced murine fibroblast

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1	Caractéristiques des principaux vecteurs utilisés en thérapie génique.....	32
Tableau 7.1	DHFR and CD enzyme activities of mock and vMFG-DHFR-IRES/CD transduced 3T3 cells.....	70
Tableau 8.1	Cytidine deaminase enzyme activities of mock and MSCV-CD-IGFP gene modified bone marrow cells.....	96
Tableau 8.2	Relative cytidine deaminase enzyme activities of mock and MSCV-CD-IGFP gene modified bone marrow cells.....	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure chimique des analogues de la désoxycytidine.....	9
Figure 1.2	Métabolisme de la cytidine, de la désoxycytidine et de ses analogues.....	10
Figure 2.1	Exemple d'un protocole de chimioprotection clinique hypothétique chez un patient.....	18
Figure 2.2	Exemple de la toxicité hématopoïétique produite par la 5-AZA-CdR et d'une chimioprotection potentielle contre cet analogue après transfert du gène de résistance aux analogues de la désoxycytidine.....	19
Figure 3.1	Schéma représentant le transfert d'un vecteur rétroviral dans une lignée d'encapsulation pour la production de virus recombinants en mesure d'infecter une cellule cible.....	35
Figure 5.1	Représentation du résultat de la désamination hydrolytique de la 5-AZA-CdR et de la dFdC en leurs métabolites par l'action de la CD.....	56
Figure 7.1	Retroviral MFG-DHFR-IRES/CD vector structure.....	71
Figure 7.2	Clonogenic survival in ARA-C and MTX concentration of transduced murine fibroblasts clones.....	72
Figure 7.3	Clonogenic survival in ARA-C and MTX concentration of transduced mixed population of murine fibroblasts.....	73
Figure 7.4	Southern blot hybridization of 5 µg genomic DNA from each indicated cell line.....	74
Figure 7.5	CFU-C survival of CD transduced murine bone marrow cells at different concentrations of ARA-C or MTX.....	75
Figure 8.1	CFU-C survival of transduced murine BMC at different concentrations of dFdC or 5-AZA-CdR.....	98
Figure 8.2	Flow cytometry of transduced leukemic L1210 cells selected or not with CdR analogs.....	99

Figure 8.3	Flow cytometry and growth survival of transduced murine BMC selected or not with CdR analogs.....	100
Figure 8.4	Survival assay of transduced murine BMC selected or not in 1 μ M ARA-C.....	101
Figure 8.5	CFU-C survival of preselected or not transduced murine BMC at different concentrations of ARA-C.....	102
Figure 9.1	Stem-loop structure of fragment of the murine dCK mRNA as predicted by the mfold program and cleavage sites of Rbz 1, 4 and 6.....	121
Figure 9.2	Structure of the pAP2-Rbz-IRES-GFP retroviral expression vector.....	122
Figure 9.3	Polyacrylamide electrophoresis of cleavage products from radioactive dCK RNA after incubation with different ribozymes..	123
Figure 9.4	Reduction in dCK activity in L1210 murine leukemic cells by specific ribozymes.....	124
Figure 9.5	Northern blot analysis of mRNA levels of dCK and G3PDH from control and L1210 murine leukemic cells transduced with different ribozymes.....	125

ABBREVIATIONS

AAV	virus adéno-associé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARA-C	cytosine arabinoside
ARA-CMP	cytosine arabinoside monophosphate
ARA-CTP	cytosine arabinoside triphosphate
AS	antisens
5-AZA-CdR	5-aza-2' désoxycytidine
5-AZA-CTP	5-aza-2' désoxycytidine triphosphate
BCNU	1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BG	O6-benzyguanine
CD	cytidine désaminase
CdR	désoxycytidine
CR	cytidine
CTP	cytidine triphosphate
dCDP	désoxycytidine diphosphate
dCK	désoxycytidine kinase
dCMP	désoxycytidine monophosphate
dCMPD	désoxycytidine monophosphate désaminase
dCTP	désoxycytidine triphosphate
désoxyRbz	désoxyribozyme
dFdC	2',2'-difluorodésoxycytidine
dFdCDP	2',2'-difluorodésoxycytidine diphosphate
dFdCMP	2',2'-difluorodésoxycytidine monophosphate
dFdCTP	2',2'-difluorodésoxycytidine triphosphate
DHFR	dihydrofolate réductase
DL50	dose létale pour 50% des contrôles
EMC	encéphalomyocardite
FACS	<i>fluorecence activated cell sorting</i>

GALV	<i>gibbon ape leukemia virus</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
HSV-TK	<i>herpes simplex virus-thymidine kinase</i>
IL	interleukine
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	kilo base
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MESV	<i>murine embryonic stem cell</i>
Mg	magnésium
MGMT	méthylguanine-ADN méthyltransférase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Mo-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
MSV	<i>myeloproliferative sarcoma virus</i>
MTX	méthotrexate
OAS	oligonucléotide antisens
pb	paire de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P-gp	P-glycoprotéine
Rbz	ribozyme
Rnase H	ribonucléase H
RR	ribonucléotide réductase
SCF	<i>stem cell factor</i>
souris transplantée	souris dont le système hématopoïétique a été reconstruit avec des cellules modifiées pour l'expression d'un transgène
TK2	thymidine kinase 2
TMP	thymidine monophosphate
TMTX	trimetrexate
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine
VSVG	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotéine</i>

À mes parents,

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement le Dr Richard Momparler pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que guidé et encouragé dans les décisions et les moments les plus difficiles. Je désire également lui exprimer ma profonde reconnaissance pour sa précieuse disponibilité, son enthousiasme manifesté tout au long de la réalisation de cette thèse et pour m'avoir permis de voyager de par le monde me permettant ainsi de prendre conscience des nombreuses possibilités qu'il offre.

Madame Louise Momparler pour son aide indispensable, ses encouragements, pour avoir été une voisine de paillasse hors pair, pour sa présence qui apporte une ambiance chaleureuse et surtout pour ses nombreuses qualités humaines.

Isabelle, ma conjointe, pour son amour, son réconfort, son aide et ses nombreux encouragements.

Oanh Le pour son aide, ses nombreuses connaissances et surtout pour les bons moments passés ensemble.

Dr Nicoletta Elioupoulos pour avoir été mon mentor en plus d'une collègue et amie très appréciée.

Dr Veronica Bovenzi, Stéphane Pinsonneault, Anne-Julie Boivin, Dr Sylvie Côté, Sepideh Shaker, Jacynthe Gagnon, Mélanie Primeau et Francine Dionne pour leur aide, leur gentillesse et amitié.

Drs Denis Cournoyer et Sylvain Létourneau pour leur précieuse collaboration.

Mes parents et ma sœur Maryse pour leur support, leur aide et pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Au département de Pharmacologie et au centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine pour leur contribution à ma formation. Au téléthon des maladies infantiles, à l'université de Montréal et au FCAR pour leur support financier.

PREMIÈRE PARTIE
INTRODUCTION

Avant-propos

Au début des années 90, de nombreuses hypothèses ont été formulées quant à l'importance que pourrait prendre la thérapie génique. On prévoyait alors qu'un grand nombre de maladies, dont le cancer, seraient traitées par thérapie génique. Malheureusement, l'échec répété des premiers essais cliniques a considérablement modéré l'espoir de voir un jour cette science rencontrer les attentes très élevées alors établies.

La principale cause de l'échec des premiers essais cliniques est l'inefficacité des systèmes de transfert du matériel génétique. Les vecteurs utilisés, pour la plupart des virus (rétrovirus et adénovirus), sont soit trop immunogéniques, soit incapables de transférer à des niveaux suffisamment élevés le transgène afin d'y observer un effet thérapeutique. Encore aujourd'hui, malgré les efforts considérables de la communauté scientifique pour améliorer ces lacunes, elles demeurent les principales limitations du succès de la thérapie génique.

Notre laboratoire a cloné en 1994 le gène de la cytidine désaminase. Il s'agit d'un gène associé avec la résistance aux analogues de la désoxycytidine, une classe de médicaments utilisés pour le traitement de plusieurs types de cancer. On voyait donc l'opportunité d'améliorer certains concepts de thérapie génique en utilisant ce gène de résistance. Notre hypothèse est qu'il est possible de compenser la faible efficacité de transfert des vecteurs viraux en leur insérant un gène de résistance et en sélectionnant par la suite les cellules infectées l'ayant reçu.

Cette approche pourrait avoir des conséquences dans le traitement de maladies génétiques mais aussi dans le traitement du cancer. En effet, la protection des cellules saines par un ou des gènes de résistance contre la toxicité des agents de chimiothérapie permettrait d'utiliser de plus fortes doses de chimiothérapie et possiblement d'améliorer l'efficacité de celle-ci contre certaines formes de cancer.

Bref, des améliorations aux techniques de thérapie génique étant sans cesse apportées, j'entrevois avec beaucoup de positivisme le succès de cette science dans les années à venir. D'ailleurs, de récents essais cliniques concluent avec succès chez l'humain entretiennent l'espoir de voir cette science se développer.

CHAPITRE 1 : Les analogues de la désoxycytidine

La désoxycytidine (CdR) est un nucléoside naturel retrouvé dans la composition de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les analogues de la CdR se distinguent par des modifications structurelles apportées au groupement ribose ou directement à la base pyrimidique qui les composent (Figure 1.1). Ce chapitre fera la description de trois analogues de la CdR utilisés dans le traitement du cancer.

1.1 Cytosine arabinoside

La cytosine arabinoside (ARA-C) est une drogue dont l'efficacité fut d'abord évaluée, au milieu des années soixante, contre les infections virales. Peu après, Wodinsky et Kensler, (1965) ainsi que Dixon et Adamson, (1965) ont fait la démonstration de l'activité antitumorale de cette drogue. L'efficacité de l'ARA-C contre la leucémie aiguë a aussi été démontrée (Bernard et al., 1966). Encore aujourd'hui, l'ARA-C est l'une des drogues les plus utilisées pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë (Keating et al., 1982; Bishop et al., 1996). Son utilisation s'étend aussi au traitement de certains lymphomes, de même que pour la leucémie lymphoblastique aiguë (Ship et al., 1984; Stryckmans et al., 1987). Malheureusement, cet analogue s'est avéré peu efficace contre les tumeurs solides sans qu'on puisse vraiment identifier les raisons (Merriman et al., 1996).

L'action cytotoxique des antimétabolites utilisés dans le traitement du cancer est basée sur l'interférence de ces derniers avec les métabolites naturels menant ainsi à une perturbation des processus cellulaires. Après avoir été métabolisé sous sa forme triphosphate (ARA-CTP), l'analogue agira comme compétiteur direct de la CdR triphosphate (dCTP) pour l'ADN polymérase (Momparler, 1969). Son activité cytotoxique est directement liée à sa capacité d'inhiber la synthèse d'ADN. En effet, l'élongation d'un brin d'ADN ou d'ARN (dans le cas de l'amorce d'Okasaki) 3'-ARA-CMP est 1600 fois et 50 fois inférieure respectivement à celle d'un brin 3'-dCMP (Harrington and Perrino, 1995). Bien que l'ARA-CTP soit un inhibiteur des ADN polymérases alpha, delta et epsilon, la polymérase alpha serait principalement affectée et

responsable du ralentissement ou de l'arrêt de la synthèse de l'ADN produite par l'ARA-CTP (Han et al., 2000). La principale toxicité de l'ARA-C est observée au niveau du système hématopoïétique.

1.2 2',2'-Difluorodésoxycytidine

La 2',2'-difluorodésoxycytidine (dFdC) est un autre analogue de la CdR initialement développé comme agent antiviral au début des années 80 au Pays Bas. Sa fenêtre thérapeutique comme agent antiviral n'étant pas assez grande, il fut immédiatement évalué pour son potentiel antinéoplasique. Contrairement à l'ARA-C, la dFdC est principalement utilisée dans le traitement des tumeurs solides. Plusieurs essais cliniques de phase I/II incluant la dFdC, seule ou en combinaison avec d'autres antinéoplasiques, ont montré des résultats positifs pour le traitement du cancer du poumon (Pectasides et al., 1999; Ng et al., 1999), le cancer du sein (Possinger, 1995; Carmichel and Walling, 1997), le cancer du pancréas (Matano et al., 2000) et le cancer des ovaires (Kaufmann et Von Minckwitz, 1997).

Structurellement, la dFdC est différente de la CdR par l'ajout en position 2' du ribose de deux groupements fluorés (Figure 1.1). Ces modifications mineures permettent à la dFdC de demeurer un substrat de l'ADN polymérase. Tout comme l'ARA-C, la forme métabolisée triphosphate (dFdCTP) est incorporée dans l'ADN et l'ARN où elle exerce son action cytotoxique par l'inhibition de la synthèse de ceux-ci (Heinemann et al., 1988; Huang et al., 1991; Ruiz van Haperen et al., 1993). L'inhibition de la croissance cellulaire (ou cytotoxicité) est généralement directement proportionnelle au niveau de dFdCTP intracellulaire (Bergman et al., 1999).

L'efficacité de la dFdC, comparativement à l'ARA-C, pour le traitement des tumeurs solides pourrait être expliquée par plusieurs observations. Tout d'abord, certains métabolites du dFdC peuvent exercer une influence positive sur la formation et l'incorporation de dFdCTP dans l'ADN. Par exemple, le dFdCDP, est en mesure d'inhiber la ribonucléotide réductase (RR) (Figure 1.2), diminuant la formation et la concentration intracellulaire de dCDP et de dCTP. Ceci a pour effet de réduire la compétition entre le dCTP et le dFdCTP pour l'incorporation dans l'ADN (Heinemann et al., 1990). De façon similaire, la dFdCTP peut aussi inhiber la formation de la dCTP en

inhibant la CTP synthase et également diminuer la compétition pour l'incorporation du dFdCTP dans l'ADN (Heinemann et al., 1995). Finalement, l'incorporation du dFdCTP dans l'ADN permet qu'un nucléotide supplémentaire soit ajouté par la polymérase avant que l'inhibition de l'élongation soit faite. Cette particularité rend la dFdC monophosphate (dFdCMP) vulnérable à être retirée par l'activité 3'-5' exonucléase de la polymérase (Huang et al., 1991). Pour l'ARA-C, aucun nucléotide est ajouté après son incorporation facilitant ainsi son excision de l'ADN. Toutes ces raisons favorisent peut-être la dFdC par opposition à l'ARA-C pour le traitement des tumeurs solides. Le principal effet secondaire observé pour la dFdC est aussi une sévère toxicité hématopoïétique.

1.3 5-aza-2'-désoxycytidine

La 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR) est un analogue de la CdR qui fut synthétisé chimiquement dans les laboratoires des chimistes Sorm et Pliml en République Tchèque en 1964 (Sorm et al., 1964). La 5-AZA-CdR diffère de la CdR par une modification unique apportée directement à l'anneau pyrimidique plutôt qu'au groupement ribosilé. Le carbone en position 5' de la cytosine a été substitué par un atome d'azote chez la 5-AZA-CdR (Figure 1.1). Les capacités antinéoplasiques de cet analogue ont été démontrées chez des souris leucémiques (Sorm et Vesely, 1968). Depuis, des essais cliniques ont démontré son efficacité pour lutter contre la leucémie et le cancer du poumon (Momparler et al., 1985; Momparler et al., 1997).

La 5-AZA-CdR doit elle aussi être métabolisée sous sa forme triphosphate (5-AZA-CTP) pour être active. Néanmoins, le mécanisme d'action de cette drogue est nettement différent de celui de l'ARA-C et de la dFdC, où une inhibition de la synthèse de l'ADN est reconnue comme principal effet cytotoxique. L'incorporation aléatoire de la 5-AZA-CTP dans l'ADN produit une hypométhylation générale, puisque la 5-AZA-CdR ne peut pas recevoir un groupement méthyle en position 5' (Jones et Taylor, 1980; Bouchard et Momparler, 1983). L'ADN méthyltransférase, l'enzyme responsable du transfert du groupement méthyle en position 5' de la cytosine, est inhibée par suite d'une liaison covalente à la 5-AZA-CdR (Santi et al., 1983; Jüttermann et al., 1994). L'incorporation de la 5-AZA-CdR conduirait à la réactivation de l'expression de certains gènes ainsi qu'à la différenciation cellulaire (Chandler et Jones, 1988). Ces deux

évènements, ajoutés à la diminution de la capacité de méthyler adéquatement l'ADN nouvellement synthétisé lors de la réplication cellulaire (la méthylase étant liée de façon covalente), entraîneraient une mort cellulaire. La toxicité majeure rencontrée avec l'administration de 5-AZA-CdR est une fois de plus une toxicité hématopoïétique.

Le contrôle épigénétique de l'expression des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur est maintenant considéré comme jouant un rôle déterminant dans le développement du cancer (Jones et Laird, 1999). La modulation du contrôle épigénétique par l'utilisation de drogues telles la 5-AZA-CdR et les inhibiteurs de l'acétylation des histones est une avenue thérapeutique très intéressante pour le traitement de certains types de cancers (Marks et al., 2000; Momparler et Bovenzi, 2000). D'ailleurs, l'utilisation de ces deux drogues seules ou en combinaison sur différentes lignées transformées in vitro a montré une capacité à réactiver l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes E-cadherin, p16, récepteur de l'acide rétinoïque bêta et plusieurs autres, tous impliqués étroitement avec le développement du cancer (Graff et al., 1995; Coté et Momparler, 1997; Gonzalzo et al., 1996). Ces récents résultats ont rehaussé l'intérêt porté à la 5-AZA-CdR.

1.4 Le métabolisme et les mécanismes de résistance aux analogues de la désoxycytidine

Le métabolisme des analogues de la CdR est une notion très importante puisque ces analogues sont initialement inactifs ou considérés comme pro-drogue. L'influx intracellulaire de ces analogues se fait par des transporteurs protéiques plutôt que par voie passive (Plagemann et al., 1978). Toutefois, ces transporteurs de nucléosides peuvent avoir une spécificité différente selon le type d'analogue. Sept transporteurs distincts ont été identifiés à ce jour (Mackey et al., 1998). Selon la proportion avec laquelle ces transporteurs sont distribués à la surface membranaire, la perméabilité aux analogues pourrait varier d'un type cellulaire à un autre. Par exemple, chez la lignée cellulaire d'ovaires de hamster chinois, la perméabilité membranaire est de 65% plus élevée pour la dFdC que pour l'ARA-C (Heinemann et al., 1988).

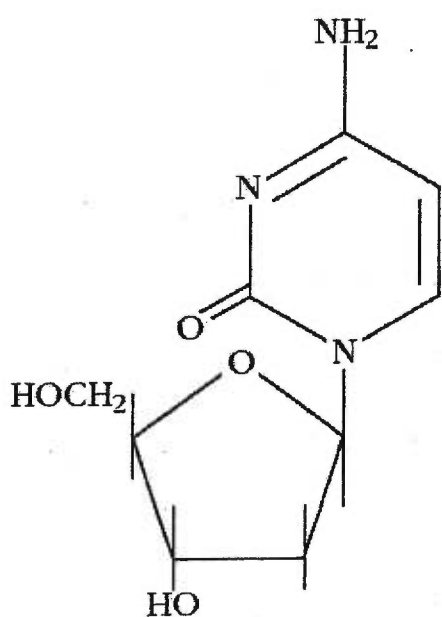
Tel que mentionné, ces analogues doivent tous être phosphorylés sous leur forme triphosphate pour être incorporés dans l'ADN et exercer leur action cytotoxique. Cette

série de trois phosphorylations est faite initialement et très majoritairement par la désoxycytidine kinase (dCK), l'enzyme limitant (Figure 1.2) (Heinemann et al., 1988). La dCK est en mesure de phosphoryler efficacement la 5-AZA-CdR, la dFdC et l'ARA-C (Mompalmer et Fisher, 1968; Bouffard et al., 1993; Mompalmer et al., 1984). Récemment, une autre kinase nucléosidique, la thymidine kinase 2 (TK2), s'est montrée capable de phosphoryler de façon significative la dFdC (Wang et al., 1999). La localisation de la TK2 à la membrane mitochondriale a montré l'incorporation du dFdCTP à l'ADN mitochondriale. Ainsi, elle pourrait être d'une très grande importance dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose produite par cet analogue (Zhu et al., 2000). La dCK est une enzyme cytosolique et/ou nucléaire et favorise l'incorporation de dFdCTP à l'ADN génomique (Zhu et al., 2000). Toutefois, l'importance du site de phosphorylation est encore controversée et ne sera pas discutée davantage dans cette thèse. La voie métabolique, décrite ci-dessus, des analogues de la CdR est la voie alternative de synthèse du dCMP et du dCDP. En comparaison, la voie naturelle, dite de novo, utilise plutôt la cytidine et la ribonucléotide réductase (Figure 1.2). Par conséquent, la modulation de l'expression de la dCK ne devrait pas affecter la disponibilité des nucléotides pour une réplication cellulaire normale. À cet effet, des cellules dépourvues de toute activité pour la dCK ont un rythme de réplication similaire aux cellules contrôles ayant une activité standard pour la dCK (Ruiz van Haperen et al., 1994).

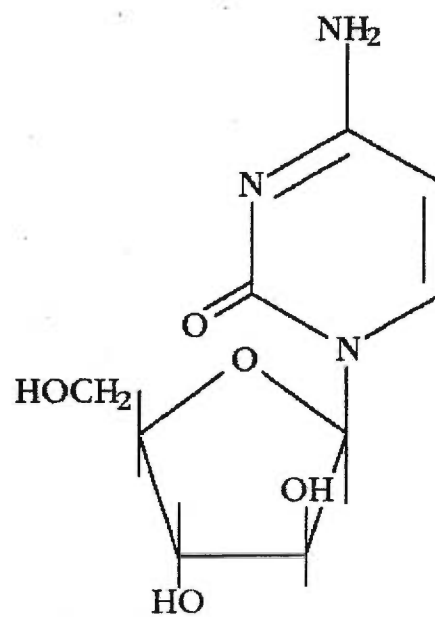
Les analogues de la CdR, sous leur forme non phosphorylée uniquement, sont aussi des substrats de l'enzyme cytidine désaminase (CD), laquelle désamine en composés uridines non cytotoxiques les différents analogues (Figure 1.2) (Bouffard et al., 1993; Chabot et al., 1983). Une autre enzyme, la désoxycytidine monophosphate désaminase (dCMPD), peut aussi inactiver les analogues alors qu'ils sont sous la forme monophosphate (Figure 1.2). Cette enzyme est toutefois moins apte que la CD à inactiver les analogues pour une raison de cinétique. En effet, le substrat de la dCMPD (la dCMP ou les analogues monophosphates) subit une rapide transition à la forme dCDP par la dCMP kinase comparativement au substrat de la CD (la CdR ou les analogues) qui subit une transition plus lente à la forme dCMP par la dCK (qui est l'enzyme limitant). En bref, un analogue de la CdR, suite à son passage trans-membranaire, sera en compétition pour

deux enzymes, soit la dCK ou la CD. L'affinité de l'analogue pour ces deux enzymes de même que le ratio dCK/CD influenceront directement la cytotoxicité de l'analogue.

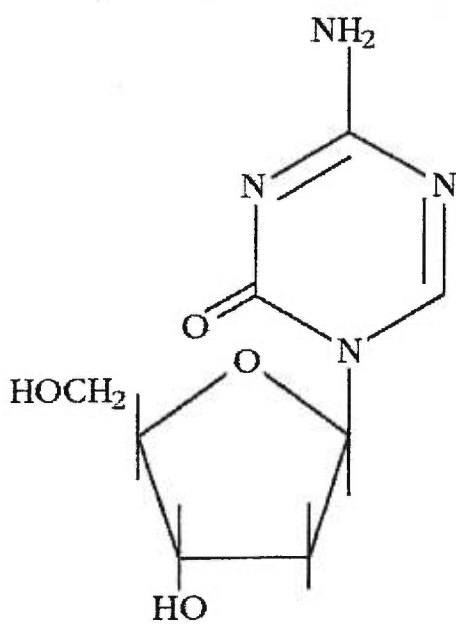
Plusieurs changements moléculaires différents peuvent engendrer des mécanismes de résistance aux analogues de la CdR. Les plus importants sont; (i) une diminution de l'activité de la dCK (Ruiz van Haperen et al., 1994); (ii) une augmentation de l'activité de la CD (Momparler et al., 1996); (iii) une diminution du nombre de transporteurs nucléosidiques (Mackey et al., 1998); (iv) une augmentation du niveau intracellulaire de dCTP (par une augmentation de l'expression de la RR) qui réduit la compétition pour l'incorporation dans l'ADN (Goan et al., 1999). Ce dernier mécanisme est très important en particulier avec la dFdC, car son métabolite, le dFdCDP, est un inhibiteur direct de la RR, réduisant ainsi la formation de novo du dCDP et par conséquent du dCTP.



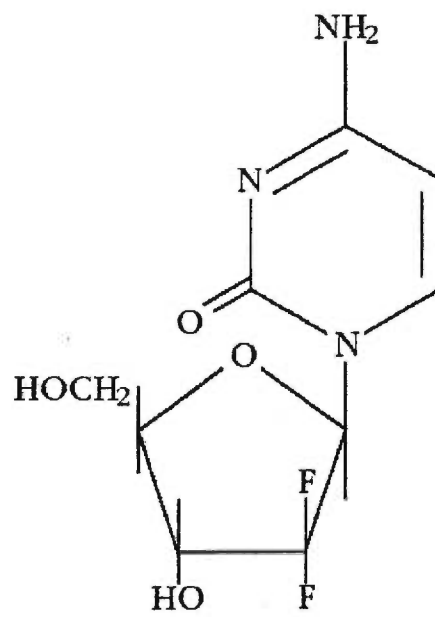
Déoxycytidine



ARA-C



5-AZA-CdR



dFdC

Figure 1.1 Structure chimique des analogues de la déoxycytidine.

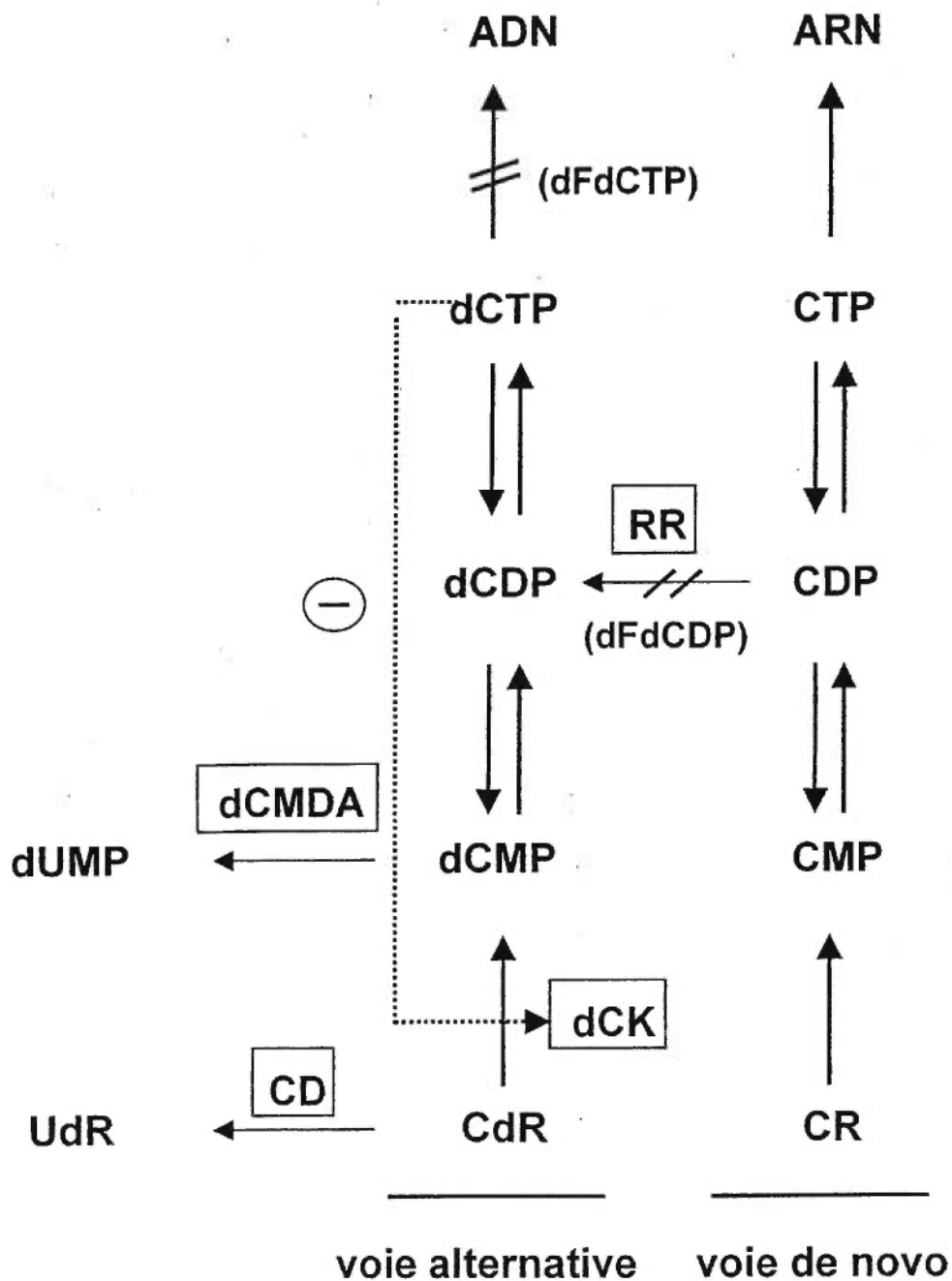


Figure 1.2 Voie métabolique de la synthèse cellulaire de la cytidine triphosphate (CTP) et de la désoxycytidine triphosphate (dCTP). Notez que les voies de synthèse de l'ARA-CTP, du dFdCTP et de la 5-AZA-CTP sont les mêmes que celle du dCTP. dCK; désoxycytidine kinase, CD; cytidine désaminase, dCMDA; désoxycytidine monophosphate désaminase, RR; ribonucléotide réductase.

CHAPITRE 2 : Le potentiel de la thérapie génique dans le traitement du cancer et des maladies génétiques

2.1 Le cancer

La chimiothérapie, et le dépistage préventif sont les principaux outils présentement disponibles pour le traitement des différentes formes métastatiques du cancer. Le développement des techniques de transfert géniques permet maintenant d'envisager le traitement de certaines maladies, dont le cancer, par des approches moléculaires. Plusieurs évidences chez l'homme indiquent que le cancer est une maladie très complexe qui émerge généralement suite à une accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. Ces altérations favorisent successivement le passage de la cellule d'un état dit transformé (capable de réplication illimitée) à un état métastatique (Hanahan et Weinberg, 2000). Il est très difficile, voire utopique, de tenter de corriger par la thérapie génique la multitude de mutations présentes chez la totalité des cellules cancéreuses (souvent plus de 10^{10}) d'un patient. De plus, bon nombre de ces altérations génétiques demeurent inconnues à cause de la très grande diversité des formes de cancer.

Concrètement, pour se développer, un cancer doit acquérir certaines caractéristiques spécifiques. Parmi celles-ci, on retrouve:

- (i) Une autosuffisance au signal de croissance. Par exemple, une cellule cancéreuse pourra sécréter elle-même les facteurs de croissance nécessaires à sa réplication par une stimulation autocrine (Fedi et al., 1997).
- (ii) Une insensibilité aux signaux antiprolifératifs (provenant des gènes de suppression de tumeur). Une altération dans la fonctionnalité de la protéine rétinoblastome et une inactivation des gènes codant pour les kinases cycle-dépendantes, telles p15 et p21, sont d'excellents exemples (Weinberg, 1995; Datto et al., 1997).
- (iii) Une capacité à éviter l'apoptose ou la mort cellulaire programmée. Des protéines comme p53, bcl-2, bax et la famille des caspases sont toutes très influentes sur la régulation de l'induction de l'apoptose (Bennett, 1999; Favrot et al., 1998).

- (iv) Un potentiel de réplication illimitée. L'activité de la télomérase, une enzyme responsable du maintien de l'intégrité des extrémités des chromosomes, est retrouvée dans 90% des cancers. Cette caractéristique est très importante, puisqu'elle permet à la cellule de se répliquer suffisamment afin d'accumuler les mutations nécessaires au développement du cancer (Shay et Bacchetti 1997, Wright et Shay 2000).
- (v) Une angiogénèse efficace afin de permettre une vascularisation de la masse tumorale. Cette caractéristique est essentielle puisqu'aucun tissu, cancéreux ou non, peut croître s'il est situé à plus de 100 μm d'un vaisseau sanguin (Hanahan et Folkman, 1996; Hsu et al., 1996).
- (vi) Une activité métastatique, c'est-à-dire la capacité à former des tumeurs secondaires ou métastases à un site distinct de la tumeur primaire, est responsable de 90% des cas de décès par cancer (Sporn, 1997). Une modification de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire joue un rôle déterminant dans l'acquisition du potentiel métastatique (Christofori et Semb, 1999).

Lorsqu'un cancer est détecté, très souvent, il possède déjà les caractéristiques décrites ci-dessus. Pour les acquérir, une cellule devra avoir subi préalablement plusieurs mutations. Bien que ne pouvant pas être considéré comme une caractéristique en soi, l'instabilité génétique (pouvoir mutationnel) d'une cellule dicte la probabilité de celle-ci de devenir cancéreuse. Le système de réparation de l'ADN et plus particulièrement le système de détection de l'ADN endommagé (p53 et son système de signalisation) sont souvent, voire toujours défectueux chez tous les cancers (Levine, 1997). En bref, l'activité mutationnelle d'une cellule, sous contrôle génétique héréditaire ou d'agents mutagènes, est directement reliée à la capacité d'une cellule à acquérir une ou l'ensemble des caractéristiques essentielles au développement du cancer.

2.2 Différentes approches thérapeutiques dans la thérapie génique du cancer.

Les différentes approches thérapeutiques dans la thérapie génique du cancer peuvent être divisées en quatre grandes catégories.

(1) **Une approche de sensibilisation aux drogues.** Une des premières approches dans le traitement du cancer par la thérapie génique fut très certainement l'utilisation de gènes appelés gènes suicides. Ces gènes ont la propriété de transformer une drogue non-toxique (pro-droque) en un métabolite toxique. Par conséquent, l'approche consiste à insérer spécifiquement dans les cellules cancéreuses ces gènes suicides.

Le plus étudié de ces gènes jusqu'à maintenant est le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex (*herpes simplex virus thymidine kinase*, HSV-TK). Les cellules qui expriment cette kinase virale vont phosphoryler spécifiquement le gancyclovir, un antimétabolite non-métabolisé par la thymidine kinase humaine. Ensuite, le gancyclovir métabolisé sera incorporé dans l'ADN où il exercera son action cytotoxique (Culver et al., 1992; Galipeau et al., 1999). Malheureusement, les études cliniques de phase I/II disponibles (principalement pour le traitement du cancer du cerveau) montrent un très faible taux de guérison suite au transfert du gène HSV-TK aux cellules tumorales. Plusieurs patients ont montré une régression de leur tumeur, mais seulement quelques cas isolés de rémission (2 ans et plus) ont été observés (Trask et al., 2000; Shand et al., 1999). La difficulté de transférer efficacement le gène suicide à l'ensemble des cellules cancéreuses est possiblement une des raisons de l'échec des résultats cliniques. Ces résultats mitigés sont surprenants puisque le gène de l'HSV-TK est en mesure d'une forte activité dite de *bystander*. Cet effet s'observe lorsque des cellules non transduites par le gène suicide, voisines de cellules transduites, sont éliminées par le gancyclovir. En effet, il semble que ce dernier soit en mesure de diffuser par des jonctions cellulaires de type gap d'une cellule à une autre. On croyait en vain que cette activité pouvait combler l'impossibilité de modifier la totalité des cellules cancéreuses. Cette approche demeure néanmoins très attrayante pour certains types de cancers non métastatiques.

(2) **L'inactivation d'oncogènes ou le remplacement du gènes de suppression de tumeurs.** Les proto-oncogènes (homologues normaux des oncogènes) sont une classe de gènes souvent impliqués dans la régulation de la transcription ou de la transduction de signal. Des mutations, des amplifications et des translocations chromosomiques chez des proto-oncogènes sont tous des exemples pouvant mener à l'apparition d'oncogènes et à la formation du cancer.

Le gène ras est le plus commun des oncogènes et est retrouvé dans 30% de tous les types de cancers. Son activation peut atteindre 90% dans le cas du cancer du pancréas et 50% pour le cancer du colon (Bos, 1989). Par conséquent, les efforts pour l'inactivation d'oncogènes par la thérapie génique ont été concentrés sur le gène ras. L'utilisation de molécules antisenses a été la première stratégie utilisée pour inactiver l'expression d'un oncogène (voir Chapitre 4). Cette stratégie s'est montrée efficace pour réduire l'expression du gène K-ras ainsi que la croissance de cellules de cancer du poumon in vitro et in vivo (Muckhopadhyay et al., 1991; Zhang et al., 1993). L'expression de ribozymes (molécules à action similaire aux antisenses dont le mécanisme d'action sera détaillé au chapitre 4) dirigés contre le gène ras ou l'expression de mutants dominants négatifs de ras sont aussi des approches originales ayant montrées un certain succès contre le développement du cancer (Irie et al., 1999; Takeuchi et al., 2000).

Inversement, on peut vouloir restaurer un gène dont l'expression est associée à la régression des tumeurs. Ces gènes sont appelés gènes de suppression de tumeurs. Leur inactivation se fait habituellement par mutation, par perte d'hétérozygotie ou tel que démontré récemment par régulation épigénétique (Momparler et Bovenzi, 2000; Jones et Laird, 1999). Le gène de suppression de tumeur le plus souvent inactivé de toutes les tumeurs chez l'homme est le gène p53. La restauration d'un gène p53 fonctionnel peut induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses. Également, sa présence peut favoriser l'action de plusieurs drogues utilisées en chimiothérapie reconnues pour induire la mort cellulaire par apoptose. Des études cliniques de phase I ont montré que le transfert du gène p53 est sécuritaire et peut induire la régression tumorale chez des patients atteints du cancer du poumon ou du cancer du cou et du cerveau (Roth et al., 1999).

En conclusion, bien que cette approche puisse être la clé du succès dans le traitement du cancer, des résultats cliniques satisfaisants tardent à être démontrés. La difficulté, sinon l'impossibilité, de modifier chacune des cellules cancéreuses en est possiblement la raison.

(3) **Une approche immunologique.** Le transfert de gènes codant pour diverses cytokines permettrait l'activation des lymphocytes T cytotoxiques ou de macrophages, afin de faciliter l'élimination des cellules cancéreuses de façon naturelle. Par exemple, deux des cytokines les plus utilisées dans ce type de thérapie sont l'interleukine 2 (IL-2)

et le facteur de nécrose tumorale. L'administration systémique de ces cytokines peut parfois être toxique et les coûts rattachés à leur production et utilisation sont énormes (Nakagawa et al., 1996). Le transfert de l'ADN complémentaire (ADNc), codant pour l'une ou l'autre de ces cytokines, directement aux cellules tumorales, permettrait possiblement une réponse immunitaire (par les cellules T cytotoxiques) localisée directement contre la tumeur. Alternativement, on peut aussi utiliser un véhicule cellulaire pour délivrer ces cytokines. Par exemple, des fibroblastes modifiés pour l'expression de l'IL-2 et injectés au site de la tumeur sont en mesure de prolonger la survie, et même de guérir complètement des souris avec un gliome intracérébral (Glick et al., 1999). De façon similaire, la modification de cellules tumorales pour l'expression du facteur de nécrose tumorale est aussi en mesure de réduire la croissance de ces cellules chez la souris (Xiang et al., 2000). Néanmoins, une meilleure connaissance du système immunitaire en général, et plus particulièrement du rôle des différentes cytokines dans le cancer, mènera certainement à l'amélioration de cette approche thérapeutique.

(4) **Le transfert de gènes de résistance aux drogues.** Cette approche très intéressante est celle qui supporte l'hypothèse de travail de cette thèse et sera élaborée davantage dans la section qui suit.

2.3 Principe de chimioprotection

L'augmentation de l'expression de gènes de résistances aux agents antinéoplasiques chez les cellules cancéreuses est perçue comme un très mauvais pronostic et est généralement associée avec l'échec des traitements de chimiothérapie pour plusieurs types de cancers (Pirker et al., 1992; Salmon et al., 1989; Chan et al., 1990). Dans l'espoir de contourner ces phénomènes de résistance, les cliniciens augmentent les doses et optent pour une combinaison d'agents ayant des mécanismes d'action différents.

Pour la majorité des agents de chimiothérapie, la toxicité hématopoïétique est la principale limite quant à la dose maximale tolérée chez un patient. Lorsque cette toxicité devient trop importante, il est nécessaire de réduire les doses, de diminuer la fréquence des traitements et parfois même de les arrêter complètement (Rafferty et al., 1996). Par conséquent, les chances d'éradiquer un cancer sont sérieusement compromises.

L'obtention de l'ADNc de gènes de résistance aux agents de chimiothérapie permet de les utiliser dans un contexte de chimioprotection. Cette stratégie consiste à insérer un gène de résistance aux cellules normales, vulnérables aux toxicités secondaires des agents de chimiothérapie, afin de les protéger contre la chimiothérapie (Bertino, 1990) (Figure 2.1). Cette approche pourrait permettre une intensification sécuritaire des doses d'agents de chimiothérapie avec comme conséquence potentielle un meilleur effet thérapeutique.

Les cellules les plus vulnérables aux agents de chimiothérapie sont les cellules hématopoïétiques (Bodensteiner et Doolittle, 1993). Parmi celles-ci, les plus affectées sont celles ayant le taux de réplication le plus élevé. Par conséquent, les granulocytes et les plaquettes sont davantage affectés que les lymphocytes puisque la durée de vie de ces trois types cellulaires est respectivement de quelques heures, de quelques jours et de quelques mois voir même plusieurs années. Une réduction importante de la quantité de granulocytes dans le sang (< 500 par μl de sang) est associée directement à des risques d'infections sévères. Par exemple, les risques de développer une fièvre avec un nombre de neutrophiles inférieur à ce niveau est de 10% par jour (Johnston et Crawford, 1998).

Deux options s'offrent afin de palier à cette situation. On peut donner des antibiotiques aux patients et tenter de stimuler la synthèse des granulocytes par l'injection de facteurs de croissance hématopoïétiques ou procéder à une transplantation de moelle osseuse. Le facteur de croissance G-CSF (pour *granulocyte-colony stimulating factor*) est efficace pour réduire la période de granulocytopenie de façon significative (Grigg et al., 1993; Johnston et Crawford 1998; Bergh et al., 2000). De façon similaire, la transplantation de moelle osseuse est efficace pour raccourcir la période d'infection à risques élevés suite à une chimiothérapie à forte dose (Laport et al. 1998; Ghalie et al., 1994).

Cependant, la protection offerte par une transplantation de moelle osseuse ou des doses de G-CSF n'est certainement pas aussi efficace que pourrait l'être une approche de chimioprotection suite au transfert d'un gène de résistance aux cellules souches hématopoïétiques saines. Dans un modèle idéal, mais possible avec le raffinement des techniques de transfert génique, on devrait non seulement pouvoir augmenter les doses de chimiothérapie de façon plus substantielle, mais aussi en augmenter la fréquence

d'administration. De plus, la modification permanente des cellules hématopoïétiques par un gène de résistance permettrait une protection à long terme efficace contre plusieurs cycles de traitements. Cette particularité est très importante, puisqu'il est souvent nécessaire d'échelonner les traitements de chimiothérapie sur plusieurs semaines afin de complètement éradiquer un cancer. En comparaison, une transplantation de moelle osseuse à chaque cycle de chimiothérapie serait nécessaire, ce qui est malheureusement techniquement et éthiquement impossible.

La faible augmentation des doses de chimiothérapie permise par les techniques présentement disponibles montre un succès inégal quant à son efficacité thérapeutique. En effet, certaines études pour le traitement de lymphomes ou de la leucémie lymphoïde aiguë par exemple, montrent un plus grand effet thérapeutique suite à une chimiothérapie à hautes doses (Evans et al., 1998; Mounier et la., 2000). Par contre, d'autres études faites aussi sur la leucémie lymphoïde aiguë et le cancer du sein se sont avérées négatives (Michel et al., 2000; Hortobagyi et la., 2000). Les hypothèses les plus plausibles pour expliquer la disparité des résultats obtenus sont la nature et l'avancement des cancers traités, la classe d'agents de chimiothérapie utilisés et la différente intensité d'augmentation des doses d'un essai clinique à un autre.

Les analogues de la désoxycytidine sont des antimétabolites qui après leur activation métabolique s'insèrent dans l'ADN en répllication et qui par conséquent sont toxiques uniquement aux cellules en division. Par exemple, la 5-AZA-CdR produit une réduction sévère du compte des granulocytes-neutrophiles avec risque d'infection en moyenne 14 jours après l'injection, pour une période de 10-12 jours (Figure 2.2) (Mompalmer et al., 1997). L'utilisation d'un gène de résistance spécifique aux analogues de la désoxycytidine devrait permettre de conserver un nombre plus élevé de granulocytes-neutrophiles suite à une chimiothérapie avec ces analogues (Figure 2.2). Des toxicités autres qu'au système hématopoïétique, tel le système gastro-intestinal, ne devrait pas limiter le potentiel de chimio-protection puisque la fenêtre thérapeutique des analogues de la désoxycytidine face à ce type de toxicité est assez grande.

2.3.1 Risques associés à la chimioprotection

L'application d'un protocole de chimioprotection représente plusieurs avantages, mais il importe toutefois de demeurer prudent et conscient des risques possibles associés à son exécution. L'insertion d'un gène de résistance, désiré uniquement chez les cellules hématopoïétiques saines, pourrait être néfaste dans l'éventualité où ce dernier serait inséré dans une cellule cancéreuse. En effet, il a déjà été démontré que des cellules cancéreuses, provenant d'une leucémie ou d'un neuroblastome, peuvent contaminer les cellules de la moelle prélevées d'un patient. Le danger réside dans la possibilité d'infecter et de conférer une chimiorésistance aux cellules cancéreuses. De plus, ces dernières sont davantage susceptibles que les cellules souches de la moelle à une infection par des vecteurs rétroviraux de par leur rapide répliation (voir chapitre 3, section sur les rétrovirus). Ainsi, des cellules cancéreuses modifiées pour l'expression d'un gène de résistance pourraient non seulement induire une rechute du patient après la transplantation mais rendraient inefficace toute chimiothérapie à base de la classe de drogue pour laquelle le gène de résistance confère une protection.

Malheureusement, peu de procédés ont été rapportés permettant la purge des cellules cancéreuses de la moelle d'un patient; aucun ne garantit une purge complète. Les techniques les plus efficaces présentement disponibles sont (1) la purification (sélection positive ou négative) des cellules souches hématopoïétiques, par exemple par l'utilisation d'anticorps couplés à des billes magnétiques ciblant différents marqueurs spécifiques à ces cellules (Marini et al., 1999, Mohr et al., 2001), (2) l'élimination préférentielle des cellules cancéreuses avec un vecteur porteur d'un gène suicide ou par l'utilisation de champs magnétiques (Marini et al., 1999, Eppich et al., 2000), (3) l'utilisation d'un inhibiteur du gène de résistance lorsque ce dernier est disponible (Eliopoulos et al., 1998b). Finalement, dans l'éventualité où une contamination serait tout de même constatée, l'utilisation d'une classe de drogues insensible à l'expression du gène de résistance devra être envisagée.

Protocole expérimental de chimioprotection

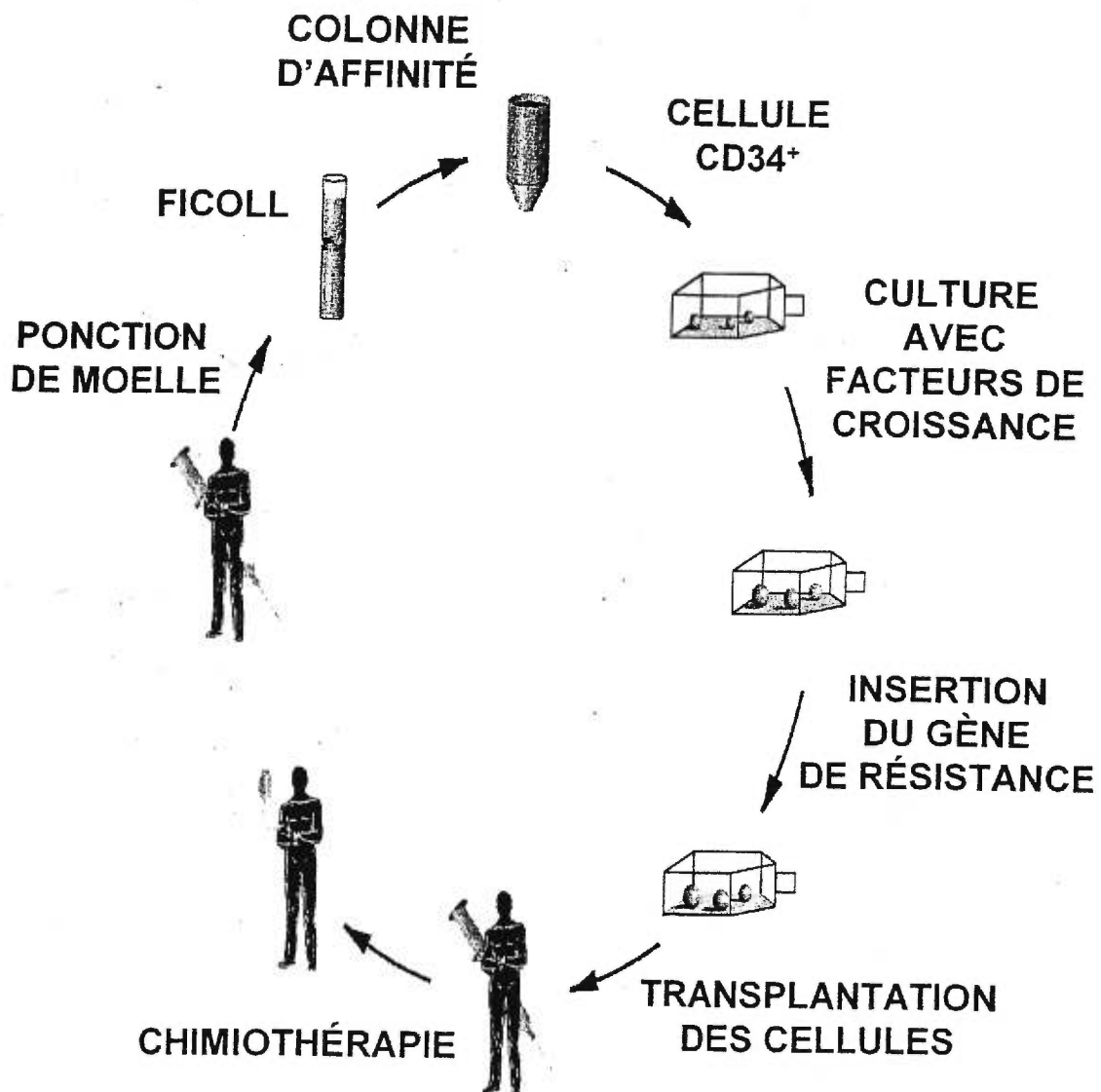


Figure 2.1 Illustration d'un protocole clinique hypothétique pour conférer une chimioprotection à un patient. Les cellules de la moelle osseuse du patient sont d'abord prélevées et isolées par centrifugation et diverses colonnes d'affinité. Les cellules CD34⁺ obtenues sont ensuite cultivées ex vivo avec des facteurs de croissance et un gène de résistance leur est inséré par un vecteur d'expression. Les cellules modifiées sont alors transplantées au patient et une intensification sécuritaire des doses de chimiothérapie peut avoir lieu.

Toxicité hématopoïétique de la 5-AZA-CdR et objectif théorique de chimioprotection

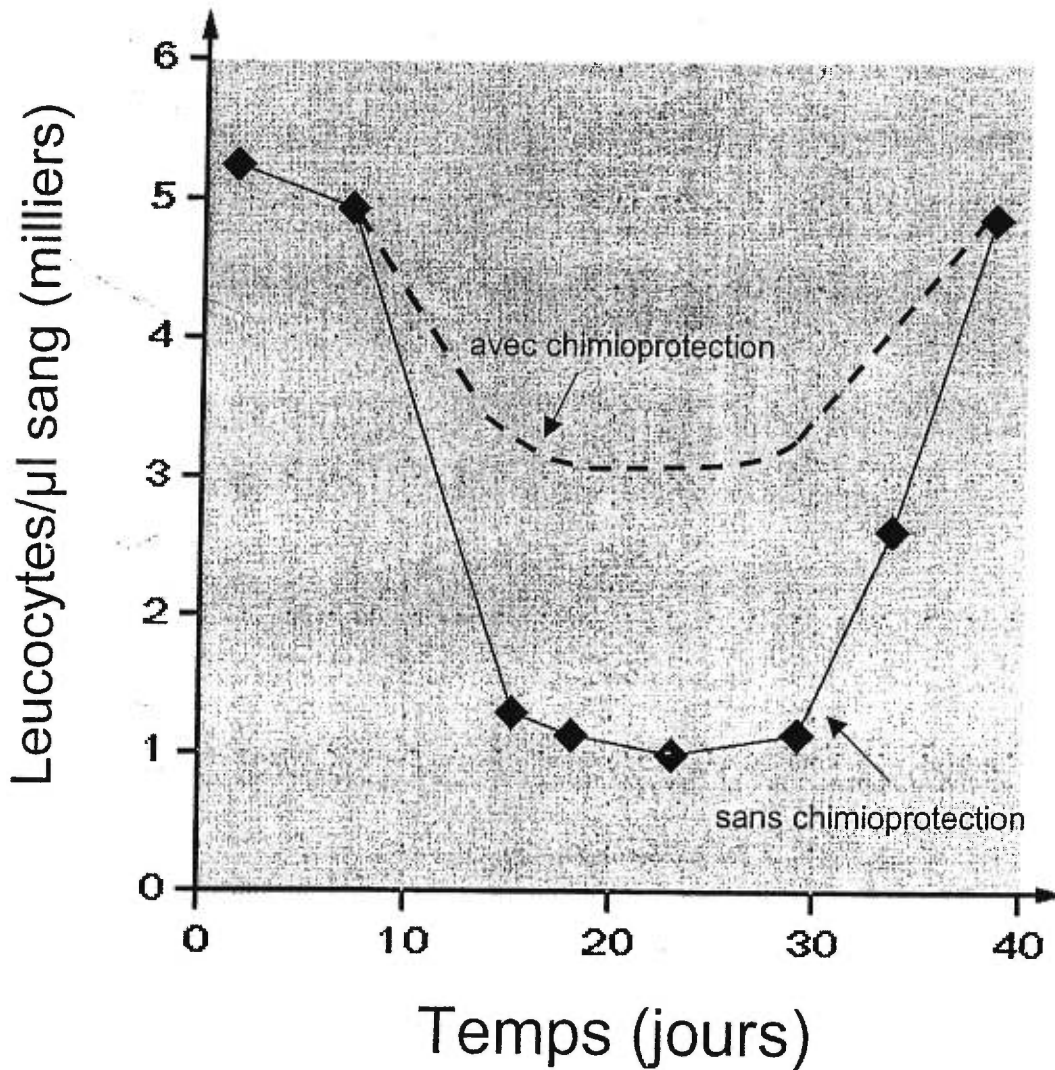


Figure 2.2 Exemple de toxicité hématopoïétique produite chez un patient atteint d'un cancer du poumon après une infusion de 8 heures de 5-AZA-CdR à une dose totale de 660 mg/m^2 (Momparker et al., 1997). Aussi, tracé hypothétique d'une chimioprotection contre la toxicité de la 5-AZA-CdR après transfert aux cellules souches hématopoïétiques du gène de résistance aux analogues de la désoxycytidine.

2.4 Principe de sélection et son implication pour le traitement des maladies génétiques.

Le potentiel de rendre des cellules résistantes à certaines drogues est utilisé depuis plusieurs années et est un concept d'une très grande importance dans de nombreuses applications de biologie moléculaire. Par exemple, les gènes de résistance ou marqueurs de sélection, aux antibiotiques comme la néomycine ou l'hygromycine, sont présentement très utilisés afin de sélectionner *in vitro* les cellules qui les expriment. Malheureusement, ces gènes de sélection ne peuvent pas être utilisés dans un modèle animal *in vivo* pour des raisons immunologiques (ces gènes étant d'origine bactérienne) et parce que leur drogue respective produit une toxicité systémique très élevée, inacceptable cliniquement. L'obtention assez récente de l'ADNc des gènes de résistance aux agents de chimiothérapie offre la possibilité de pouvoir sélectionner *in vivo* des cellules exprimant spécifiquement ces gènes de résistance.

Le principe de cette approche, comme celui de la chimioprotection, est de prélever des cellules de moelle osseuse d'un patient, d'y purifier les cellules souches hématopoïétiques, de les modifier avec un vecteur exprimant un gène de résistance seul ou en combinaison avec un gène thérapeutique et de les réinjecter au patient (voir Figure 2.1). Les techniques de transfert présentement disponibles (voir chapitre 3) ne permettent pas de modifier 100% des cellules souches hématopoïétiques, particulièrement chez l'humain pour qui l'efficacité de transfert est nettement moindre que chez la souris (Kume et al., 1999; Chu et al., 1998; Nienhuis et al., 1991). Il en résulte qu'après transplantation chez le patient, le pourcentage de cellules sanguines exprimant le ou les transgènes est généralement de moins de 5% (Malech et al., 1997; Dunbar et al., 1995; Brenner et al., 1993). Avec un approche de sélection, on pourrait graduellement augmenter de moins de 5% à théoriquement près de 100% le pourcentage de cellules modifiées *in vivo* suite à une série de cycles de chimiothérapie avec la drogue correspondante au gène de résistance choisi (Licht et al., 1997). Les cellules non modifiées seraient éliminées sous l'action cytotoxique de l'agent de chimiothérapie, alors que les cellules exprimant le gène de résistance ne le seraient pas. Les cellules souches modifiées pourraient alors reconstituer le système hématopoïétique du patient et graduellement former un ensemble de cellules (lymphocytes, monocytes, granulocytes,

plaquettes et globules rouges) exprimant le gène de résistance ou tout autre gène (thérapeutique) se trouvant aussi sur le vecteur d'expression.

Chez l'humain, le pourcentage de cellules exprimant le ou les transgènes après transplantation est particulièrement faible pour deux raisons principales.

- 1- Le pourcentage de cellules réinjectées constitue seulement un infime pourcentage du nombre total de cellules que contient le système hématopoïétique d'un patient. Chez les modèles animaux, il est possible d'irradier complètement l'hôte avant transplantation de façon à éliminer toutes les cellules non modifiées susceptibles de rivaliser avec les cellules modifiées pour la repopulation du système hématopoïétique de l'animal. Pour des raisons éthiques, il est impossible d'utiliser cette technique chez un patient.
- 2- Tel que mentionné, l'efficacité de transfert du transgène est plus faible aux cellules souches hématopoïétiques humaines que murines, favorisant la régénération du système hématopoïétique par des cellules non modifiées transplantées ou non (Kume et al., 1999; Chu et al., 1998; Nienhuis et al., 1991).

Le concept de sélection *in vivo* n'a pas encore été démontré chez l'homme. Par contre, chez la souris, de nombreux exemples existent (voir Chapitre 5). Les gènes de multirésistance aux drogues (MDR), de la dihydrofolate réductase (DHFR) et de la méthylguanine-méthyltransférase (MGMT) sont trois gènes de résistance qui confèrent un pouvoir de sélection *in vivo* aux cellules les exprimant (Sorrentino et al., 1992; Allay et al., 1998; Davis et al., 2000). Les résultats obtenus chez la souris sont encore récents. Par conséquent, des résultats chez l'homme devraient être disponibles sous peu. La pharmacocinétique des drogues correspondantes à ces gènes de résistance est très bien connue puisqu'elles sont couramment utilisées dans le traitement de différentes formes de cancers chez l'humain.

Le faible pourcentage de cellules modifiées après transfert génique chez l'humain compromet sérieusement le succès de la thérapie génique pour le traitement du cancer (trop peu de cellules seraient protégées contre la toxicité de la chimiothérapie) et des

maladies génétiques. En effet, il est facile de supposer qu'un nombre suffisant de cellules (plus de 5%) exprimant le transgène sera nécessaire pour corriger un désordre génétique. En attente de l'amélioration des techniques de transfert, le développement d'une technique efficace de sélection *in vivo* devient déterminant pour le succès de la thérapie génique.

Le traitement actuel de la maladie de Fanconi, une forme d'anémie, est une transplantation de moelle osseuse (Gluckman et al., 1995). Le remplacement du gène défectueux chez les cellules souches hématopoïétiques mène à une correction phénotypique de l'anémie chez la souris (Gush et al., 2000). Dans ce modèle, de façon très intéressante, pour des raisons biochimiques encore inconnues, les cellules modifiées possèdent un avantage de croissance sélectif par opposition aux cellules non modifiées (Battaile et al., 1999). Ce phénomène naturel de sélection *in vivo* est d'autant plus marqué si les cellules sont sélectionnées par un agent de sélection, la mitomycine C (pour des raisons encore inconnues les cellules modifiées par le gène de Fanconi sont plus résistantes à la mitomycine C). Cet exemple naturel est le reflet de ce que la sélection *in vivo* utilisant un gène de résistance aux agents de chimiothérapie pourrait être pour le traitement d'une maladie génétique comme l'hémophilie. En effet, très récemment, un essai clinique montrait des résultats positifs, mais modestes, quant au traitement de l'hémophile de type B suite au transfert du facteur IX, un facteur essentiel au phénomène de coagulation, chez trois patients (Kay et al., 2000).

2.5 Les cellules souches hématopoïétiques comme cellules de choix pour l'expression de gènes thérapeutique ou de résistance.

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules pluripotentes, c'est-à-dire en mesure de se différencier et de former les cellules myéloïdes et lymphoïdes du système hématopoïétique (Orlic et Bodine, 1994). Elles sont aussi en mesure de se renouveler de façon autonome en quantité illimitée. Les cellules souches hématopoïétiques constituent possiblement la population de cellules souches la mieux caractérisée. Un des premiers marqueurs utilisés pour les identifier fut une glycophosphoprotéine de la surface membranaire appelée CD34 (Krause et al., 1996). Des anticorps détectant spécifiquement l'antigène CD34 révèlent une proportion d'environ 1.5% de cellules marquées CD34⁺ dans la moelle osseuse et moins de 0.5% dans le sang (Krause et al., 1996). L'activité mitotique de ces cellules est très faible avec une moyenne de seulement 8 à 10% des cellules entrant aléatoirement en réplication chaque jour, avec l'ensemble des cellules se divisant après 1 à 3 mois (Bradford et al., 1997). Suite à l'addition de cytokines ou à une myélosuppression provoquée par une chimiothérapie, ces cellules souches s'activeront à un rythme de réplication beaucoup plus élevé.

Les rôles du marqueur cellulaire CD34 sont encore mal définis. Néanmoins, un rôle d'adhésion cellulaire lui est attribué et serait important dans la localisation des cellules souches hématopoïétiques dans l'organisme (Healy et al., 1995). Le niveau de glycosylation du marqueur pourrait jouer un rôle dans la sélectivité d'adhésion avec la matrice extra cellulaire. On retrouve des cellules exprimant le marqueur CD34 dans la moelle osseuse, le sang, le foie et la rate (Fuchs et Segre 2000). Un rôle lui serait également attribué dans la différenciation cellulaire. Plus précisément, son expression serait associée à une inhibition de la différenciation (Fackler et al., 1995). Par exemple, lorsque des cellules qui expriment le marqueur CD34 sont forcées de se différencier par l'ajout de cytokines, l'expression du marqueur CD34 diminue jusqu'à des niveaux indétectables (Fackler et al., 1995). La présence du marqueur CD34 sur les cellules souches est apparue réversible, lui suggérant une fonction d'activation seulement (Sato et al., 1999). Brièvement, lorsque les cellules souches CD34⁻ sont contraintes de se répliquer (suite à un traitement au 5-fluorouracil, un agent myélosuppresseur), elles

deviennent progressivement CD34⁺. Ce changement de phénotype suggère que les cellules souches activées pour la réplication expriment le marqueur CD34. L'expression du marqueur CD34 permettrait aux cellules souches CD34⁻ de se diviser sans toutefois se différencier.

La purification de cellules CD34⁺ de la moelle ou du sang est associée à un enrichissement de 10 à 100 fois dans la capacité de ces cellules à former des colonies en culture. En comparaison, la fraction CD34⁻ en est incapable (Krause et al., 1996). De plus, aussi peu que 200 cellules CD34⁺ sont en mesure de reconstituer le système hématopoïétique d'une souris précédemment irradié mortellement, indiquant la présence de cellules souches dans la fraction CD34⁺ (Krause et al., 1994). Par conséquent, les cellules souches hématopoïétiques exprimant le marqueur CD34 ont été identifiées comme étant les cellules les plus primitives. Cette hypothèse est aujourd'hui très controversée. En effet, des études montrent que certaines populations de cellules CD34⁻ possèdent aussi les caractéristiques de cellules souches compromettant la valeur du marqueur CD34 comme marqueur de cellules souches hématopoïétiques (Morel et al. 1998).

Outre le marqueur CD34, d'autres marqueurs ont aussi été identifiés pour aider à la purification des cellules souches. Ces marqueurs sont principalement des marqueurs de différenciation spécifiques à certaines lignées compromises. Ainsi, une population de cellules souches sera identifiée lin⁻, spécifiant qu'elle exprime à moins de 10% le marqueur CD45RA⁺ et à moins de 5% les marqueurs CD13⁺, CD33⁺, CD61⁺ et CD19⁺ (Ziegler et al., 1999). De plus, le récepteur du facteur de croissance endothéliale vasculaire (*vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR2) présent dans seulement 0.1 à 0.5% des cellules CD34⁺ est également un marqueur potentiel de sélection positive des cellules souches. En effet, les études de Ziegler et al., (1999) démontrent que des cellules CD34⁺ VEGF⁻ sont incapables de reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées.

Les cellules souches hématopoïétiques sont en mesure après transplantation de se différencier en cellules endothéliales (impliquées dans l'angiogénèse), en cellules musculaires, d'être impliquées dans la régénération hépatique et de former certains types de cellules du système nerveux central (Weissman 2000; Ferrari et al., 1998).

L'importance des cellules souches hématopoïétiques dans la formation ou la régénération de tous ces types cellulaires reste encore à déterminer. Toutefois, ces possibilités contribuent à rendre les cellules souches hématopoïétiques un véhicule de livraison génétique très attrayant pour les applications de thérapie génique. D'ailleurs, de façon très surprenante, lorsque les cellules souches sont mises dans un autre environnement (dans un compartiment de l'organisme autre que leur compartiment régulier) elles sont en mesure d'adopter une différenciation spécifique à ce compartiment et de former un type cellulaire alors supposé impossible.

En conclusion, les cellules souches hématopoïétiques sont d'excellents véhicules cellulaires pour l'expression d'un gène de résistance seul ou en combinaison avec un gène thérapeutique. Leur capacité à régénérer entièrement le système hématopoïétique de façon illimitée, leur possibilité de se différencier en diverses lignées selon leur environnement, leur facilité d'accès par le sang ou la moelle osseuse et la capacité de les purifier, sont toutes d'excellentes raisons motivant leur choix comme véhicule thérapeutique idéal pour la thérapie génique.

CHAPITRE 3 : Les différents vecteurs d'expression utilisés en thérapie génique.

Les vecteurs disponibles pour l'expression d'un transgène sont variés. La capacité de ces vecteurs à délivrer et exprimer efficacement un transgène est directement reliée au succès des différents essais cliniques effectués à ce jour. Pour cette raison, le choix du vecteur d'expression est souvent une tâche ardue où l'on doit évaluer leurs avantages et inconvénients. Le vecteur idéal n'existe pas et c'est pourquoi le développement de nouveaux vecteurs ainsi que l'amélioration de ceux déjà existants est présentement un domaine où l'on effectue d'intenses recherches.

La majorité des systèmes d'expression sont inspirés des virus et de leur grande capacité à infecter divers types cellulaires. Il ne faut toutefois pas négliger les efforts soutenus déployés dans la mise au point d'un système à base de liposomes, des composés synthétiques facilitant l'entrée de l'ADN dans la cellule.

Pour la thérapie génique du cancer (concept de chimioprotection) et pour le traitement de certaines maladies génétiques, il est nécessaire de modifier les cellules cibles de façon stable. Le choix des vecteurs viraux, plus particulièrement des vecteurs rétroviraux est donc avantageux. Ce chapitre leur est presque exclusivement consacré bien que les principaux autres vecteurs soient aussi brièvement décrits.

3.1 Les rétrovirus

Les rétrovirus sont utilisés dans la majorité des protocoles cliniques établis à ce jour (Roth et Cristiano, 1997; Buchschacher et Wong-Staal., 2000). Ils sont fréquemment dérivés du *Moloney murine leukemia virus* (Mo-MLV), un rétrovirus dont les caractéristiques biologiques et génétiques sont très bien connues. Malheureusement, avec le temps, l'expression génique obtenue à partir des vecteurs dérivés du Mo-MLV décline souvent à des niveaux inadéquats in vitro et in vivo. Deux mécanismes sont connus pour atténuer l'expression génique de ces vecteurs: la répression de la transcription par des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, Challita et Kohn 1994; Hoeben et al., 1991) et la liaison d'inhibiteur spécifiques de la transcription selon la lignées cellulaires

(Loh et al., 1990; Cherry et al., 2000). Par conséquent, des vecteurs dérivés d'autres virus ont été développés dans l'objectif de contourner ces problèmes.

Un vecteur dérivé du *murine myeloproliferative sarcoma virus* (MSV), avec plusieurs mutations ponctuelles dans la région promoteur du virus, est capable d'une expression supérieure à ceux dérivés du Mo-MLV chez des cellules souches embryonnaires (Prince et Rigby, 1991). Récemment, des études ont montré que des vecteurs dérivés du Mo-MLV, mais modifiés pour la région activatrice du promoteur du MSV, sont supérieurs pour l'expression chez des cellules hématopoïétiques murines et humaines (Eckert et al., 1996; Robbins et al., 1998; Halene et al., 1999). Ces vecteurs ont aussi subi l'abolition d'une région du promoteur liant un répresseur de l'expression génique et une substitution de leur région d'hybridation avec l'amorce responsable de l'initiation de la transcription. Il est important que ces vecteurs modifiés soient en mesure d'une expression supérieure chez les cellules souches, mais aussi chez les progénitures différenciées puisque se sont ces dernières qui devront exprimer le transgène à des niveaux thérapeutiques.

Un autre vecteur, cette fois dérivé du *murine embryonic stem cell virus* (MESV ou *murine stem cell virus*, MSCV), est différent du Mo-MLV dans la mesure où son promoteur permet l'expression efficace d'un transgène dans un plus grand nombre de lignées cellulaires, incluant les cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques murines ou humaines (Hawley et al., 1994; Eckert et al., 1996). De plus, les modifications apportées à ce vecteur lui permettent d'être insensible au mécanisme d'inhibition de l'expression par des répresseurs spécifiques de la transcription (Laker et al., 1998; Cherry et al., 2000). Brièvement, ces modifications incluent la présence d'un site de liaison pour le facteur de transcription Sp1 et l'élimination d'éléments négatifs de régulation de la transcription. Malheureusement, les vecteurs dérivés du MSCV demeurent sensibles à l'inhibition par méthylation. La démonstration de l'inhibition directe de la transcription chez ces vecteurs par la méthylation fut démontrée par des traitements avec la drogue 5-AZA-CdR qui ont complètement restitué le phénotype d'expression (Cherry et al., 2000).

L'efficacité des gènes de résistance à conférer une chimioprotection peut, selon le gène, être directement proportionnelle à son niveau d'expression. Il pourrait donc être

avantageux d'utiliser des vecteurs modifiés permettant une plus grande expression du transgène. Des vecteurs dérivés à la fois du MSV et du MSCV sont capables de procurer un plus haut degré de résistance face à certaines drogues et d'augmenter significativement la survie de cellules souches hématopoïétiques humaines comparativement à des cellules contrôles modifiées avec le vecteur Mo-MLV (Eckert et al., 1996).

Récemment, la guérison de deux enfants atteint d'un syndrome d'immunodéficience lié au chromosome X dont le gène défectueux (sous-unité γ de plusieurs récepteurs de cytokines) a été remplacé dans les cellules souches hématopoïétiques avec l'aide de rétrovirus, démontre bien l'efficacité clinique de ces derniers (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Ces résultats cliniques sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été obtenus à partir d'un vecteur dérivé du Mo-MLV n'ayant subi aucune modification susceptible d'améliorer l'expression génique.

Les avantages des rétrovirus sont:

- Leur capacité à encapsider un segment d'ADN allant jusqu'à environ 8 Kb. Cette capacité suffit largement pour la majorité des applications potentielles (Roth et Cristiano, 1997).
- Leur capacité à intégrer leur matériel génétique dans le génome cellulaire (alors appelé provirus) permet de conserver l'information génique lors de la division cellulaire (Steffen et Weinberg, 1978).
- Leur capacité à intégrer et infecter uniquement des cellules en réplication cellulaire est très avantageuse lorsque l'on veut cibler l'infection de cellules tumorales au cerveau (les cellules saines du cerveau étant très majoritairement quiescentes) (Roth et Cristiano, 1997).
- Leur capacité à infecter une très grande proportion de cellules d'une population donnée (à des niveaux près de 100%) permet d'observer le phénotype provoqué par un transgène chez une population polyclonale infectée et d'éviter ainsi la fastidieuse tâche de la sélection clonale.

- Leur faible immunogénicité et leur architecture génétique simple est bien connue (Weinhselbaum et Kufe, 1997).

En contre-partie, ces rétrovirus présentent également quelques désavantages :

- Ils sont incapables de s'intégrer au génome des cellules quiescentes. Le faible taux de réplication des cellules souches hématopoïétiques (moins de 10%) est un obstacle majeur (Bradford et al., 1997). Récemment, l'ajout d'un facteur de croissance a montré une activation de la réplication et une efficacité accrue de l'infection de cellules neuronales in vivo (King et al., 2000). Ainsi, il peut s'avérer bénéfique d'utiliser des cytokines pour faciliter la transduction des cellules souches hématopoïétiques (Tisdale et al., 1998; Kittler et al., 1997).
- Les particules virales sont susceptibles d'être inactivées par les protéines du complément du sérum (Roth et Cristiano, 1997).
- Généralement, les particules virales ne peuvent pas être produites à une concentration au-delà de 10^7 particules/ml à moins d'être formées de protéines isolées du *vesicular stomatitis virus G* (VSVG) pour l'assemblage de l'enveloppe. En effet, les particules virales produites avec la protéine VSVG sont très stables et en mesure de supporter des ultracentrifugations permettant d'accroître la concentration à des niveaux de 10^{10} particules/ml (Burns et al., 1993; Galipeau et al., 1999).
- Le tropisme (la capacité à infecter un type cellulaire plutôt qu'un autre) des protéines constituant l'enveloppe des particules virales ne permet pas d'infecter efficacement l'ensemble des types cellulaires.
- La possibilité de produire des virus infectieux par recombinaisons homologues entre les séquences de vecteur d'expression et des protéines virales.
- Le risque que l'insertion génomique aléatoire du provirus engendre l'activation d'un oncogène (par la proximité du promoteur viral à celui de l'oncogène) ou l'inactivation d'un gène de suppression de tumeur (en s'insérant au milieu).

Toutefois, ces possibilités, incluant la production de virus infectieux, sont très faibles puisque aucun cas n'a été déclaré à ce jour.

3.2 Autres principaux vecteurs

Les lentivirus:

Les lentivirus forment une sous catégorie des rétrovirus. Leur génome et leur réplication sont toutefois plus complexes (pour un résumé voir Buchschacher et Wong-Staal, 2000). Le lentivirus le plus étudié est celui de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Les lentivirus présente l'avantage d'être en mesure d'infecter de façon stable des cellules quiescentes comme les neurones et les cellules souches (Case et al., 1999; Miyoshi et al., 1999). Ils peuvent également infecter les cellules en prolifération à des niveaux généralement beaucoup plus élevés que les rétrovirus dérivés du Mo-MLV (Naldini et al., 1996; Mochizuki et al., 1998). Une lignée cellulaire d'encapsidation stable (produisant les protéines essentielles à la production de particules virales) est maintenant disponible (voir section 3.2). Ceci devrait faciliter leur production et leur utilisation dans différents protocoles de thérapie génique (Kafri et al., 1999).

L'identification récente d'une séquence facilitant la translocation nucléaire du génome des lentivirus leur permet d'obtenir une expression du transgène encore plus élevée (Follenzi et al., 2000). Leur principal désavantage est leur origine (VIH) et les conséquences que pourrait provoquer un virus recombinant chez l'humain. Pour cette raison bioéthique, des études cliniques utilisant les lentivirus ne sont pas encore approuvés bien que ces vecteurs semblent très prometteurs (Marshall, 2000).

Les adénovirus:

Les adénovirus sont des virus communément retrouvés chez l'humain. Ils sont très intéressants puisqu'ils peuvent infecter efficacement toutes sortes de types cellulaires indépendamment de leur statut de prolifération. Malheureusement, les cellules souches hématopoïétiques seraient assez difficiles à infecter avec ce type de vecteur malgré qu'il soit possible de produire des particules adénovirales à des concentrations supérieures à 10^{11} particules/ml (Halene et Kohn, 2000). De plus, l'utilisation de ces virus ne permet pas une expression stable et à long terme du transgène à la progéniture puisque leur

génomique ne s'insère pas dans celui de la cellule infectée. Néanmoins, une étude récente a montré qu'après certaines modifications, il est possible que ces virus s'intègrent dans le génome cellulaire à un taux d'environ 10% (Zheng et al., 2000). Leur grand désavantage demeure toutefois leur très forte immunogénéicité. La présence de protéines virales intactes produites chez les cellules infectées par ces vecteurs provoque une forte réaction immunitaire variant de l'apparition du symptôme de la fièvre et à une toxicité hépatique. Malheureusement, en septembre 2000 un jeune homme de 18 ans chez qui on avait administré une forte dose de particules adénovirales est décédé suite à une réaction anaphylactique (Marshall, 2000). Des modifications visant à réduire l'immunogénéicité de ces virus laissent supposer un avenir meilleur pour cette classe de vecteurs (Zou et al., 2000).

Le virus adéno-associé (AAV):

Les vecteurs dérivés du AAV possèdent plusieurs caractéristiques très attrayantes. Tout comme les lentivirus, ils peuvent infecter (bien que de façon moins efficace) une grande variété de lignées cellulaires en prolifération ou non. Ils sont non-immunogéniques et tout comme la forme sauvage du virus ils seront bientôt capables d'une intégration génomique à un site spécifique du chromosome 19. Cette particularité diminuerait ainsi le risque de provoquer un cancer suite à une intégration génomique aléatoire. Les protéines virales essentielles à une intégration génomique spécifique ont été identifiées (Sato et al., 2000). Leur efficacité à infecter des cellules souches hématopoïétiques est controversée. Cependant, leur utilité dans l'infection des cellules musculaires, hépatiques ou du système nerveux central est grandissante (Marshall, 2000). Les vecteurs dérivés du AAV constituent certainement un excellent choix pour l'infection d'une grande variété de types cellulaires.

Table 3.1 Caractéristiques des principaux vecteurs utilisés en thérapie génique

Vecteurs	Avantages	Désavantages
Rétrovirus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efficacité de transfert ▪ Intégration génomique ▪ Non-immunogénique ▪ Génétique simple ▪ Infecte seulement des cellules en division (pour le traitement du cancer du cerveau) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecte seulement des cellules en division (problème pour les cellules souches) ▪ Intégration génomique aléatoire ▪ Possibilité de virus recombinant ▪ Titre relativement faible
Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Efficacité de transfert innégale ▪ Intégration génomique ▪ Non-immunogénique ▪ Infecte les cellules en division ou non 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Possibilité de virus recombinants ▪ Génétique plus complexe ▪ Intégration génomique aléatoire
Adénovirus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Titre élevé ▪ Infecte les cellules en division ou non 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aucune intégration génomique ▪ Très immunogénique
Virus adéno-associé	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecte les cellules en division ou non ▪ Possibilité d'intégration génomique spécifique ▪ Non immunogénique 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Faible capacité d'encapsulation ▪ Titre faible
Liposome	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Synthétique ▪ Non-immunogénique 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Faible efficacité de transfert ▪ Parfois cytotoxique

3.3 Cycle de réplication des rétrovirus et la production de particules virales à partir d'une lignée d'encapsidation

La connaissance du système de réplication des rétrovirus est à la base de leur utilisation comme vecteur en thérapie génique. Brièvement, les rétrovirus consistent en une capsidie protéique comprenant deux molécules identiques d'ARN simple brin et les enzymes nécessaires à leur réplication. La capsidie est elle-même entourée d'une enveloppe protéique constituée d'une glycoprotéine virale spécifique et de protéines membranaires de la cellule infectée (pour une revue complète, voir Buchschacher et Wong-Staal, 2000).

L'infection débute lorsqu'une particule virale rencontre une cellule ayant à sa surface les récepteurs responsables de l'interaction spécifique avec les protéines de l'enveloppe virale. Cette interaction détermine ainsi le tropisme du virus, c'est à dire les types cellulaires qu'un virus spécifique peut infecter. L'interaction entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale provoque la fusion de ces deux membranes ou l'endocytose du récepteur et du virus, relâchant ainsi au cytoplasme la capsidie virale contenant l'ARN viral. Cette dernière sera rapidement dissociée permettant à l'ARN virale d'être transcrit en ADN par l'enzyme transcriptase inverse virale et une amorce d'ARN de transfert tous deux transportées via la capsidie. L'ADN double brin nouvellement synthétisé sera transporté au noyau et incorporé au génome de la cellule par l'intégrase virale, une autre protéine présente initialement dans la capsidie. Les mécanismes et la chronologie de dissociation de la capsidie, de la transcription inverse et du transport nucléaire ne sont pas entièrement connus. Contrairement aux lentivirus, le transport nucléaire des rétrovirus nécessite la désintégration de la membrane nucléaire lors de la réplication cellulaire. Des protéines uniques aux lentivirus sont responsables du transport nucléaire de l'ADN sans que la désintégration de la membrane nucléaire soit nécessaire.

L'ADN viral intégré, maintenant référé comme provirus, est répliqué conjointement avec l'ADN génomique et est ainsi transmis à la progéniture lors de la réplication cellulaire. L'ARN proviral produit lors de la réplication est encapsidé (les rétrovirus étant des virus à ARN) ou traduit pour la formation de protéines virales nécessaires à la production de nouvelles particules virales.

Les protéines essentielles à la production de nouvelles particules virales ne sont pas nombreuses et sont fournis par seulement trois gènes structuraux. Ces gènes, *gag*, *pol*

et *env*, sont communs à tous les rétrovirus. Le gène *gag* code pour les protéines de la capsid; le gène *pol* pour les enzymes responsables de la réplication; le gène *env* pour les protéines de l'enveloppe virale. Ces trois gènes sont traduits à partir d'un seul ARNm initié par le promoteur viral, le *long terminal repeat* (LTR). Les gènes *gag* et *pol* sont initialement exprimés comme une polyprotéine de fusion alors que le gène *env* est traduit de façon indépendante à partir d'épissage alternatif de l'ARN initial (Mulligan, 1991; Buchschacher et Wong-Staal, 2000).

Pour la formation d'un vecteur rétroviral deux éléments sont requis, soit le promoteur viral LTR et le signal d'encapsidation (Ψ). Les trois gènes viraux compris entre les deux LTR sont habituellement retirés (à l'exception du signal d'encapsidation) pour faire place au gène d'intérêt. Le signal d'encapsidation (de courte séquence) est essentiel et spécifie quels ARN doivent être encapsidés lors de la formation de nouvelles particules virales. L'ARN des trois gènes viraux étant retiré, il faut donc fournir en trans les protéines virales nécessaires à la production de particules virales contenant notre gène thérapeutique. Pour ce faire, la technique la plus efficace, est la création d'une lignée d'encapsidation exprimant de façon stable les protéines virales. L'ADNc de chacune des protéines est inséré indépendamment dans le génome cellulaire (en 3 événements) afin de minimiser les chances de recombinaisons homologues produisant des virus infectieux. Les lignées d'encapsidation créées ainsi sont dites de troisième génération en rapport que les chances que trois événements de recombinaison se produisent (pour reconstituer le génome viral) sont pratiquement inexistantes. Ceci rend très sécuritaire l'emploi de ces lignées. Notons qu'il est improbable que l'ARN codant pour l'une ou l'autre des protéines virales soit encapsidé puisque la séquence d'encapsidation (Ψ) n'est pas présente sur les ARN de ces protéines. Uniquement l'ARN du gène d'intérêt produit à partir du promoteur LTR du vecteur sera encapsidé pour former un virus modifié. Ce dernier, sans l'ARN des protéines virales sera incapable d'une réplication autonome après avoir infecté une cellule cible.

Bref, il suffit d'insérer notre gène d'intérêt entre les deux LTR d'un rétrovirus démunie de son génome (à l'exception du signal d'encapsidation) et de transférer le nouveau vecteur ainsi formé dans une lignée d'encapsidation. Des virus non-infectieux contenant notre gène d'intérêt sont ainsi produits grâce à la présence des protéines virales produites par la lignée d'encapsidation (Figure 3.1).

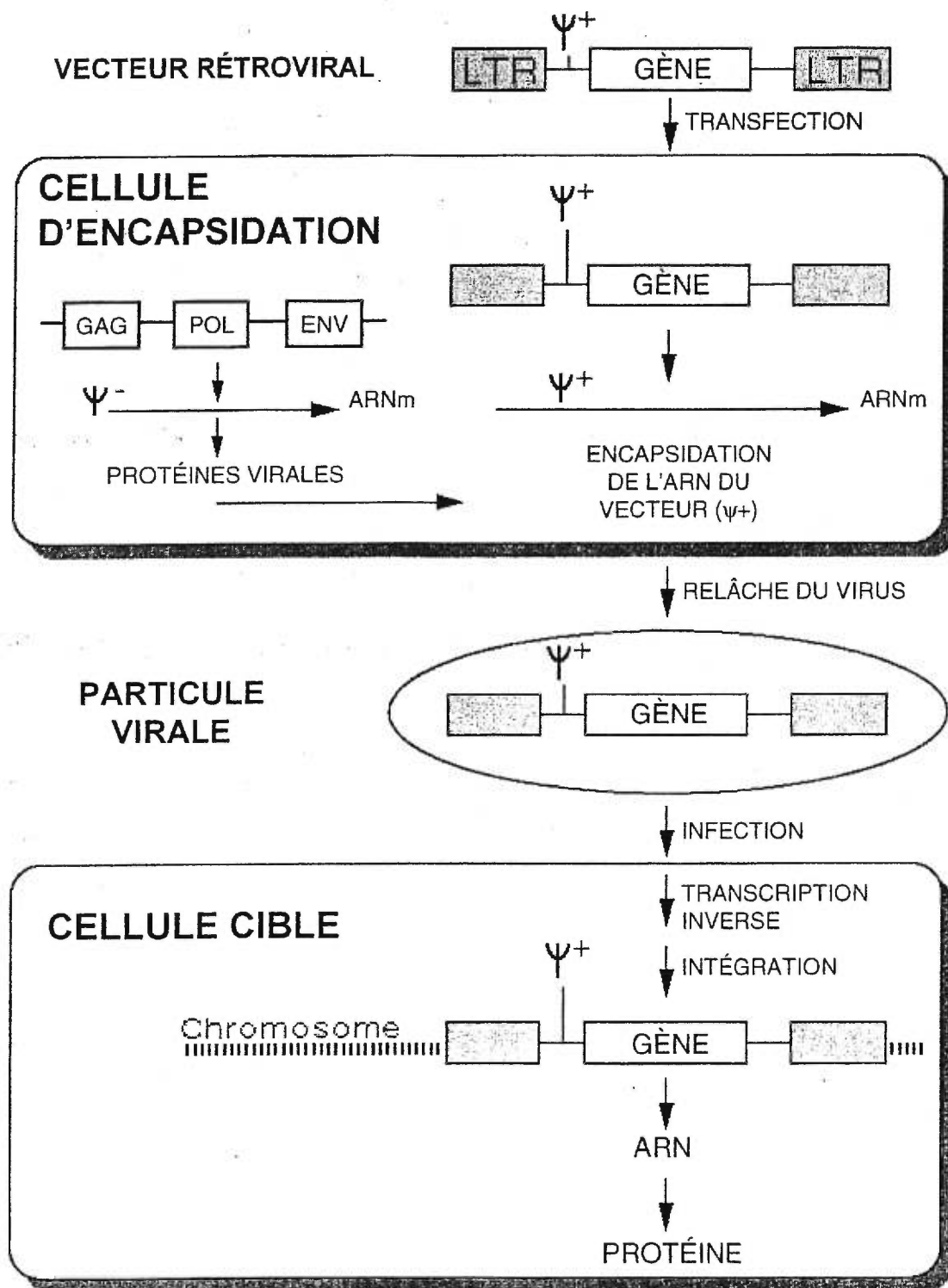


Figure 3.1 Schéma représentant le transfert d'un vecteur rétroviral dans une lignée d'encapsidation pour la production de virus recombinants capables d'infecter une cellule cible.

3.4 Les vecteurs bicistroniques

Un vecteur bicistronique permet la traduction de deux protéines à partir d'un seul promoteur produisant un ARNm unique. Pour l'expression de deux transgènes, il est avantageux d'utiliser des vecteurs bicistroniques n'ayant qu'un promoteur puisque la présence de deux promoteurs indépendants placés à courte distance l'un de l'autre sur le même vecteur d'expression crée parfois une interférence réduisant leur efficacité (Emerman et Temin, 1984; Emerman et Temin, 1986). L'utilisation de vecteurs bicistroniques est aussi supérieure à celle de vecteurs produisant une protéine de fusion, puisqu'il est parfois nécessaire que les protéines soient exprimées dans des compartiments cellulaires différents.

La synthèse de deux protéines distinctes à partir d'un ARNm unique est possible grâce la présence d'une séquence appelée "site interne d'entrée du ribosome" (*internal ribosome entry site*, IRES). Cette séquence d'ARN a été découverte chez des virus de la famille des picornavirus. Elle permet l'initiation de la traduction de manière cap-indépendant (Pelletier et Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988). Cette courte séquence (environ 570 pb) permet, par sa structure secondaire et tertiaire, le positionnement du ribosome et l'initiation de la traduction. Toutefois, selon la séquence à traduire, l'initiation de la traduction sous le contrôle d'un IRES serait généralement quelque peu réduite comparativement à la traduction cap-dépendant.

Le rôle de la séquence IRES chez les virus permet la traduction préférentielle des protéines virales. En effet, la traduction des protéines cellulaires est inhibée suite au clivage, par une protéase virale, du facteur eIF4G responsable de l'initiation de la traduction cap-dépendant (revue dans Poulin et Pyronnet, 2000). Pour d'autres picornovirus comme celui de l'encéphalomyocardite (EMC), la présence de la séquence IRES permet également une traduction sélective des protéines virales suite à l'inactivation par le virus, par un mécanisme encore incompris, de la machinerie cap-dépendant cellulaire. Récemment, une séquence IRES a été identifiée chez les eucaryotes comme étant responsable d'une traduction cap-indépendant de protéines impliquées lors de la mitose (Pyronnet et al., 2000).

L'utilisation de vecteurs bicistroniques utilisant principalement l'IRES du virus de l'EMC s'est avérée très efficace pour l'expression de deux gènes (Ghattas et al., 1991) et plus spécifiquement pour l'expression de deux gènes de résistance aux drogues (Galipeau et al., 1997; Suzuki et al., 1997; Beauséjour et al., 1998).

CHAPITRE 4 : Utilisation des acides nucléiques pour supprimer l'expression génique.

De nombreuses et nouvelles approches dans le traitement du cancer nécessitent que certains gènes soient supprimés. Souvent, ces gènes sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, dans les contrôles de l'induction de l'apoptose ou dans le développement d'une résistance aux drogues. Une façon de supprimer l'action de ces gènes est de réduire directement leur traduction en protéines par l'intermédiaire de ribozymes (Rbz), de désoribozymes (désoxyRbz) et de molécules antisenses.

4.1 Les ribozymes

Les Rbz sont des molécules d'ARN capables d'une activité catalytique pour la digestion de l'ARN (pour un résumé voir Sun et al., 2000; Birikh et al., 1997). L'activité catalytique de l'ARN a été initialement identifiée chez les introns de groupe I (Cech et al., 1981). Les Rbz existent de façon naturelle sous différentes formes catalytiques. Parmi celles-ci, on retrouve: (1) Rbz de type *hammerhead*, (2) Rbz de type *hairpin*, (3) Rbz dérivés des introns autocatalytiques de groupe I, (4) dans la composante ARN de la Rnase P, (5) et dans l'ARN génomique de certains virus comme celui de l'hépatite D.

Les Rbz de type *hammerhead* sont dérivés du génome du virus du tabac (*ringspot*) où ils jouent un rôle actif dans la réplication de ce virus (Haseloff et Gerlach, 1988). Il serait possible de les utiliser à des fins thérapeutiques pour leur capacité de couper spécifiquement un ARN messager (ARNm) permettant d'abaisser ou même de supprimer la traduction protéique d'un gène spécifique. Ils sont les plus étudiés en raison de leur simplicité, de la petite taille de leur unité catalytique (30 à 60 nucléotides) et pour leur capacité à maintenir une activité catalytique spécifique indépendamment de la séquence nucléosidique à laquelle ils sont rattachés (Sun et al., 2000).

La structure des Rbz de type *hammerhead* consiste en une unité catalytique (tige II) composée de 22 nucléotides et de deux courtes séquences servant à reconnaître par une hybridation spécifique l'ARNm de part et d'autre du site de coupure ciblé (tige I en position 5' et tige III et position 3') (Figure 9.2 en page 122). Le site reconnu et coupé en position 3' par les Rbz de type *hammerhead* est le triplet 5'-NUH-3', où N représente

n'importe quel nucléotide, U est conservé et H est un des trois nucléotides suivant C, A ou U. Des études ont montré que les triplets GUC et le AUC sont ceux coupés le plus efficacement (Shimayama et al., 1995; Ludwig et al., 1998). Toutefois, d'autres études rapportent que la règle du NUH peut ne pas être respectée, et qu'il est difficile de prédire avec certitude la capacité des Rbz à couper un triplet précis *in vitro* (Kore et al., 1998).

La coupure catalytique par un Rbz implique une transestérification nonhydrolytique libérant en 5' de l'ARNm un groupement hydroxyle et en 3' un groupement phosphate cyclique (van Tol et al., 1990). La présence d'ions bivalents accessibles, par exemple le Mg^{2+} , est essentielle à l'activité catalytique et pourrait s'avérer déterminante dans la capacité des Rbz de couper de façon efficace l'ARN intracellulaire en raison de la faible concentration de ces ions dans la cellule (Dahm et Uhlenbeck et al., 1991).

Les sites de coupure (de préférence les triplets GUC et AUC) sont choisis de façon spécifique sur la séquence ARNm ciblée par les tiges de reconnaissance du Rbz (tige I et III). Pour que ces tiges puissent s'hybrider correctement avec l'ARNm ciblé, il est fondamental que le site de coupure sélectionné et ses séquences 5' et 3' avoisinantes soient situés sur un segment d'ARN simple brin. L'ARNm ciblé et la séquence d'ARN formant le Rbz ne doivent pas adopter une conformation intracellulaire contenant des tiges doubles brins empêchant leur hybridation mutuelle. L'utilisation d'un programme informatique (du type MFOLD) construit à partir des principes biophysiques régissant les structures secondaires de l'ARN, permet d'obtenir une simulation des conformations les plus plausibles qu'adoptera l'ARNm cible dans des conditions intracellulaires (température, pH, concentration de sels etc.) établies (Zucker, 1989). Malheureusement, les approximations données par un tel programme informatique ne considèrent pas les conformations tertiaires de l'ARN de même que l'interaction possible de protéines se liant à l'ARN *in vivo*. Ces contraintes rendent difficile l'identification d'un site de coupure accessible et par conséquent la suppression de l'expression d'une protéine par l'intermédiaire de Rbz.

Les tiges de reconnaissance ou d'hybridation de l'ARNm ciblé jouent un rôle primordial dans l'efficacité d'un Rbz. Leur longueur serait directement reliée à l'activité catalytique d'un Rbz en régulant la vitesse de dissociation de son substrat. Des tiges trop

longues ralentiraient la dissociation du Rbz et de son substrat réduisant ainsi son activité catalytique (Herschlag, 1991; Scarabino et Tocchini-Valentini, 1996). La longueur idéale de ces tiges de reconnaissance est controversée (allant de 5 à 18 nucléotides) et est probablement fortement dépendante du substrat à couper. Néanmoins, de façon générale, il semble qu'un Rbz avec une tige en 3' (III) plus longue que la tige en 5' (I) démontre une activité catalytique plus élevée (Birik et al., 1997). De plus, la longueur de la tige 3'(III) serait critique pour assurer la spécificité de coupure du Rbz (Hertel et al., 1996). La spécificité de reconnaissance du bon ARNm à couper a été démontrée par la capacité des Rbz de distinguer des ARNm différents par seulement 1 ou 2 nucléotides (Kobayashi et al., 1994; Phylactou et la., 1998). Bref, les Rbz sont de courtes séquences d'ARN pouvant digérer spécifiquement un brin d'ARN donné.

4.1.1 L'utilisation des ribozymes en thérapie génique

Certaines conditions doivent être respectées pour qu'un Rbz soit en mesure de couper un ARNm intracellulaire à des niveaux suffisamment élevés pour lui permettre d'être utilisé à des fins thérapeutiques. Premièrement, les Rbz doivent avoir une stabilité extra et intra cellulaire leur laissant suffisamment de temps pour lier et couper l'ARNm. La modification directe des nucléotides formant le Rbz ou la modification des liens phosphates inter nucléotidiques (par des liens phosphorothioates par exemple) n'est pas possible puisque toutes ces modifications inhibent à divers degrés leur activité catalytique (Beigelman et al., 1995; Sun et al., 2000). Cependant, l'ajout aux extrémités du Rbz de courtes séquences d'ARN de transfert stabiliserait les Rbz *in vivo* (Yuyama et al. 1992). De plus, les Rbz doivent être localisés (espace nucléaire ou cytoplasmique) au même endroit que leur substrat afin d'assurer un maximum d'interaction entre les deux.

Deuxièmement, l'utilisation thérapeutique des Rbz nécessite qu'ils soient transférés de manière efficace à la cellule. On peut exprimer les Rbz de façon endogène en utilisant des vecteurs viraux. On peut également les transférer de façon exogène par l'utilisation d'un complexe cationique (liposome). L'utilisation d'un complexe cationique *in vivo* est malheureusement confrontée à une certaine toxicité et à une mauvaise biodistribution (Hope et al., 1998). Par ailleurs, l'expression des Rbz par des vecteurs viraux rencontre également des problèmes. Il est parfois difficile d'exprimer les Rbz à

des niveaux suffisamment élevés pour observer un effet thérapeutique. Le choix du promoteur est donc important; puisqu'il doit assurer une expression maximale. Bien que plusieurs promoteurs différents puissent exprimer de façon efficace des Rbz, le promoteur de l'ARN polymérase III serait l'un des plus efficace (Thompson et al., 1995).

L'utilisation thérapeutique des Rbz a été évaluée *in vitro* (en culture cellulaire) et *in vivo* (chez la souris). Par exemple, des Rbz ciblant l'ARNm du gène de multirésistance aux drogues (MDR) peuvent diminuer l'expression de ce gène et restaurer la chimiosensibilité aux drogues chez des cellules en culture (Wang et al., 1999; Gao et al., 1999). De plus, des Rbz construits spécifiquement pour diminuer l'expression du récepteur du facteur de croissance épidermal ou l'oncogène K-ras peuvent inhiber la croissance tumorale chez des souris (Funato et al., 2000; Yamazaki et al., 1998). Dans ces études, les Rbz étaient transférés *ex vivo* aux cellules tumorales avant que ces dernières soient inoculées chez les souris puisque avec les techniques de transfert présentement disponibles, il est difficile de démontrer le potentiel de ces Rbz directement *in vivo*. À ce jour, au moins trois protocoles clinique de phase I/II sont à l'étude pour l'utilisation d'un Rbz dirigé contre le VIH (Sun et al., 2000). En conclusion, les obstacles majeurs à l'application future de Rbz demeurent leur instabilité, leur biodistribution et l'inefficacité de leur transfert cellulaire.

4.2 Les désoxyribozymes

Les désoxyribozymes (désoxyRbz) sont formés d'une courte séquence d'ADN et, par conséquent possèdent l'avantage d'être beaucoup plus stables que les Rbz constitués d'ARN. Les désoxyRbz ne sont pas retrouvés naturellement mais sont plutôt synthétisés en laboratoire (Santoro et Joyce, 1997). Tout comme les Rbz, ils possèdent des tiges de reconnaissance s'hybridant à l'ARN et peuvent couper spécifiquement un substrat. De plus, les désoxyRbz sont en mesure de reconnaître le codon initiateur (AUG) de tous les gènes puisqu'ils peuvent couper n'importe quelle jonction purines-pyrimidine. Ils ont aussi l'avantage d'être plus efficaces que les Rbz pour couper l'ARN et peuvent fonctionner à une concentration d'ions bivalents (Mg^{2+}) beaucoup plus basse, proche de la concentration physiologique intracellulaire (Santoro et Joyce, 1997).

Très récemment, un nombre limité mais grandissant d'études ont montré la suppression d'un gène par l'action de désoxyRbz chez des cellules in vitro (pour un résumé voir Sun et al., 2000). Par exemple, Wu et al., (1999) ont démontré qu'il était possible en utilisant des désoxyRbz dirigés contre la protéine de fusion p210^{bcr-abl} de réduire de 50 à 80% la croissance de colonies provenant de cellules CD34⁺ isolées de la moelle de patients atteints de la leucémie myéloïde chronique.

Puisque les désoxyRbz sont constitués d'ADN, il est impossible de les transférer par des vecteurs d'expression. On doit obligatoirement utiliser des systèmes de transfert exogènes (liposomes et autres). Dans le but d'augmenter la stabilité et la résistance à la dégradation des désoxyRbz, la modification de leurs liens phosphodiester a été évaluée. Un rapport préliminaire suggère qu'une telle modification n'affecte pas la capacité catalytique des désoxyRbz contrairement aux Rbz (Sun et al., 1999). Bref, les désoxyRbz sont faciles à synthétiser, ont une plus grande activité catalytique et sont plus stables que les Rbz. Néanmoins, leur potentiel thérapeutique demeure grandement dépendant de leur biodistribution et de l'efficacité des systèmes de transfert.

4.3 Les oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides antisens (OAS) constituées d'ADN ou d'ARN agissent en inhibant la traduction protéique suite à leur hybridation spécifique à un segment d'ARNm. L'action inhibitrice des OAS peut provenir de plusieurs mécanismes différents: (i) d'abord principalement d'une dégradation spécifique des duplexes ARN-ADN ou ARN-ARN par la ribonucléase H (Rnase H) intracellulaire; (ii) ensuite par l'inhibition de la liaison du complexe de traduction de l'ARN; et enfin (iii) par l'inhibition du transport et de l'épissage de l'ARNm.

Tout comme pour les Rbz, les OAS peuvent être transmis aux cellules cibles de façon endogène (par un vecteur d'expression, on les qualifie alors d'ARNm antisens) ou exogène (avec l'aide de molécules cationiques). Toutefois, le transfert endogène implique nécessairement que les molécules antisens se présentent sous la forme d'ARN intracellulaire. Les problèmes rattachés à l'efficacité des vecteurs de transfert combinés à l'instabilité des molécules ARN limitent l'utilisation de cette approche. Pour ces raisons, il est généralement préférable d'utiliser des OAS formés d'ADN transmis de manière

exogène. Néanmoins, le choix du composé cationique servant au transfert des OAS dépend des objectifs et des conditions de recherche.

Les OAS ont généralement une longueur de 15 à 20 nucléotides et sont habituellement modifiés pour des liens phosphorothioates beaucoup plus résistants à la dégradation et l'inactivation par certaines nucléases (Piché et Rancourt, 1999). La modification structurelle apportée par ce type de lien n'affecte pas la possibilité de la Rnase H à dégrader l'ARNm du duplexe ARN-ADN (Jen et Gewirtz, 2000). Le choix du site de liaison des OAS à l'ARNm est difficile à identifier puisqu'il implique que le site soit accessible structurellement.

La liste des gènes dont l'expression a été modifiée par l'utilisation d'OAS est impressionnante et démontre clairement l'efficacité de cette approche pour modifier la traduction protéique. Par exemple, l'utilisation d'OAS dirigés contre l'ADN méthyltransférase (un enzyme impliqué dans la méthylation de l'ADN) a montré une activité antitumorale *in vitro* et *in vivo* (MacLeod et Szyf, 1995; Ramchandani et al., 1997). De plus, plusieurs essais cliniques pour la thérapie du cancer par des OAS sont en voie de réalisation et deux d'entre eux ont déjà atteint la phase III (pour un résumé voir Monia et al., 2000). Ces derniers impliquent la suppression du gène Bcl-2, un régulateur de la mort cellulaire programmée, et de la protéine kinase C, un médiateur impliqué dans la transmission de signaux intracellulaires (Waters et al., 2000; Yuen et al., 1999).

CHAPITRE 5 : Les principaux gènes de résistance aux drogues utilisés en thérapie génique.

La liste de gènes de résistance identifiés à ce jour est impressionnante et ne cesse de s'allonger. Ces gènes ont chacun la possibilité de conférer une résistance à une classe de drogues qui leur est spécifique. Ce chapitre sera exclusivement consacré aux gènes ayant fait l'objet d'études mesurant leur potentiel de chimio-protection et de sélection.

5.1 Le gène de multirésistance aux drogues (MDR)

Le gène de multirésistance aux drogues (*multidrug resistance*, MDR) code pour une glycoprotéine (P-gp) ayant 12 passages transmembranaires formant une pompe pouvant expulser une grande variété de substrats hors de la cellule (Gottesman et Pastan, 1993). Le peu de spécificité de cette pompe permet d'expulser plusieurs types de composés hydrophobes, souvent polycycliques, toxiques pour la cellule ou non. La P-gp confère une résistance à plusieurs drogues utilisées dans le traitement du cancer telles la daunomycine, la vincristine, la doxorubicine, la vinblastine et la paclitaxel. La faible expression de la P-gp chez les cellules souches myéloïdes et érythroïdes explique leur sensibilité face à ces drogues (Drach et al., 1992). Cette observation sous tend qu'il serait possible de réduire la toxicité hématopoïétique générée par la majorité de ces agents anticancéreux suite au transfert de la P-gp aux cellules hématopoïétiques saines.

Malheureusement, l'expression accrue de la P-gp est un mécanisme de résistance couramment retrouvé dans plus de 50% des cancers chez l'homme (Goldstein et al., 1989). Puisque les cellules cancéreuses ont une forte expression de la P-gp, il faut régulièrement employer de fortes doses de drogues pour tenter de les éliminer. Il pourrait donc être difficile de protéger suffisamment les cellules hématopoïétiques saines contre les fortes doses de drogues nécessaires à l'élimination des cellules cancéreuses. Il existe plusieurs inhibiteurs de la P-gp, notamment le verapamil et la cyclosporine A (Kessel, 1986). Ces derniers pourraient s'avérer très bénéfiques pour restituer la sensibilité aux cellules cancéreuses exprimant un haut niveau de P-gp. Malheureusement, l'effet de chimio-protection conféré par le transfert de la P-gp aux cellules souches saines serait lui aussi aboli par ces inhibiteurs. De plus, puisque ces inhibiteurs sont non spécifiques ils provoquent des effets indésirables. Récemment, un inhibiteur de la P-gp ayant aucune

toxicité clinique, le *trans-(E)*-flupentixol, a été découvert. Une approche thérapeutique consisterait à utiliser un mutant de la P-gp (substitution d'une phénylalanine pour une alanine en position 983) insensible à cet inhibiteur et toujours en mesure de conférer une résistance aux drogues (Hafkemeyer et al., 2000). En effet, *in vitro* chez des cellules hématopoïétiques, une faible dose de flupentixol sensibilise les cellules exprimant la forme sauvage de la P-gp alors que les cellules exprimant la forme mutante F983A demeurent résistantes à la vinblastine et à la daunomycine.

5.1.1 Potentiel de chimio-protection (MDR)

Des souris transgéniques pour la P-gp ont démontré un potentiel de chimio-protection contre la daunomycine (Galski et al., 1989). Depuis, le potentiel de chimio-protection du gène MDR après transplantation chez la souris de cellules modifiées pour l'expression de la P-gp a aussi été démontré (Sorrentino et al., 1992; Podda et al., 1992). Dans ces études, les souris transplantées [pour la suite de cet ouvrage, est désigné par le terme souris transplantée, une souris ayant reçu des cellules de moelle modifiées pour l'expression d'un transgène] avec le gène MDR ont toléré de plus fortes doses de drogues avant que leur nombre de neutrophiles sanguins ne chute. Chez l'humain, des cellules souches CD34⁺ infectées avec le gène MDR ont aussi montré une expression de la P-gp liée à une résistance aux drogues *in vitro* (Bertolini et al., 1994; Ward et al., 1994). Le développement récent d'un mutant (F983A) de la P-gp résistant à un inhibiteur (flupentixol) devrait démontrer prochainement un potentiel de chimio-protection accrue *in vivo* chez la souris.

5.1.2 Potentiel de sélection (MDR)

Le phénomène de sélection *in vivo* d'un gène de résistance est étroitement lié à son potentiel de chimio-protection. Sorrentino et al. (1992) ainsi que Podda et al. (1992), ont démontré la possibilité de sélectionner *in vivo* chez la souris pour des cellules modifiées exprimant de hauts niveaux de P-gp. Dans ces études, une évidence de sélection *in vivo* est apparue après seulement un cycle de traitement au taxol ou à la paclitaxel. L'expression accrue de la P-gp fut démontrée pour une période de plus de 8 mois après la transplantation. De plus, la capacité de sélectionner pour des cellules

exprimant le gène MDR proviral plus d'un an après la transplantation laisse présager une infection efficace des cellules souches chez ces souris (Podda et al., 1992). Appuyant cette hypothèse, la possibilité de sélectionner des cellules hématopoïétiques exprimant le transgène MDR issues d'une transplantation secondaire (souris transplantées à partir de cellules de moelle isolées de souris précédemment transplantées) indique, hors de tout doute, l'infection et la sélection de cellules souches (Hanania et Deisseroth, 1994).

On peut également sélectionner *ex vivo*, de façon efficace, des cellules de la moelle avant de les transplanter chez des souris. En effet, des cellules de moelle infectées avec le gène MDR et sélectionnées *ex vivo* à la colchicine pour une période de 48 à 96 heures ont montré une augmentation de l'expression de la P-gp et une chimiorésistance accrue chez des souris transplantées avec ces cellules (Licht et al., 1999; Licht et al., 2000). La sélection *ex vivo* de cellules infectées est efficace et peut certainement être avantageuse. Toutefois, une sélection *ex vivo* requiert que les cellules soient conservées en culture pour une plus longue période et implique l'utilisation de cytokines afin de stimuler leur division cellulaire. Or, cette technique expérimentale comporte des risques puisque Bunting et al. (1998) ont montré que des souris transplantées avec des cellules de moelle modifiées avec le gène MDR et cultivées *ex vivo* pour une période prolongée peuvent développer un syndrome myéloprolifératif.

5.1.3 Études cliniques (MDR)

Parmi les gènes de résistance, seul le gène MDR montre des résultats cliniques. Les principaux objectifs des premiers essais cliniques visaient à montrer qu'un protocole de transfert génique impliquant le gène MDR est sécuritaire et à démontrer son potentiel de chimioprotection et de sélection. Une haute dose de chimiothérapie suivie d'une transplantation de moelle osseuse est maintenant le traitement suggéré pour les cancers métastatiques présentant une très mince probabilité de survie lorsque traités de façon standards. Dans ces conditions, Hesdorffer et al. (1998) ont montré qu'il était possible et sécuritaire d'infecter, avec un vecteur rétroviral exprimant le gène MDR, des cellules de la moelle avant leur transplantation chez un patient. Malheureusement, dans cette étude, aucune chimiothérapie n'a été donnée après la transplantation. Ainsi, les potentiels de

chimioptection et de sélection du gène MDR n'ont pu être évalués malgré la présence in vivo de cellules modifiées chez 2 des 5 patients transplantés.

Récemment, quatre patients atteints du cancer du sein ont été transplantés avec des cellules de moelle modifiées pour le transgène MDR. Trois de ces patients ont montré la présence du transgène dans leur cellules sanguines par réaction de polymérase en chaîne (*polymerase chain reaction*, PCR, Cowan et al., 1999). Ces trois patients ont reçu six cycles de paclitaxel suite à leur transplantation. Seulement un patient est demeuré positif pour la présence du transgène, sans toutefois qu'il y ait eu augmentation du pourcentage de cellules l'exprimant. Ces résultats décevants, peuvent s'expliquer de trois façons; d'abord l'expression du transgène est possiblement trop faible pour conférer une résistance à la paclitaxel chez au moins deux de ces patients; il est possible que les doses de paclitaxel administrées aient été insuffisantes pour permettre une sélection in vivo; et enfin, la stimulation des cellules de la moelle avec des cytokines lors de l'infection ex vivo précédant la transplantation peut avoir causé la différenciation des cellules souches, ne permettant qu'une expression à court terme du transgène chez des cellules différenciées ayant une prolifération limitée.

Finalement, un autre essai clinique réalisé au près de six patients atteints du cancer du sein, transplanté pour l'expression du gène MDR, a montré des résultats plus encourageants (Moscow et al., 1999). Dans cette étude, malgré que quatre patients aient perdu l'expression du transgène après la sélection à la paclitaxel, deux patients ont montré son expression après la sélection (ces deux patients avait initialement une expression indétectable du transgène). L'échec de la sélection chez ces quatre patients est possiblement le résultat d'une sélection trop faible puisque les deux patients ayant montré une sélection de leurs cellules avaient reçu une plus forte dose de paclitaxel. De plus, l'expression du gène MDR peut avoir conféré une résistance insuffisante à la paclitaxel chez ces quatre patients. Cet essai clinique est le seul exemple positif d'une sélection in vivo chez l'humain.

En conclusion, il est évident que les techniques de transfert des cellules humaines doivent à la fois être raffinées et étudiées sur un plus grand nombre de patients avant de pouvoir juger du potentiel de chimioptection ou de sélection du gène MDR chez l'humain.

5.2 Le gène de la méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT)

La protéine produite par le gène de la méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT) confère une protection contre l'action cytotoxique des agents alkylants. Un de ces agents couramment utilisé pour le traitement du cancer est le 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). Celui-ci est utilisé notamment dans le traitement du cancer du sein, du poumon, de l'intestin et contre les lymphomes (Carter et al., 1972). L'action cytotoxique du BCNU provient de l'inhibition de la réplication de l'ADN par sa double liaison covalente en position O⁶ de la guanine et sur la cytosine du brin antiparallèle formant ainsi un pont reliant les deux brins d'ADN (Tong et al., 1982). La capacité des agents alkylants à lier l'ADN leur confère un pouvoir mutagène et carcinogène pouvant provoquer des tumeurs secondaires chez les patients (Boffetta et Kaldor, 1994).

Une protéine, la MGMT, peut réparer les dommages causés par les agents alkylants en les dégageant de l'ADN par une réaction enzymatique (Pegg, 1990). La faible activité de la MGMT chez les cellules hématopoïétiques est possiblement la raison de leur grande sensibilité face aux agents alkylants (Gerson et al., 1985). Par conséquent, l'augmentation de l'expression de la MGMT chez ces cellules devrait conférer une résistance à ces agents.

Le O⁶-benzyguanine (BG) est un inhibiteur de la MGMT pouvant restaurer la sensibilité aux cellules qui ont développé une résistance aux agents alkylants en augmentant leur activité pour la MGMT (Dolan et al., 1991). Plusieurs formes mutantes de la MGMT existent et certaines sont résistantes au BG tout en conservant leur activité alkyl transférase. Parmi celles-ci, nous retrouvons les formes mutantes de la MGMT G156A (substitution d'une glycine pour une alanine) et P140K (substitution d'une proline pour une lysine). Ces formes mutantes affichent des résistances au BCNU respectives de 240 fois et plus de 1000 fois lorsqu'en présence de BG comparativement aux cellules exprimant la forme sauvage de la MGMT (Crone et al., 1994; Xu-Welliver et al., 1998). Ainsi, la mutation P140K s'avère la plus efficace à conférer une résistance au BG d'autant plus que son activité alkyl transférase est réduite d'un facteur de 10 comparativement à un facteur de 25 pour la mutation G156A.

Cette particularité est très importante, puisque le BG n'est pas cytotoxique (mais seulement un inhibiteur de la MGMT). Il doit être administré conjointement avec le BCNU pour être efficace. L'approche thérapeutique consiste donc à transférer une version mutante de la MGMT qui protégera la cellule contre les doses de BCNU et qui ne sera pas inhibée par le BG. Ainsi, seules les cellules non modifiées avec une activité MGMT sauvage endogène seront affectées par les doses de BCNU et de BG.

5.2.1 Potentiel de chimioprotection (MGMT)

La capacité à conférer une chimioprotection aux agents alkylants fut d'abord démontré en utilisant la forme sauvage de la MGMT. Le transfert rétroviral de la MGMT sauvage aux cellules hématopoïétiques murines a conféré une résistance significative *in vitro* et *in vivo* au BCNU en comparaison avec des cellules non modifiées exprimant des niveaux standards de MGMT (Allay et al., 1995; Moritz et al., 1995). Chez des souris, la transplantation de cellules exprimant le gène de la MGMT sauvage a aussi permis d'augmenter de façon significative leur survie suite à des doses répétées de BCNU comparativement à des souris non transplantées (Maze et al., 1996).

Le transfert de la MGMT sauvage permet d'obtenir des cellules significativement plus résistantes, mais avec une fenêtre d'utilisation du BCNU assez restreinte. Le développement de mutants permettant l'utilisation conjointe du BCNU et du BG a accentué substantiellement cette fenêtre thérapeutique. Des cellules modifiées avec la forme mutante G156A de la MGMT ont montré une augmentation de la résistance beaucoup plus élevée au BCNU/BG que les mêmes cellules modifiées avec la forme sauvage de la MGMT (Davis et al., 1997). De même, des souris transplantées, avec la forme mutante MGMT G156A, ont montré un taux de survie bien supérieur à celui des souris contrôles lors d'administration de BCNU et de BG (Davis et al., 1997). Des cellules souches hématopoïétiques humaines (CD34⁺) ont aussi montré une résistance au BCNU lorsqu'infectées avec la MGMT G156A (Reese et al., 1996). De plus, des souris dont le système hématopoïétique a été reconstruit avec des cellules exprimant la forme mutante G156A, ont pu tolérer de plus fortes doses de BCNU et de BG tout en montrant un ralentissement significatif de la progression de leurs tumeurs (Koc et al., 1999). Finalement, des souris transplantées avec la forme mutante P140K et traitées à des doses

toxiques de BCNU et de BG ont montré un taux de survie supérieur à celui de souris transplantées avec une autre forme mutante de la MGMT et soumises aux mêmes doses de BCNU et BG (Ragg et al., 2000). Cependant, il est difficile d'établir si la forme mutante P140K montre un avantage sur la forme G156A à conférer une chimioprotection puisque ces deux formes mutantes n'ont jamais été comparées directement.

5.2.2 Potentiel de sélection (MGMT)

La capacité de sélectionner des cellules modifiées avec une forme mutante de la MGMT à l'aide de doses de BCNU et de BG était très prometteuse puisque la forme sauvage de l'enzyme avait déjà montré un potentiel évident (Allay et al., 1997). Des souris dont les cellules du système hématopoïétique sont reconstituées à 30% avec la forme mutante G156A ont montré après seulement un cycle de BCNU et de BG la présence de la forme mutante dans 60% de leurs cellules (Davis et al., 1997). De façon similaire, des souris reconstituées à 10% avec la forme mutante P140K ont montré après 5 cycles hebdomadaires de BCNU et de BG la présence de cette forme mutante dans 90% de leurs cellules (Ragg et al., 2000). De plus, Ragg et al. (2000) ont aussi montré que cette sélection se produisait au niveau de cellules souches hématopoïétiques. En effet, les cellules de la moelle de souris issues d'une transplantation secondaire exprimaient à des niveaux beaucoup plus élevés (94% contre 2%) la MGMT P140K selon que les souris primaires avaient été sélectionnées ou non au BCNU/BG. Seulement 23% des cellules hématopoïétiques des souris secondaires reconstituées avec des cellules de souris primaires sélectionnées uniquement avec le BCNU exprimaient la MGMT P140K.

L'évaluation du potentiel de sélection dans un modèle animal possède l'avantage de pouvoir irradier mortellement l'hôte de manière à obliger la reconstitution de son système hématopoïétique par les cellules souches transplantées qu'elles soient modifiées ou non. Pour des raisons éthiques évidentes, il est impossible de procéder de la sorte avec des patients. Or, à ce jour, seulement le gène de résistance MGMT G156A s'est montré en mesure de reconstituer le système hématopoïétique d'une souris non-irradiée (Davis et al., 2000). Tel qu'attendu, ces souris avaient un pourcentage de cellules sanguines exprimant la MGMT G156A inférieur à 1% alors qu'après trois cycles de BCNU/BG, le pourcentage de cellules atteignait des niveaux de 75 à 100%. Ces résultats laissent

présager un potentiel très intéressant pour le gène de résistance MGMT à agir comme marqueur de sélection *in vivo* chez l'humain. À ce sujet, un essai clinique vient tout juste d'être entamé (Davis et al., 2000). La possibilité de sélection avec une forme mutante de la MGMT chez un hôte préalablement non-irradié laisse présager des résultats cliniques chez l'humain supérieurs à ceux obtenus avec le gène MDR. Néanmoins, comme pour la MGMT, le développement récent de mutants du gène MDR résistants à un inhibiteur non toxique pourrait augmenter le potentiel de sélection de ce gène de façon significative.

5.3 Le gène de la dihydrofolate réductase (DHFR)

Le methotrexate (MTX) est une drogue appartenant à la classe des antifolates et est utilisé dans le traitement de plusieurs cancers. Cette drogue est un analogue structurel de l'acide folique, le substrat naturel de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR). Le rôle physiologique de la DHFR est de réduire le dihydrofolate en tétrahydrofolate, un cofacteur impliqué dans la synthèse des purines, de la thymidine monophosphate (TMP) et de certains acides aminés (Blakley, 1984). L'inhibition de la synthèse de la TMP serait l'effet le plus toxique pour la cellule. Ainsi, la présence de thymidine extracellulaire permet souvent à la cellule d'échapper à cet effet cytotoxique du MTX.

Au moins trois mécanismes biochimiques sont responsables du développement d'une résistance au MTX. D'abord, une diminution de la concentration de MTX intracellulaire peut provenir d'une diminution directe de son transport (SirotnaK et al., 1981) et/ou d'une incapacité de la cellule à le retenir une fois à l'intérieur par un processus de polyglutamylation (Pizzorno et al., 1989). Ensuite, l'augmentation de l'expression de l'activité de la DHFR découle généralement de l'amplification du nombre de copie du gène (Alt et al., 1978). La caractérisation de plusieurs formes mutantes de la DHFR (naturellement produites ou créées par mutagenèse dirigée) a aussi permis d'obtenir une très forte résistance aux MTX ou à un autre analogue expérimental, le trimetrexate (TMTX). Le TMTX est un inhibiteur plus puissant de la DHFR que le MTX et il n'est pas sujet à une diminution de son transport intracellulaire contrairement au MTX (Fry et al., 1988).

In vitro chez des cellules, Patel et al. (1997) ont évalué 20 mutants de la DHFR pour leur capacité à conférer une résistance au MTX ou au TMTX. Ces mutants étaient

également évalués pour leur capacité à conserver leur activité enzymatique. Les résultats obtenus ont montré que des cellules exprimant les formes mutantes L22Y (une substitution d'une leucine pour une tyrosine en position 22) et F31S (une substitution d'une phénylalanine pour une sérine en position 31) étaient de 30 à 60 fois plus résistantes au TMTX et plus de deux à quatre fois plus résistantes au MTX comparativement aux cellules contrôles exprimant la forme sauvage de la DHFR. Or, la très grande majorité des études de chimioprotection *in vitro* et *in vivo* publiées à ce jour ont été effectuées avec l'une ou l'autre de ces deux formes mutantes. De façon très intéressante, le développement de doubles mutants (L22Y-F31S et L22Y-F31R) en mesure de conférer une résistance encore plus grande au MTX ou au TMTX pourrait éventuellement être très utile dans des protocoles de chimioprotection ou de sélection *in vivo* (Patel et al., 1997; Ercikan-Abali et al., 1996).

5.3.1 Potentiel de chimioprotection (DHFR)

La possibilité de conférer une résistance au MTX chez des cellules ayant une forte expression du gène de la DHFR a été démontrée vers le milieu des années 80 (Kwok et al., 1986; Hock et Miller, 1986; Williams et al., 1987). Dans ces études, le transfert de la DHFR, à diverses lignées cellulaires, a montré une importante augmentation de leur niveau de résistance au MTX. Plus tard, de façon similaire, des souris transplantées avec la forme mutante F31S de la DHFR et soumises à d'intenses doses de MTX ont montré un taux de survie de près de 100% (Li et al., 1994). En comparaison, aucune souris des groupes contrôles n'a survécu aux mêmes doses de MTX. Également, des souris transplantées avec la forme mutante L22Y de la DHFR et soumise à de fortes doses de TMTX ont présenté un nombre significativement plus élevé de leucocytes sanguins comparativement aux souris contrôles (Spencer et la., 1996).

De plus, des souris transplantées avec le gène muté de la DHFR F31S et porteuses de tumeurs mammaires ont montré une régression à tout le moins partielle sinon complète de leurs tumeurs après avoir été traitées au cyclophosphamide et au MTX (Zhao et al., 1997). En comparaison, les souris témoins qui n'avaient pas été transplantées ont succombé d'une sévère toxicité hématopoïétique alors que les souris non transplantées et n'ayant reçu aucun traitement de chimiothérapie sont décédées suite au développement

de leur tumeur. Le transfert de la forme mutante de la DHFR F31S est aussi en mesure de protéger des cellules souches humaines CD34⁺ contre la toxicité du MTX (Flasshove et al., 1995; Flasshove et al., 1998). Bref, le potentiel de chimio-protection du gène de la DHFR a été confirmé *in vitro* sur des lignées cellulaires murines et humaines et *in vivo* chez la souris.

5.3.2 Potentiel de sélection (DHFR)

Le potentiel de sélection pour tous les gènes de résistance dépend énormément de leur capacité à éliminer les cellules souches pouvant reconstituer le système hématopoïétique. Or, la cytotoxicité des antifolates nécessite que la cellule soit dans l'incapacité d'utiliser la thymidine extracellulaire. *In vitro*, il est facile d'avoir des conditions de culture cellulaire sans thymidine par dialyse du sérum par exemple. Toutefois, *in vivo* il n'est pas possible d'obtenir cette condition. L'efficacité cytotoxique des antifolates s'en trouve considérablement réduite. L'utilisation conjointe d'un inhibiteur de transport nucléosidique avec un antifolate *in vivo* permet de mimer les conditions artificielles favorables au milieu *in vitro*. Une étude très intéressante de Blau et al, (1996) montre l'inefficacité du MTX à éliminer les cellules souches hématopoïétiques de souris malgré sa capacité à réduire très significativement le nombre total de cellules nucléées (les cellules souches formant environ seulement 1% de cette population). Ces auteurs proposent que la forte déplétion du nombre de cellules proviendrait principalement d'une inhibition de leur formation par la différenciation des cellules souches plutôt que de l'élimination directe de ces cellules (étant en présence de thymidine extracellulaire). L'hypothèse est qu'en présence de MTX, sans être éliminées, les cellules souches seraient incapables de se différencier pour régénérer le système hématopoïétique.

Cette hypothèse est supportée par la publication d'une étude montrant le potentiel de sélection *in vivo* du TMTX lorsque utilisé conjointement avec un inhibiteur de transport nucléosidique (Allay et al., 1998). Leurs résultats très impressionnants montrent, après transplantation chez la souris du gène DHFR L22Y, le passage d'environ 15-20% de cellules sanguines exprimant la DHFR provirale à une proportion de 40 à 90% après sélection au TMTX. Dans cette même étude, des souris issues de transplantation

secondaire ont montré une forte présence de la DHFR provirale dans leurs cellules sanguines, suggérant ainsi une sélection au niveau de cellules souches. Ces résultats impressionnants n'ont pu être répétés dans une autre étude utilisant uniquement le MTX sans l'apport d'un inhibiteur nucléosidique (Havenga et al., 1999). Dans cette étude, des souris transplantées avec le gène DHFR L158P-F31S ont montré une faible sélection (une augmentation de 5-10% de leurs leucocytes sanguins après une sélection répétée au MTX (administré de façon bi-hebdomadaire pendant six mois).

En conclusion, le potentiel de sélection de la combinaison DHFR/MTX ou DHFR/TMTX comporte certaines limites. Ces limites expliqueraient peut-être pourquoi aucun essai clinique utilisant le gène de la DHFR comme marqueur de sélection n'a été publié à ce jour.

5.4 Le gène de la cytidine désaminase (CD)

La séquence complète de l'ADNc du gène humain de la cytidine désaminase (CD) a été obtenue en 1994 dans notre laboratoire (Laliberté et al., 1994). Le rôle de la CD est de convertir, par une désamination hydrolytique, la cytidine (CR) et la désoxycytidine (CdR) en uridine et en désoxyuridine, respectivement. Cette conversion assure un équilibre entre les niveaux intracellulaire de ces deux nucléosides (Camiener et Smith, 1965). La désamination des analogues de la CdR (ARA-C, dFdC et 5-AZA-CdR) par la CD résulte en une sévère sinon complète perte de leur activité pharmacologique (Chabot et al., 1983; Bouffard et al., 1993; Eliopoulos et al., 1998) (Figure 5.1). Une augmentation de l'activité de la CD est associée au développement d'une résistance in vivo à l'ARA-C (Steuart et Burke, 1971).

Des études récentes ont montré que la CD est majoritairement localisée au noyau bien qu'elle soit aussi partiellement retrouvée au cytoplasme grâce à la présence d'un peptide de localisation nucléaire situé à la portion N terminale de l'enzyme (Somasekaram et al., 1999). Bien que l'analyse structurale de la CD ait révélé la présence d'un peptide signal, très peu d'informations sont disponibles quant au site catalytique de l'enzyme. Cette rareté d'informations ne permet pas de développer des mutants de l'enzyme pouvant assurer une plus grande désamination des analogues de la CdR que ne peut le faire la forme sauvage. Le développement de tels mutants pourrait

être d'une grande importance dans le potentiel de la CD à conférer une chimioprotection. Des formes mutantes des gènes MDR, MGMT et DHFR ont déjà montré leur importance pour conférer un potentiel de résistance accru à ces gènes.

L'activité de la CD chez les cellules souches hématopoïétiques est plus de 5 fois inférieure à celle évaluée chez les leukocytes sanguins (Schroder et al., 1996). De plus, en accord avec cette observation, Momparler et Laliberté (1990) ont montré une induction de l'activité de la CD chez la lignée de cellules leucémiques HL60 après induction de leur différenciation. Ces observations supportent bien le potentiel du gène CD à conférer une résistance aux cellules souches hématopoïétiques lorsque fortement exprimé dans ces cellules.

5.4.1 Potentiel de chimioprotection (CD)

Une augmentation de la résistance aux analogues de la CdR, suite à l'expression forcée du gène de la CD dans différentes lignées cellulaires, a été démontrée (Momparler et al., 1996; Neff et Blau, 1996; Schroder et al., 1996). La possibilité de conférer une résistance aux analogues de la CdR aux cellules souches hématopoïétiques murines a aussi récemment été confirmée par Eliopoulos et al., (1998b) ainsi que Flasshove et al., (1999). Eliopoulos et al., (1998a) ont de surcroît démontré l'expression à long terme et la résistance de cellules de la moelle et de la rate contre l'ARA-C chez des souris transplantées avec le gène CD.

L'impossibilité pour la CD de désaminer les analogues de la CdR après leur phosphorylation cellulaire a mené à l'évaluation du gène de la désoxycytidine monophosphate désaminase (dCMPD) comme éventuel gène de résistance (voir Chapitre 1). La forte expression de ce gène dCMPD est également en mesure de conférer une certaine résistance aux analogues de la CdR (Schroder et al., 1998). Toutefois, la forte activité endogène de la dCMPD chez les cellules souches hématopoïétiques jumelée à la rapide phosphorylation *in vivo* des analogues de la CdR monophosphate sous leurs formes diphosphates et triphosphate suggèrent que le gène dCMPD affiche un potentiel inférieur à celui du gène de la CD pour conférer une chimioprotection.

In vitro, chez des fibroblastes transfectées pour une expression accrue de la CD et résistant aux analogues de la CdR, un inhibiteur spécifique de la CD, la 3,4,5,6-

tetrahydrouridine (THU) à une concentration de 10 μM , est en mesure de restituer la protection acquise contre ces analogues (Neff et Blau, 1996; Eliopoulos et al., 1998b). De plus, toujours à une concentration de 10 μM , la THU peut inhiber à plus de 85% l'activité de la CD provenant du cytosol de ces même cellules (Eliopoulos et al., 1998b). Ces résultats confirment que la résistance acquise aux analogues de la CdR est entièrement dépendante de l'activité accrue de la CD chez ces cellules. Un tel inhibiteur pourrait être utilisé dans la situation où des cellules cancéreuses seraient accidentellement modifiées pour l'expression à haut niveau de la CD.

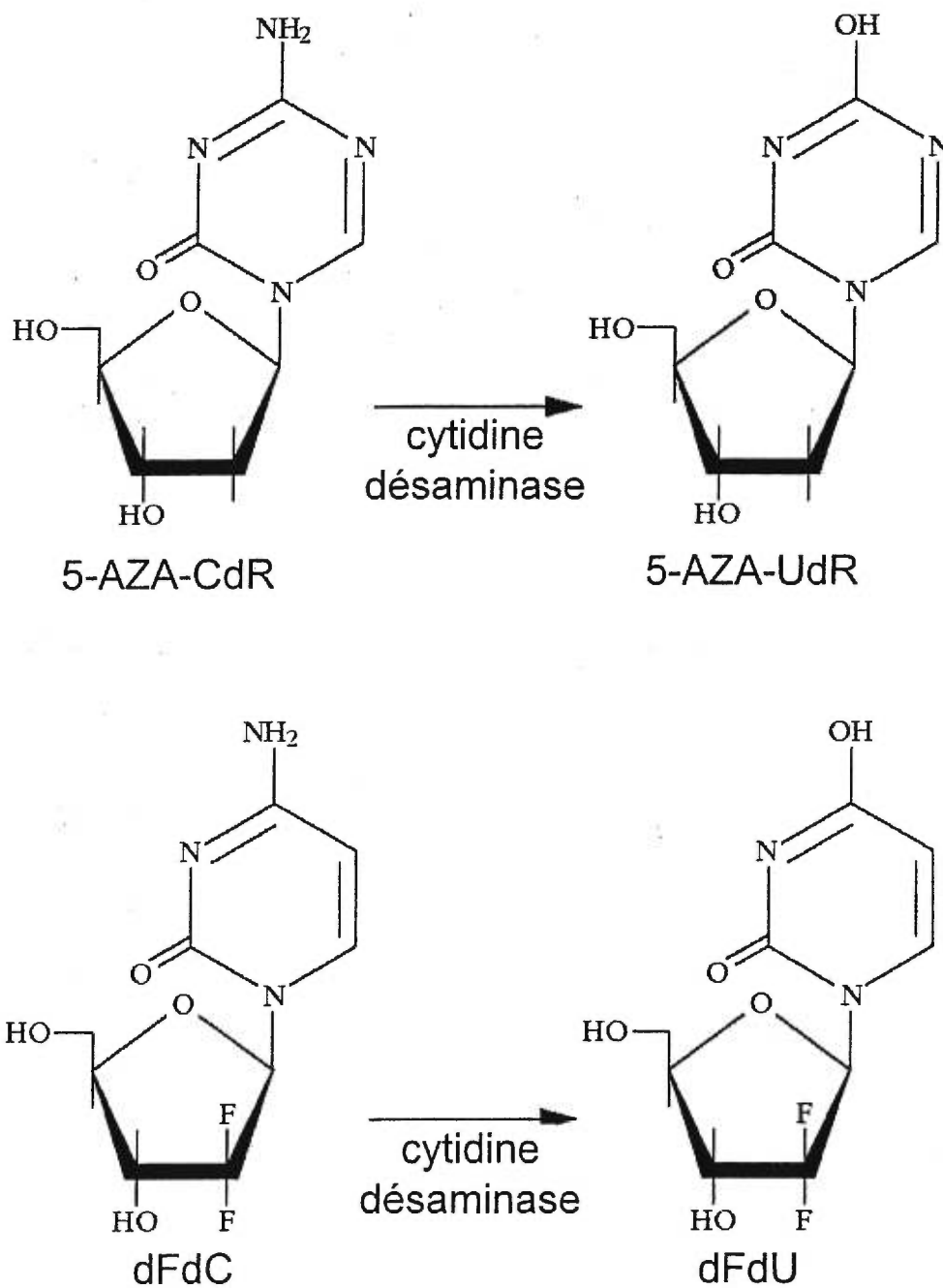


Figure 5.1 Représentation schématique du résultat de la désamination hydrolytique de la 5-AZA-CdR et de la dFdC en leurs métabolites par l'action de la CD. Notez que la même réaction se produit aussi pour le substrat naturel de l'enzyme, la CdR et l'analogue ARA-C.

Chapitre 6 : Les objectifs de la présente thèse

- 1) Construire un vecteur d'expression rétroviral bicistronique (pMFG-DHFR-IRES/CD) dérivé du MoMLV contenant deux gènes de résistance, soit le gène de la CD et celui de la DHFR F31S.
- 2) Infecter des fibroblastes transformés et des cellules primaires de moelle osseuse murines à de hauts niveaux utilisant des virions obtenus d'une lignée d'encapsulation contenant les transgènes CD et DHFR.
- 3) Déterminer si une double résistance à l'ARA-C et au MTX peut être observée chez les fibroblastes et les cellules primaires de la moelle osseuse infectées avec ces particules virales.
- 4) Construire un vecteur d'expression rétroviral bicistronique (pMSCV-CD-IRES/GFP) dérivé du MSCV contenant le gène de la CD et la protéine fluorescente verte (*green fluorescence protein*, GFP).
- 5) Infecter des cellules leucémiques ainsi que des cellules primaires de la moelle osseuse de souris avec des virions contenant la CD et la GFP et vérifier si ces cellules sont résistantes aux analogues de la CdR.
- 6) Déterminer si la proportion des cellules exprimant les transgènes CD et GFP augmente après sélection in vitro de ces cellules avec les analogues de la CdR.
- 7) Construire des Rbz de type *hammerhead* dirigés contre l'ARNm de la dCK et évaluer leur capacité à couper spécifiquement l'ARN de la dCK in vitro dans un système non-cellulaire.
- 8) Insérer les Rbz à l'intérieur de vecteurs rétroviraux bicistroniques (pAp2-Rbz-IRES/GFP) dérivé du MSCV, infecter des cellules leucémiques de souris et sélectionner des clones de cellules exprimant un haut niveau de la GFP.
- 9) Évaluer le potentiel des Rbz anti-dCK à diminuer le niveau d'ARNm et l'activité enzymatique de la dCK chez ces clones.

DEUXIÈME PARTIE
PRÉSENTATION DES MANUSCRIPTS

Chapitre 7 : Article 1

Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicistronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate.

Christian M Beauséjour¹, Ngoc Loan Oanh Le¹, Sylvain Létourneau², Denis Cournoyer² and Richard L. Momparler¹.

1 Département de pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche pédiatrique, Hopital Ste-Justine, and 2 Departments of Medicine and Oncology, Montreal General Hospital, Montréal, Quebec, Canada.

Publié dans Human Gene Therapy 9 :2537-2544 (1998)

Running Title: Bicistronic vector and double resistance to anticancer drugs.

Correspondence: Dr. R.L. Momparler, centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada. tel. 345-6140, fax 345-4801, email momparlr@ere.umontreal.ca.

Abstract

The transfer of a drug resistance gene into hematopoietic cells is an approach being investigated to overcome the problem of myelosuppression produced by anticancer drugs. Chemotherapeutic agents are often given in combination in order to increase their effectiveness. Consequently, there is an advantage to design vectors for gene transfer that are capable of expressing two drug resistance genes. We have constructed a bicistronic retroviral vector, MFG-DHFR-IRES/CD, which contains the mutated human dihydrofolate reductase (DHFR) cDNA with a phenylalanine to serine substitution at codon 31 (F31S) and the human cytidine deaminase (CD) cDNA. Murine fibroblast and hematopoietic cells were transduced with this vector and evaluated for their resistance to methotrexate (MTX) and cytosine arabinoside (ARA-C). The transduced fibroblast cells showed high levels of resistance to MTX and to ARA-C as determined by a clonogenic assay. Using enzymatic assays, we observed a coordinate increase in resistance to MTX and DHFR enzyme activity following an ARA-C selection. In addition, MTX selection produced an increase in CD enzyme activity and ARA-C resistance. Murine hematopoietic cells transduced with the bicistronic vector also showed drug resistance to both MTX and ARA-C. Interestingly, the double gene construct conferred an equivalent level of drug resistance compared to single gene vectors bearing only CD or DHFR genes in the hematopoietic cells. These results demonstrate the potential of the MFG-DHFR-IRES/CD vector to confer drug resistance to both MTX and ARA-C and may have future application in chemoprotection of normal hematopoietic cells in patients with cancer.

Overview summary

Combination chemotherapy for cancer is used often to overcome the problem of drug resistance. Since most anticancer agents produce bone marrow toxicity, the combination of these agents at intensive doses can result in severe myelosuppression. An approach to overcome this problem is by the transfer into normal bone marrow progenitors cells of drug resistance genes. We have constructed a retroviral bicistronic vector capable of expressing two drug resistance genes, cytidine deaminase and a mutated dihydrofolate reductase, to protect transduced hematopoietic cells from the combined effects of cytosine nucleoside analogs and antifolate antagonists, respectively. We showed that transduced murine fibroblast and myeloid progenitor cells acquired significant resistance to cytosine arabinoside and methotrexate. Our data provides a rationale for the use in a *in vivo* model in which transduced bone marrow cells will be protected against the toxic side effects of combination chemotherapy with cytosine nucleoside analogs and antifolates.

Introduction

Intensive treatment with most anticancer drugs produces severe myelosuppression as their major side effect. Introduction of drug resistance genes into normal bone marrow stem cells is an approach to confer chemoprotection (reviewed by Banerjee et al., 1994a; Koc et al., 1996; Rafferty et al., 1996). The potential of chemoprotection is actively under current investigation for the following drug-resistance genes: multidrug resistance (MDR) (O'Shaughnessy et al., 1994; Sorrentino et al., 1992; Ward et al., 1994), dihydrofolate reductase (DHFR) (Flasshove et al., 1995; Li et al., 1994; Zhao et al., 1994; Zhao et al., 1997), O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (Allay et al., 1995; Moritz et al., 1995), glutathione S-transferase (Létourneau et al., 1996), multidrug-associated protein (D'Hondt et al., 1997) and cytidine deaminase (CD) (Momparler et al., 1996; Eliopoulos et al., 1996).

Since combinations of anticancer agents are commonly used in cancer therapy to increase clinical effectiveness, it is of interest to investigate the potential of an expression vector that can confer chemoprotection to two different classes of anticancer drugs. Retroviral gene constructs in which separate genes are expressed from two independent promoters have been unreliable because of negative interactions between promoters that may lead to markedly reduced expression of one of the genes (Emerman and Temin, 1984; Emerman and Temin 1986; Olsen et al., 1993). Another approach is to use the encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site (IRES) to produce a bicistronic vector. These bicistronic vectors circumvent promoter/enhancer interference's by coexpressing the two genes from a single initiated transcript. (Ghattas et al., 1991; Jang et al., 1989; Morgan et al, 1992). Bicistronic vectors containing IRES have been designed to confer drug resistance to MDR drugs and alkylating agents (Suzuki et al., 1997) and MDR drugs and antifolate drugs (Galipeau et al., 1997).

In this report we have designed a bicistronic retroviral vector with an IRES containing the human DHFR gene and the human CD gene. In the vector, MFG-DHFR-IRES/CD, the translation of the upstream gene (DHFR) is cap dependent while the translation of the second gene (CD), downstream the IRES element, is cap independent. This should allow efficient expression of both genes. DHFR confers drug resistance to antifolate drugs therapy whereas CD confers resistance to nucleoside analogues such as

cytosine arabinoside (ARA-C), 2',2'-difluorodeoxycytidine (dFdC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) (Eliopoulos et al., 1996; Momparler et al., 1996). Both classes of agents are used in leukemia and solid tumors therapy (Lie and Slordahl, 1985; Momparler et al., 1997; Shepherd, 1995).

Since a mutated form of the DHFR with decreased binding to methotrexate (MTX) shows greater *in vitro* chemoprotection (Banerjee et al., 1994b; Ercikan-Abali et al., 1996), we substituted a serine in place of phenylalanine at codon 31 (F31S) in human DHFR cDNA. Using the MFG-DHFR-IRES/CD vector, we were able to demonstrate high levels of drug resistance to both ARA-C and MTX and highly efficient gene expression in transduced cells. This bicistronic vector may be a useful tool for chemoprotection in cancer therapy.

Materials and Methods

Cell culture and clonogenic assays

The retrovirus packaging cell line GP+*env*AM12 and GP+E86 (a gift from Dr A. Bank, Columbia University, New York) and the NIH 3T3 mouse fibroblast cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) and 5 ug/ml gentamicin at 37°C in a 6% CO₂ incubator. The clonogenic assays were performed by adding 2 ml of medium containing 200 cells per well in Costar 6-well culture dishes. The next day, graded concentrations of ARA-C and MTX were added for 72 hours and 12 days respectively. In both cases, the total time of incubation was 12 days. For ARA-C assays, the dishes were rinsed and fresh medium added for the subsequent 9 days after drug treatment. For MTX assays, 10% dialyzed heat inactivated FBS was used.

Vector construct

The pMFG-CD (Momparker et al., 1996) expression vector was used as the backbone for the construction of the pMFG-DHFR-IRES/CD (Fig. 1). The CD cDNA was first removed using a double digestion with *Nco I* and *Bam HI* in order to introduce the ser31 mutated human DHFR cDNA which was obtained by RT-PCR amplification and site-directed mutagenesis. The DHFR was first subcloned in the pRC-CMV (Invitrogen, San Diego, California) and mutagenesis done by PCR using four different primers. Primers used for the amplification from the new pRC-DHFR ser31 were; 5'-CCCATCGATACCCATGGTTGGTTCGCTA-3' and 5'-TTTCGCGGATCCTTTAATCATTCTTCTC-3', the *Nco I* and *Bam HI* restriction sites being introduced at the underlined positions. Following a *Nco I/Bam HI* digestion and ligation, pMFG-DHFR ser31 was obtained. This plasmid was then sequenced and the presence of the ser31 mutation confirmed (using Pharmacia Automatic DNA sequencer with internal primers and fluoro-dATP).

The IRES/CD, 1084 base pair (bp) fragment, was constructed by PCR using two different templates and three amplification reactions. First, the IRES fragment

corresponding to the IRES element of the encephalomyocarditis virus (EMCV) was obtained by PCR amplification from the pHaMAIRES (gift from S. Kane, City of Hope National Medical Center, California) using the following primers; 5'-TACAGAGGATCC/CCGCGGTATCTGTTTAAACAG-3' and 5'-TCTGGGCCATATTATCATCGTG-3' (636 bp), the underlined sequences being respectively the *Bam* *HI* restriction site, the *Sac* *II* restriction site and part of 5' coding region of the CD. Second, the CD fragment was obtained by PCR amplification from pBS-CD previously described (Laliberté and Momparler, 1994) using two primers: 5'-CACGATGATAATATGGCCCA GAAGCGT-3' and 5'-TGGGCAGGATCCGGCTGTCACT-3' (470 bp) where the underlined sequences represent the 3' end of the IRES fragment and the *Bam* *HI* restriction site respectively. The complete IRES/CD fragment originates from a PCR amplification using as templates the amplified sequence of the IRES and CD. The 22 base pairs homology between the two templates allows an efficient amplification when using the 5' primer of the IRES amplification and the 3' primer of the CD amplification. The IRES/CD fragment was then purified, digested with *Bam* *HI* and ligated in pMFG-DHFR ser31 previously linearized at the *Bam* *HI* site. The entire amplified DHFR-IRES/CD construct was then confirmed by sequencing (by the Pharmacia Automatic DNA sequencer with internal primers and fluoro-dATP).

Retroviral transduction of fibroblast cells

For three consecutive days, the medium of flasks containing $1-2 \times 10^5$ 3T3 cells was replaced for a 6 hour incubation with medium containing 8 ug/ml polybrene and filtered-supernatant from a transfected ARA-C resistant producer clone GP+*env*AM12 vMFG-DHFR-IRES/CD (titer 3.5×10^3 cfu/ml) . The supernatant from the parental GP+*env*AM12 cells was used for mock infection of the control 3T3 cells. Fresh medium was added between and after the three incubations. On day 5, the cells were trypsinized and the selection started. Two transduced 3T3 (t3T3) clones were selected (3T3-clone/2 and 3T3-clone/8) among 8 clones randomly isolated following a 4 day selection with 5 μ M ARA-C. The t3T3 MTX and ARA-C selected cell populations were produced from a polyclonal population of resistant cells previously selected with 500 nM MTX and 2.5

μM ARA-C for 8 days respectively. Both transfected and untransfected 3T3 cells has similar growth rates.

Southern blot analysis

The Southern blot was performed as described by Galipeau et al., 1997. The genomic DNA (5 μg) from mock and transduced 3T3 cells was digested with *Nhe I* and probed with ^{32}P -labeled CD probe.

Enzyme assays

Cytosol aliquots were prepared as follow; 2 to 5 X 10^7 monolayer cells were trypsinized, centrifuged and washed once in phosphate buffered saline (PBS). They were then centrifuged and resuspended in 100 μl of 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 5 mM dithiothreitol. Cell membranes were than lysed following three sets of freezing and thawing. The resulting mixture was centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4°C . The supernatant (cytosol) molarity was then adjusted to 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and the protease inhibitors leupeptine, aprotinine and pepstatine (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec) were added to a final concentration of 1 ng/ μl . CD activity was determined by measuring the conversion of ^3H -cytidine to ^3H -uridine following a 30 minute incubation at 37°C as previously described (Laliberté and Momparler, 1994). The DHFR enzyme assays were performed at room temperature with a Gilforf Instruments 260 spectrophotometer in a reaction mixture containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM KCl, 50 μM NADPH and H_2 -folate (Sigma, Oakville, Ontario) and water in a final volume of 1 ml (Schweitzer et al., 1989). The reaction was started by adding 10 μl of the enzyme dilution. The DHFR enzyme activity was obtained by measuring for 25 minutes the decrease in absorbance at 340 nm which correlates with the conversion of H_2 -folate to H_4 -folate and NADPH to NADP^+ (Osborn et Huennekens, 1958). The extinction coefficient used for the combined absorbance change was $12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Bertino et al., 1965).

Murine bone marrow transduction and CFU-C assays.

Bone marrow cells were collected from C3H female mice (Charles River Canada, St-Constant, Quebec) treated with 150 mg/kg 5-fluorouracil 4 days before. The cells were then cocultivated for 72 hrs with equivalent numbers of producer cells (5×10^6) irradiated the night before with 2000 rads. The producer cells originate from a pool of GP+E86 clones transduced with viral particles collected from previously transduced GP+*env*AM12 vMFG-CD, vMFG-DHFR or vMFG-DHFR-IRES/CD (titer 1×10^5 cfu/ml) and resistant to 5 μ M ARA-C or 100nM MTX (for MFG-DHFR). The viral titers of the producer cells were sufficient to transduce >90% of target cells as determined by PCR assay. Mock transduction is from parental GP+E86 packaging cells. The cocultivation medium contained 10 mg/ml BSA, 0.3 mg/ml transferrin (Boehringer Mannheim), 8 μ g/ml polybrene, 10% WEHI-3B and HTB-9 conditioned medium, 20 % FBS in alpha-MEM and 5 μ g/ml gentamycin (Sigma). Transduced bone marrow cells were then collected, counted and $2-5 \times 10^4$ cells/ml were plated in 1% methylcellulose in alpha-MEM supplemented with 30% FBS, 1% mouse spleen conditioned medium (Stem cell Technologies, Vancouver, Canada), 1% BSA and 10^{-4} M 2-mercaptoethanol. Drug resistance was measured as the percentage of colonies surviving in presence of drug. Transduction rates were determined by PCR assay on CFU-C grown in absence of drug using vector specific primers. Mock cells were negative by the PCR assay. For MTX assays, the FBS used was pretreated with thymidine phosphorylase (1U/ml) for 4 hours at 37°C to prevent the MTX-treated cells to be rescued by thymidine. The colonies were scored after 7-9 days of growth.

Results

DHFR and CD enzyme activities in 3T3 cells transduced with vMFG-DHFR-IRES/CD

3T3 cells transduced with vMFG-DHFR-IRES/CD showed a significant increase in DHFR and CD enzyme activities (Table 1). Without any selection, the transduced population showed a 1.3- and 100-fold increase in DHFR and CD activities, respectively, as compared to the mock 3T3 cells. After selection with ARA-C (8 days in 2.5 μ M), the population showed a 2- and >150-fold increase in DHFR and CD activities, respectively, as compared to mock 3T3 cells. Selection with MTX (8 days in 500 nM) produced a greater increase in expression of DHFR and CD activities as compared to the population selected with ARA-C. The DHFR and CD activity showed a 5.5- and >350-fold increase, respectively, in the population selected with MTX as compared to mock 3T3 cells. Two clones were isolated from the transduced population after selection with ARA-C (4 days in 5 μ M). Both clones showed a marked increase in both DHFR and CD activities (Table 1).

Drug resistance to MTX and ARA-C in transduced 3T3 cells

In order to determine the level of resistance to MTX and ARA-C produced by our bicistronic vector (MFG-DHFR-IRES/CD), clonogenic assays were performed on two 3T3 fibroblast clones isolated after transduction and selection with ARA-C. At a concentration of MTX that produced >90% loss of clonogenicity in the mock 3T3 cells, the transduced cells showed almost no loss of clonogenicity (Fig. 2). In addition, at a concentration of ARA-C that produced >90% loss of clonogenicity of the mock 3T3 cells, the two clones showed more than 90% survival in clonogenic assays (Fig. 2). At a higher concentration of either MTX or ARA-C, clone 8 was found to be more resistant than clone 2. This difference is associated with a higher level CD and DHFR enzyme activities in clone 8 as compared to clone 2 (Table 1) and to a higher level of the bicistronic vector mRNA in clone 8 as determined by Northern blot (data not shown).

A transduced population of 3T3 cells was tested for drug resistance with and without preselection with either MTX or ARA-C. In a clonogenic assay, the 3T3 cells without preselection showed significant drug resistance to increasing concentrations of

MTX (Fig. 3b), but not to increasing concentrations of ARA-C (Fig. 3a). Prior selection of the transduced cells with 500 nM MTX produced a significant enhancement of resistance to this antifolate and to ARA-C as compared to the unselected transduced cells. On the other hand, a 2.5 μ M ARA-C selection only produced a slight enhancement of resistance to MTX and ARA-C as compared to the unselected cells. Southern blot analysis of the mock and transduced 3T3 cells showed the expected full length 3.65 kb for DHFR-IRES/CD fragment between the LTR's of the MFG vector with no signs of rearrangement (Fig. 4). These results suggest that the CD gene was not deleted as a explanation for the low ARA-C resistance observed.

Chemoprotection of murine bone marrow cells

We also determined if our bicistronic vector would confer drug resistance to both MTX and ARA-C in murine bone marrow cells and if it would be as efficient as the single gene vectors. Following cocultivation of the bone marrow cells with producer cells, we observed that over 90% of the clonogenic progenitor cells were transduced with either vMFG-CD, vMFG-DHFR or vMFG-DHFR-IRES/CD as determined by PCR on isolated CFU-C colonies (10 to 12 for each producers) grown without any drugs (see Methods). Clonogenic assays showed a 10 to 20 fold increase in ARA-C LD₅₀ for both MFG-CD and MFG-DHFR-IRES/CD transduced CFU-C cells when compared to the mock and MFG-DHFR transduced CFU-C cells (Fig. 5a). In a similar experiment, MFG-DHFR and MFG-DHFR-IRES/CD transduced CFU-C cells showed >50-fold increase in MTX LD₅₀ as compared to mock and MFG-CD transduced CFU-C (Fig. 5b). Furthermore, the chemoprotection conferred by the bicistronic vector was found to be as effective as the one conferred by the single gene vector.

Table 7.1 DHFR and CD enzyme activities of mock and vMFG-DHFR-IRES/CD transduced 3T3 cells.

Cell Line	DHFR activity (units/mg)	CD activity (units/mg)
Mock-transduced 3T3	2.2 ± 0.5	0.3 ± 2
t3T3 No selection	2.9 ± 0.2	30.7 ± 2.5
ARA-C selection	4.4 ± 0.1	52.9 ± 2.5
MTX selection	12.2 ± 0.5	115 ± 7
3T3-clone/2	14.8 ± 1.3	116 ± 5
3T3-clone/8	25.7 ± 1.4	359 ± 10

Values presented are means ± SD of three to six determinations.
Abbreviation: t3T3, transduced 3T3 cells.

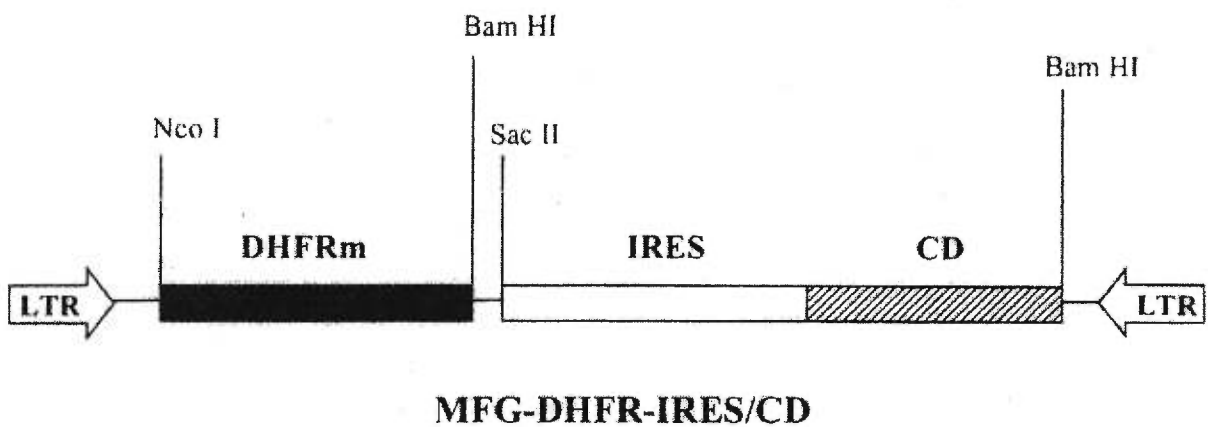


Figure 7.1 Retroviral MFG-DHFR-IRES/CD vector structure is based on the Moloney murine leukemia virus. This bicistronic vector contains upstream from the IRES element the DHFR cDNA mutated (DHFRm) at codon 31 for a phenylalanine to a serine substitution. The CD cDNA was cloned downstream from the IRES element.

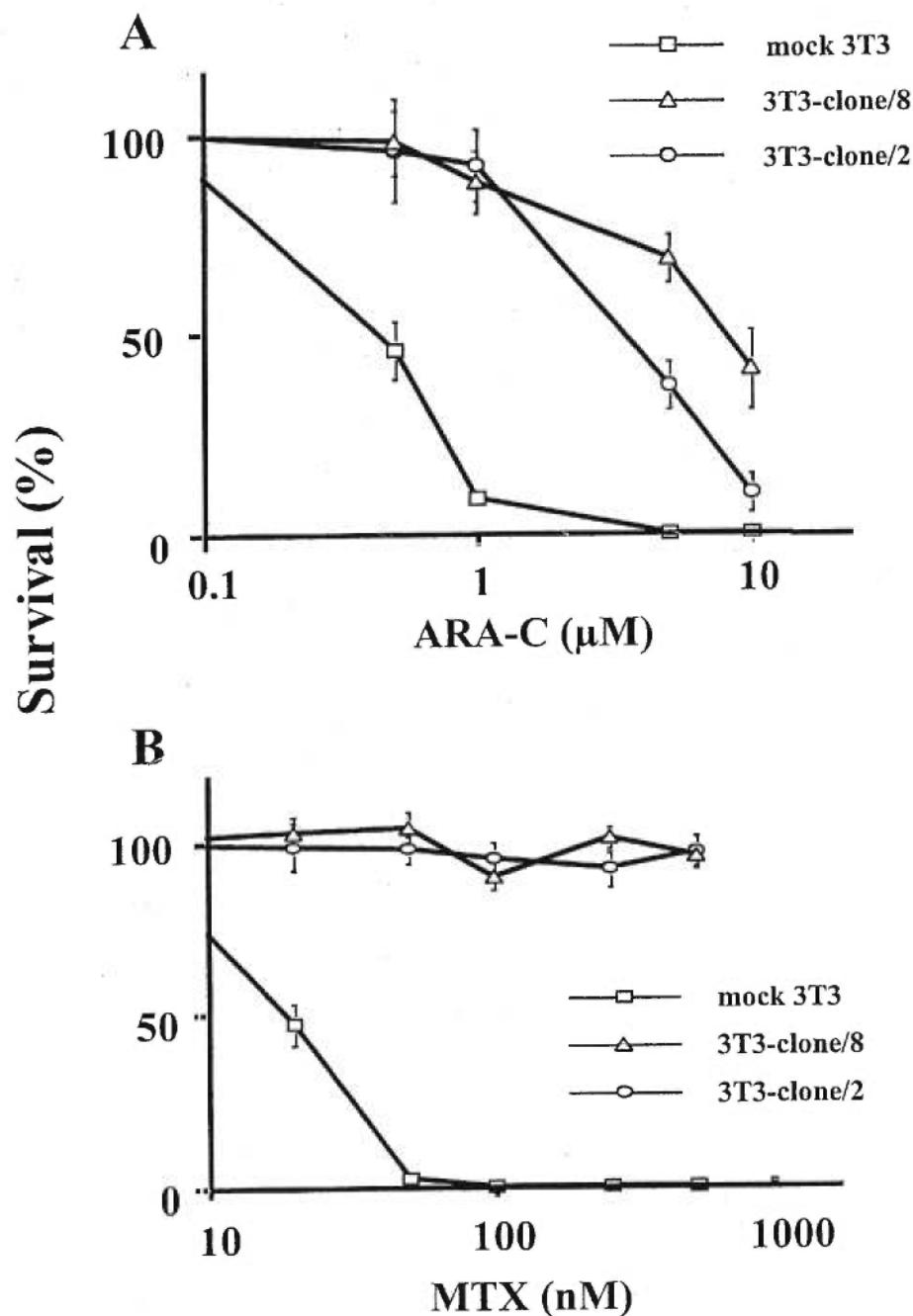


Figure 7.2 Clonogenic survival in ARA-C and MTX concentration of two clones (3T3-clone/2 or 8) which were selected for 4 days in 5 μM ARA-C from a mixed population of transduced 3T3 cells with vMFG-DHFR-IRES/CD. The cells were incubated 3 and 12 days in presence of ARA-C (A) and MTX (B), respectively. Colonies were counted after a 12 day incubation and % survival is expressed as the ratio of colonies counted in the presence of drug / colonies counted in the absence of drug. The average \pm SD of three to four experiments is shown.

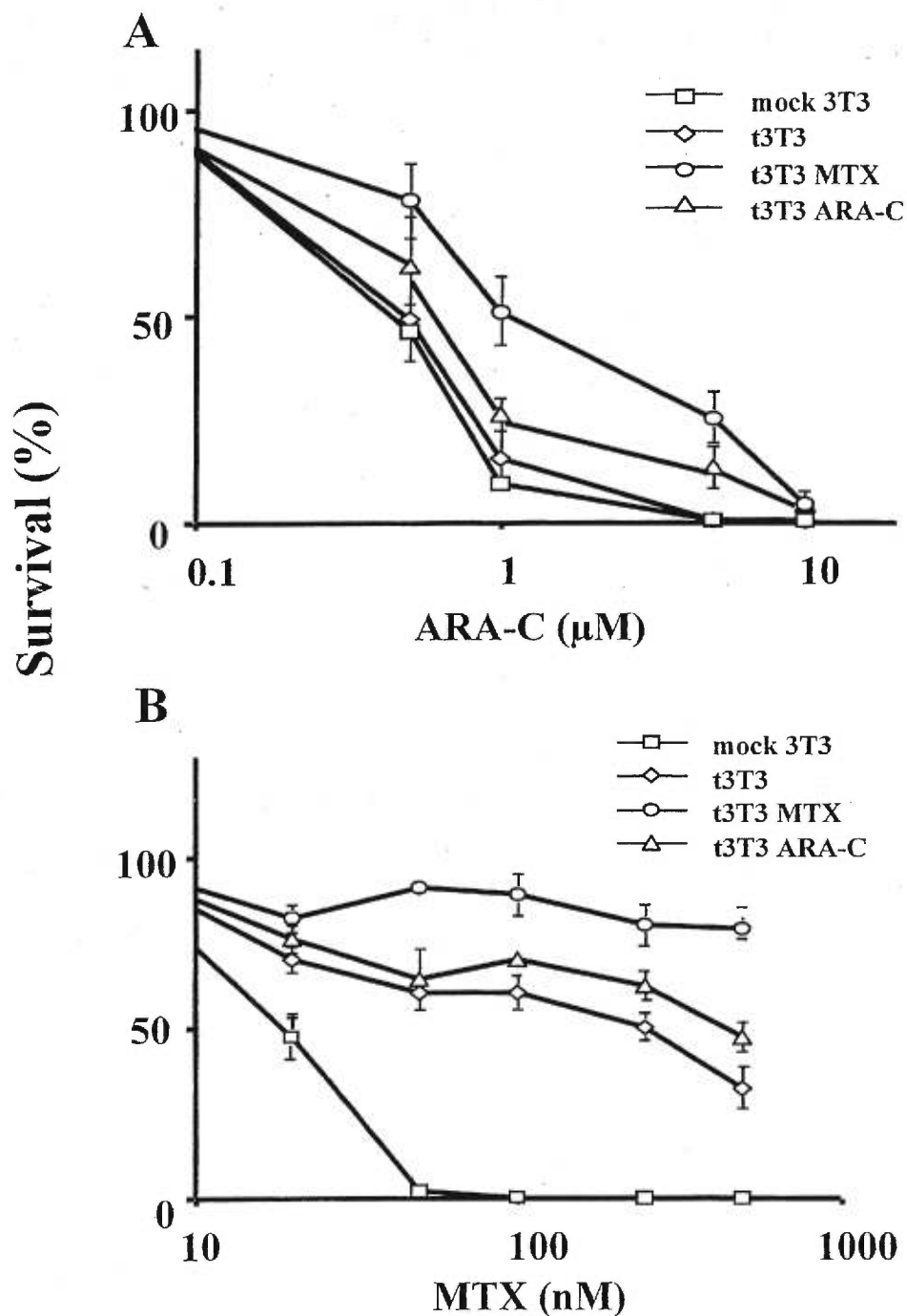


Figure 7.3 Clonogenic survival at different concentrations of ARA-C and MTX of a mixed population of transduced 3T3 (t3T3) cells with vMFG-DHFR-IRES/CD. t3T3 ARA-C and MTX originate from a preselection of the mixed population with 2.5 μM ARA-C and 500nM MTX for 8 days respectively. The cells were incubated 3 and 12 days in presence of ARA-C (A) and MTX (B), respectively. Colonies were counted after a 12 day incubation and % survival is expressed as the ratio of colonies counted in the presence of drug / colonies counted in the absence of drug. The average \pm SD of three to four experiments is shown.

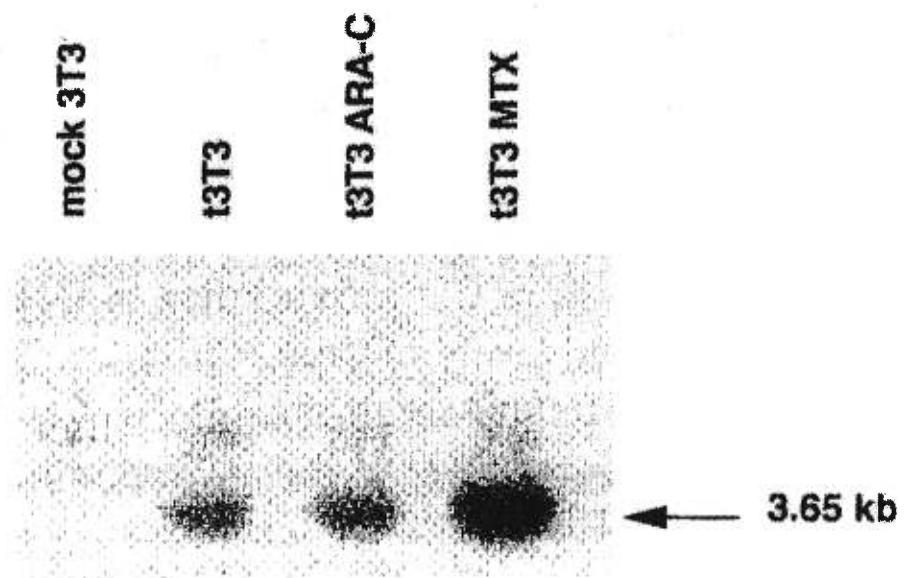


Figure 7.4 Southern blot hybridization of 5 μ g genomic DNA from each indicated cell line previously digested with *Nhe I* and probed with the full-length CD cDNA probe. The t3T3 ARA-C and MTX population originate from a 8 day selection in 2.5 μ M ARA-C and 500 nM MTX respectively. As expected, the proviral DHFR-IRES/CD fragment was revealed at 3.65 kb.

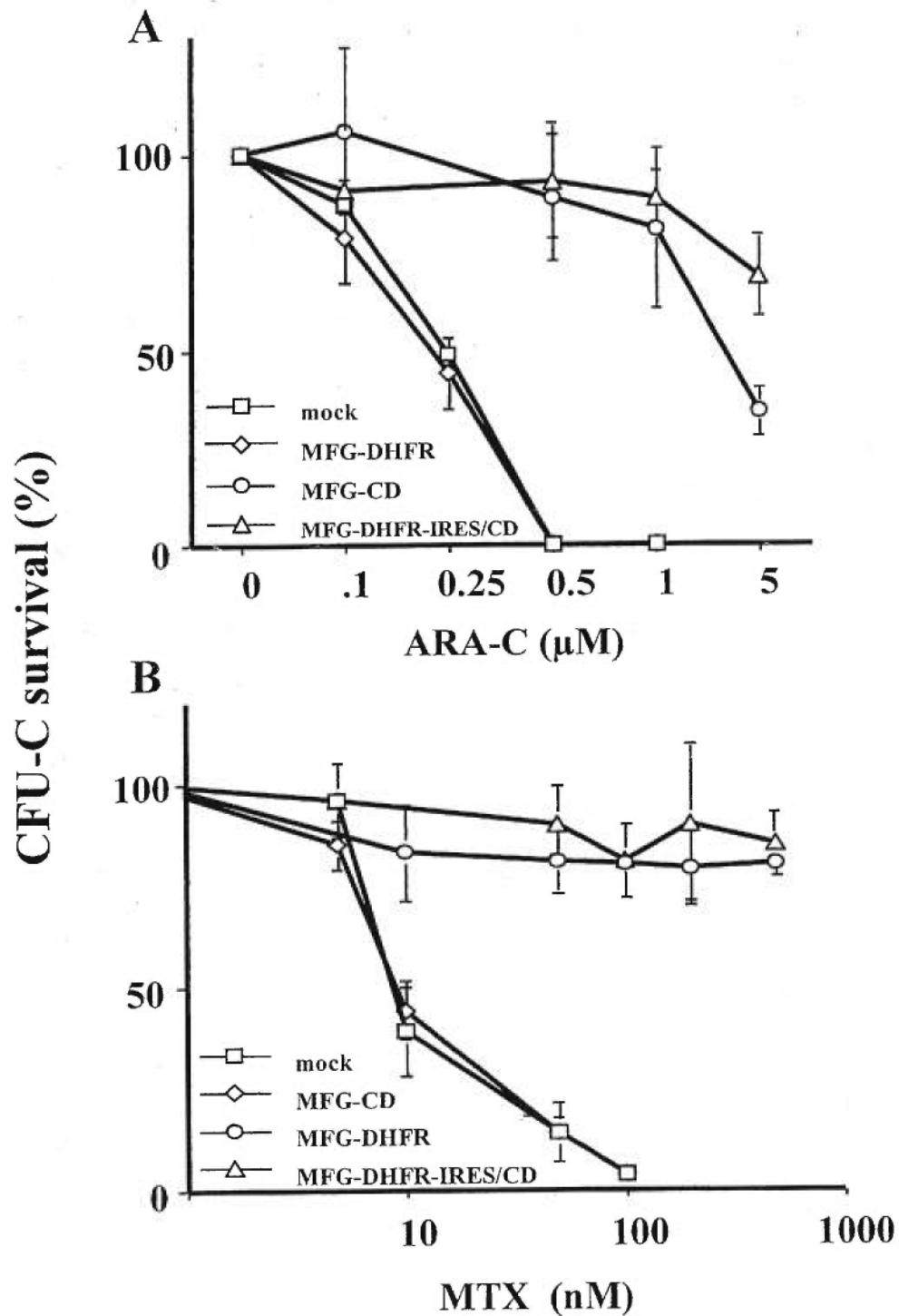


Figure 7.5 Survival of transduced CFU-Cs at different concentrations of ARA-C (A) or MTX (B). Mock, vMFG-DHFR, vMFG-CD and vMFG-DHFR-IRES/CD transduced murine bone marrow cells were plated in 1% methylcellulose (as described in Materials and Methods). Colonies were counted after 7 to 9 days of incubation and % survival expressed as the ratio of colonies counted in the presence of drug / colonies counted in the absence of drug. The average \pm SD of three experiments is shown.

Discussion

Several different types of drug-resistant genes have been used in single gene vectors to confer resistance to anticancer agents to overcome their hematopoietic toxicity (Banerjee et al., 1994a; Koc et al., 1996; Rafferty et al., 1996). Since drug combinations are commonly used treatment, it would be useful to design vectors that confer drug resistance to two different classes of antineoplastic agents. Antifolates and cytosine nucleoside analogues are used in both leukemia and solid tumor therapy. The myelosuppression produced by these agents limits the dose-intensity that can be used clinically to increase their efficacy. It has been reported that bicistronic vectors can confer in target cells *in vitro* drug resistance to MDR drugs and antifolates or alkylating agents (Suzuki et al., 1997; Galipeau et al., 1997). In order to overcome the hematopoietic toxicity problem produced by antifolates and cytosine nucleoside analogues, we have designed a bicistronic vector containing the human DHFR (F31S) and CD genes.

Our objective was to demonstrate that the MFG-DHFR-IRES/CD vector produced adequate expression of both drug resistance genes in order to confer protection against cytotoxic doses of MTX or ARA-C. Enzyme assays of cells transduced with this vector showed a significant increase in both DHFR and CD activities (Table 1). Prior selection of the transduced cells with MTX or ARA-C resulted in a greater enhancement of the activity of these two enzymes. Clonogenic assays performed on two clones of transduced cells that were selected with ARA-C showed that they were both almost completely resistant to cytotoxic concentrations of either MTX or ARA-C that reduced the survival of non-transduced cells to <10% (Fig. 2). In this study, we have shown for the first time that coexpression, from a bicistronic vector, of the human DHFR (F31S) and the human CD conferred resistance to both MTX and ARA-C.

Clonogenic assays showed that selection with MTX was seemingly more effective than selection with ARA-C with respect to the level of drug resistance (Fig. 3). The transduced cells selected with MTX showed a greater relative increase in resistance to ARA-C than the increase in resistance to MTX produced by selection with ARA-C. These findings correlate with the results of enzyme assays which showed a 2 to 3-fold greater increase in DHFR and CD activity after MTX selection as compared to the

increase in enzyme activity after ARA-C selection (Table 1). Moreover, as compared to the parental 3T3 cells, there was a much greater increase in CD activity than in DHFR activity. This result suggests that it takes a higher relative increase in CD activity than in DHFR activity to get comparable levels of drug resistance. This could be attributed to the different mechanisms of action of these analogues and to the enhanced level of resistance produced by the mutated DHFR form. The differences in drug resistance could also be due to the different metabolism of MTX as compared to ARA-C. The reason why ARA-C was less efficient than MTX as a selection agent is not known. Our hypothesis is that the stringency of the selection used was not the same for the two drugs. The concentrations used were approximately 1 and 5 times the LD₁₀₀ for ARA-C and MTX respectively in 3T3 cells. It is also suggested that the use of thymidine-free serum in the colony assays with MTX enhanced the cytotoxic action of this antifolate since thymidine rescue could not take place.

Since the target cell for chemoprotection in cancer therapy is the hematopoietic cell we performed gene transfer experiments with murine marrow cells. Interestingly, we found that murine bone marrow cells transduced with our bicistronic vector showed a similar level of drug resistance to either MTX or ARA-C than the one transduced with the single gene vectors (Fig. 5). In a bicistronic construct, the first gene is usually expressed at a higher level (Sugimoto et al., 1994; Sugimoto et al., 1995). This position dependent differential expression is even more noticeable when the size of the gene upstream to the IRES is important. The very high level of drug resistance conferred to murine hematopoietic cells by our bicistronic vector indicates that we obtained very efficient transduction and expression of the drug-resistance genes in these cells. It should be pointed out that in the colony assays with the murine marrow cells the drugs were present continuously and not for a defined interval as performed in the assays with the fibroblast cells. This explains, in part, the differences in the survival curves between these different cell types (Figs. 3 and 5). Furthermore, the reason why marrow cells have a greater increase in IC₅₀ to ARA-C than preselected population of 3T3 cells can be explained by the fact that if one compares the intrinsic resistance of mock 3T3 cells with the mock marrow cells, the mock 3T3 cells showed more resistance to ARA-C, even when exposed continuously to this analogue (data not shown). An additional explanation

is that the 3T3 cells were infected with low titer virions as compared to the higher titer used to infect the marrow cells. This could have resulted in a greater number of proviral sequences integrated into the genome of the marrow cells as compared to the 3T3 cells and perhaps greater CD expression.

In conclusion, we have demonstrated for the first time that it is possible by gene transfer with a two-gene vector to confer chemoprotection against cytotoxic effects of MTX or ARA-C. Our results clearly demonstrate this potential by the use of a bicistronic retroviral vector expressing both the DHFR (F31S) and the CD genes. Furthermore, the very effective IRES/CD cassette could be used in future experiments in which the DHFR gene can be replaced by other therapeutic genes.

The rationale to use antifolates in combination with cytosine analogues in cancer therapy is supported by the reports of a synergistic antineoplastic activity of the MTX-ARA-C combination against neoplastic cell lines (Edelstein and Valeriote, 1985; Edelstein et al., 1975; Hoovis et al., 1973; Cadman and Eiferman, 1979). The interaction between these two agents was schedule-dependent. It is the convention in cancer chemotherapy to use a combination of different drugs, each of which is active against the specific tumor, to overcome the problem of drug resistance which develops rapidly when only a single agent is used. Current clinical protocols use MTX for the treatment of breast cancer in combination with other agents (Rivkin et al., 1994). A very recent report has shown that high dose ARA-C shows promising activity in metastatic breast cancer (Czaykowski et al., 1997). The cytosine nucleoside analogue, 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine), also shows activity in advanced breast cancer (Possinger, 1995). We have reported that 3T3 cells containing the CD transgene showed drug resistance to both these cytosine nucleoside analogues (Eliopoulos et al., 1998). These studies suggest that advanced breast cancer would be an interesting target disease to use a clinical protocol consisting of chemoprotection using the DHFR-IRES/CD vector and intensive therapy with antifolate drugs and cytosine nucleoside analogues. Moreover, another interesting cytosine nucleoside analogue to use in combination with antifolate drugs is 5-Aza-CdR, an agent that shows interesting clinical activity in lung cancer (Momparker et al., 1997) and will undergo clinical trial for metastatic breast cancer in the near future.

Acknowledgments

We thank Dr. Jacques Galipeau for his comments on the manuscript. This work was supported by a grant (MT-13754) from the Medical Research Council of Canada. C.M.B. was supported by a studentship from the telethon de la recherche sur les maladies infantiles.

References

- ALLAY, J.A., DUMENCO, L.L., KOC, O.N., LIU, L. and GERSON, S.L. (1995). Retroviral transduction and expression of the human alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells. *Blood* **85**, 3342-3351.
- BANERJEE, D., ZHAO, S.C., LI, M-X., SCHWITZER, B.I., MINEISHI, S. and BERTINO, J.R. (1994a). Gene therapy. Utilizing Drug Resistance Genes: A Review. *Stem Cells* **12**, 378-385.
- BANERJEE, D., SCHWEITZER, B.I., VOLKENANDT, M., LI, M-X., WALTHAM, M., MINEISHI, S., ZHAO, S-C. and BERTINO, J.R. (1994b). Transfection with a cDNA encoding a Ser31 or Ser34 mutant human dihydrofolate reductase into Chinese hamster ovary and mouse marrow progenitor cells confers methotrexate resistance. *Gene* **139**, 269-284.
- BERTINO, J.R., PERKINS, J.P. and JOHNS, D.G. (1965). Purification and properties of dihydrofolate reductase from ehelich ascites carcinoma cells. *Biochemistry* **4**, 839-846.
- CADMAN, E. and EIFERMAN, F. (1979). Mechanism of synergistic cell killing when methotrexate precedes cytosine arabinoside. *J. Clin. Invest.* **64**, 788-797.
- CZAYKOWSKI, P.M., SAMUELS, T., AND OZA, A. (1997). A durable response to cytarabine in advanced breast cancer. *Clin. Oncol.* **9**, 181-183.
- D'HONDT, V., CARUSO, M. and BANK, A. (1997). Retrovirus-mediated gene transfer of the multidrug-associated protein cDNA protects cells from chemotherapeutic agents. *Human Gene Ther.* **8**, 1645-1751.
- EDELSTEIN, M., VIETTI, T. and VALERIOTE, F. (1975). The enhanced cytotoxicity of combination of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine and methotrexate. *Cancer Res.* **35**, 1555-1558.

EDELSTEIN, M. and VALERIOTE, F. (1985). Cytosine arabinoside in experimental combination therapy. *Seminars in Oncol.* **12**, No 2, 75-83.

ELIOPOULOS, N., BOVENZI, V., MOMPARLER, L.F., COURNOYER, D. and MOMPARLER, R.L. (1996). Gene transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells confers resistance to cytosine arabinoside, 5-aza-2'-deoxycytidine and 2,2'-difluorodeoxycytidine. 9th NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy. *Ann Oncol.* **7**, suppl 1, 58.

ELIOPOULOS, N., COURNOYER, D. AND MOMPARLER, R.L. (1998). Drug Resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-Difluorodeoxycytidine and Cytosine Arabinoside Conferred by Retroviral-Mediated Transfer of Human Cytidine Deaminase cDNA into Murine Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (in press).

EMERMAN, M. and TEMIN, H.H. (1984). Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* **39**, 459-467.

EMERMAN, M. and TEMIN, H.H. (1986). Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors. *Mol. Cell Biol.* **6**, 792-800.

ERICKMAN-ABALI, E.A., MINEISHI, S., TONG, Y., NAKAHARA, S., WALTHAM, M.C., BANERJEE, D., CHEN, C., SADELAIN, M. and BERTINO, J.R. (1996). Active site-directed double mutants of dihydrofolate reductase. *Cancer Research* **56**, 4142-4145.

FLASSHOVE, M., BANERJEE, D., BERTINO, J.R. and MOORE, M.A.S. (1995). Increased resistance to methotrexate in human hematopoietic cells after gene transfer of the Ser31 DHFR mutant. *Leukemia* **9** suppl. 1, S34-S37.

GALIPEAU, J., BENAÏM, E., SPENCER, H.T., BLAKELEY, R.L. and SORRANTINO, B.P. (1997). A bicistronic retroviral vector for protecting hematopoietic cells against antifolates and p-glycoprotein effluxed drugs. *Human Gene Ther.* **8**, 1773-1783.

GHATTAS, I., SANES, J.R. and MAJORS, J.E. (1991). The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and embryos. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5848-5859.

HOOVIS, M.L. and CHU, M.Y. (1973). Enhancement of the antiproliferative action of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine by methotrexate in murine leukemic cells (L5178Y). *Cancer Res.* **33**, 521-525.

JANG, S.K., DAVIES, M.D. KAUFMAN, R.J. and WIMMER, E. (1989). Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J. of Virol.* **63**, 1651-1660.

KOC, O.N., ALLAY, J.A., LEE, K., DAVIS, B.M., REESE, J.S. and GERSON, S.L. (1996). Transfer of drug resistance genes into hematopoietic progenitors to improve chemotherapy tolerance. *Sem. Oncol.* **23**, 46-65.

LALIBERTE, J. and MOMPARTLER, R.L. (1994). Human cytidine deaminase: Purification of enzyme, cloning and expression of its cDNA. *Cancer Res.* **54**, 5401-5407.

LETOURNEAU, S., GREENBAUM, M. and COURNOYER, D. (1996). Retrovirus-mediated gene transfer of rat glutathione S-transferase Yc confers in vitro resistance to alkylating agents in human leukemia cells and in primary mouse hematopoietic progenitor cells. *Human Gene Ther.* **7**, 831-840.

LIE, S.O. and SLORDAHL, S. (1985). High-dose cytosine arabinoside in the treatment of childhood malignancies. *Sem Oncol* 12: suppl. **3**, 160-165.

LI, M.X., BANERJEE, D., ZHAO, S.C., SCHWEITZER, B.I., MINEISHI, S., GILBOA, E. and BERTINO, J.R. (1994). Development of a retroviral construct containing a human mutated dihydrofolate reductase cDNA for hematopoietic stem cell transduction. *Blood* **11**, 3403-3408.

MOMPARLER, R.L., ELIOPOULOS, N., BOVENZI, V., LETOURNEAU, S., GREENBAUM, M. and COURNOYER, D. (1996). Resistance to cytosine arabinoside by retroviral-mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther.* **3**, 331-338.

MOMPARLER, R.L., BOUFFARD, D.Y., MOMPARLER, L.F., DIONNE, J., BELANGER, K. and AYOUB, J. (1997). Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anti-Cancer Drugs* **8**, 358-368.

MORGAN, R.A., COUTURE, L., ELROY-STEIN, O., RAGHEB, J., MOSS, B. and ANDERSON W.F. (1992). Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites; development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1293-1299.

MORITZ, T., MACKAY, W., GLASSNER, B.J., WILLIAMS, D.A. and SAMSON, L. (1995). Retrovirus-mediated expression of DNA repair protein in bone marrow protects hematopoietic cells from nitrosourea-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **55**, 2608-2614.

OLSEN, J.C., JONHSON, L.G., WONG-SUN, M.L., MOORE, K.L., SWANSTROM, R. and BOUCHER, R.C. (1993). Retrovirus-mediated gene transfer to cystic fibrosis airway epithelial cells; effect of selectable marked sequences on long-term expression. *Nucleic Acids Res.* **21**, 663-669.

- OSBORN, C. and HUENNEKENS, F.K. (1958). Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. *J. Biol. Chem.* **233**, 969-974.
- O'SHAUGHNESSY, J.A., COWAN, K.H. and NEINHUIS, A.W. (1994). Retroviral mediated transfer of the human multi drug resistance gene (MDR-1) into hematopoietic stem cells during autologous transplantation after intensive chemotherapy for metastatic breast cancer. *Human Gene Ther.* **5**, 891-911.
- POSSINGER, K. (1995). Gemcitabine in advanced breast cancer. *Anti-Cancer Drugs* **6**, suppl 6, 55-59.
- RAFFERTY, J.A., HICKENSON, I., CHINNASAMY, N., LASHFORD, L.S., MARGISON, G.P., DEXTER, T.M. and FAIRBAIRN, L.J. (1996). Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. *Cancer and Metastasis Reviews* **15**, 365-383.
- RIVKIN, S.E., GREEN, S., METCH, B., CRUZ, A.B., ABELOFF, M.D., JEWELL, W.R., COSTANZI J.J., FARRAR, W.B., MINTON, J.P. AND OSBORNE, K.C. (1994). Adjuvant CMFVP vs tamoxifen vs concurrent CMFVP and tamoxifen for postmenopausal, node-positive, and estrogen receptor-positive breast cancer patients: a Southwest Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **12**, 2078-2085.
- SCHWEITZER, B.I., SRIMATKANDADA, S., GRITSMAN, H., SHERIDAN, R., VENKATARAGHAVAN, R. and BERTINO, J.R. (1989). Probing the role of two hydrophobic active site residues in the human dihydrofolate reductase by site-directed mutagenesis. *J. of Biol. Chem.* **264**, 20786-20795.
- SHEPHERD, F.A. (1995). Phase II trials of single-agent activity of gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer: an overview. *Anti-Cancer Drugs* **6**, suppl. 6, 19-25.

SORRENTINO, B.P., BRANDT, S.J., BODINE, D., GOTTESMAN, M., PASTAN, I., CLINE, A. and NIENHUIS, A.W. (1992). Selection of drug-resistant bone marrow cells *in vivo* after retroviral transfer of human MDR1. *Science* **257**, 99-103.

SUGIMOTO, Y., AKSENTIJEVIVH, I., GOTTESMAN, M.M. and PASTAN, I. (1994). Efficient expression of drug-selectable genes in retroviral vectors under control of an internal ribosome entry site. *Biotechnology* **12**, 694.

SUGIMOTO, Y., AKSENTIJEVIVH, I., MURRAY, G., BRADY, R.O., PASTAN, I. and GOTTESMAN, M.M. (1995). Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human α -galactosidase A for gene therapy of fabry disease. *Human Gene Ther.* **6**, 905-915.

SUZUKI, M., SUGIMOTO, Y., TSUKAHARA, S., OKOCHI, E., GOTTESMAN, M.M. and TSURUO, T. (1997). Retroviral coexpression of two different types of drug resistance genes to protect normal cells from combination chemotherapy. *Clinical Cancer Res.* **3**, 947-954.

WARD, M., RICHARDSON, C., PIOLI, P., SMITH, L., PODDA, S., GOFF, S., HESDORFFER, C. and BANK, A. (1994). Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene in human CD34+ cells. *Blood* **84**, 1408-1414.

ZHAO, S.C., LI, M-X., BANERJEE, D., SCHWIETIZER, B.I., MINEISHI, S., GIBOA, E. and BERTINO, J.R. (1994). Long term protection of recipient mice from lethal doses of methotrexate by marrow infected with a double copy vector retrovirus containing a mutant dihydrofolate reductase. *Cancer Gene Ther.* **1**, 27-33.

ZHAO, S.C., BANERJEE, D., MINEISHI, S. and BERTINO, J.R. (1997). Post-transplant methotrexate administration leads to improved curability of mice bearing a mammary tumor transplanted with marrow transduced with a mutant human dihydrofolate reductase cDNA. *Human Gene Ther.* **8**, 903-909.

Chapitre 8 : Article 2

Selection of drug resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene.

Christian M. Beauséjour¹, Nicoletta Eliopoulos², Ngoc Loan Oanh Le¹, Louise Momparler¹ and Richard L. Momparler¹

1 Département de pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche pédiatrique, Hôpital Ste-Justine, and 2 Departments of Medicine and Oncology, Lady Davis Institute, McGill University, Montréal, Quebec, Canada.

Soumis à la revue Cancer Gene Therapy

Running Title: Cytidine deaminase gene as a selectable marker.

Correspondence: Dr. R.L. Momparler, centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada. tel. 345-6140, fax 345-4801, email momparlr@ere.umontreal.ca.

Abstract

Hematopoietic toxicity produced by most anticancer drugs limits their potential for curative therapy. We have shown previously that the human cytidine deaminase (CD) gene can confer drug resistance in murine bone marrow cells (BMC) to the nucleoside analog, cytosine arabinoside (ARA-C). In the present study as the first objective we showed that the CD gene can also render drug resistance in BMC to related analogs, 2',2'-difluorodeoxycytidine (dFdC) and 5-azadeoxycytidine (5-AZA-CdR). As a second objective, we investigated the potential of ex vivo selection with cytosine nucleoside analogs of CD transduced BMC. The goal of this approach was to enrich the fraction of CD transduced BMC so as to increase the transgene expression and level of drug resistance prior to transplantation. This strategy may have the potential to circumvent the problem in clinical gene therapy of low level of gene transfer and adequate long-term gene expression. Using a bicistronic retroviral vector containing the CD and the green fluorescent protein (CDiGFP), we transduced murine L1210 leukemic cells. All three analogs, ARA-C, dFdC and 5-AZA-CdR were demonstrated in vitro to enrich (> 95%) the population of leukemic cells expressing the GFP transgene. However, with CD-transduced primary murine BMC cultivated at high cell density we observed that in vitro selection with ARA-C was not possible due to release of CD into the culture medium at amounts that were sufficient to inactivate the analog. The CD-containing medium produced a chemoprotective effect on mock BMC as shown by lack of significant growth inhibition in presence of ARA-C. On the other hand, at low cell density in a cell mixture containing CD-transduced cells, the mock BMC showed marked drug sensitivity to ARA-C as determined by clonogenic assay. Selection with ARA-C was shown to significantly increase the CD enzyme activity in transduced BMC. These results suggest that CD gene has the potential to be a good selectable marker and a possible tool for chemoprotection in cancer gene therapy.

Introduction

Hematopoietic stem cells are excellent target for delivery of both therapeutic genes for genetic diseases and drug resistance genes for chemoprotection in cancer therapy. However, the efficiency of gene transfer and long-term expression in vivo in human hematopoietic stem cells using retroviral vectors is usually very low¹⁻³. One reason for the low gene transfer efficiency of currently use retroviral vectors in human hematopoietic stem cells is that most of the cells are quiescent rendering them resistant to transduction⁴. In humans for ethical reasons it is not possible to use lethal irradiation to completely eradicate the hematopoietic stem cells prior to transplantation. In this regard, transplanted gene-modified cells will compete with the surviving host stem cells for repopulation and represent only a fraction of the total. Consequently, it is likely that the therapeutic effect would be reduced and possibly inefficient. Low gene transfer and expression levels restrain the potential of gene therapy for effective treatment of diseases. A very interesting approach to compensate for this limitation would be dominant selection ex vivo or in vivo of the gene-modified cells⁵.

Several drug-resistance genes related to cancer have been investigated for their potential for protection of normal cells against cancer chemotherapy. The protection of normal cells from drug toxicity is an interesting approach to improve the effectiveness of cancer chemotherapy. Genes such as the multidrug resistance (MDR), the dihydrofolate reductase (DHFR), and methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) showed interesting activity in vitro and in vivo to protect cells from the toxic effects of MDR drugs, antifolates and alkylating agents respectively⁵⁻⁹. The MDR gene is already in clinical trial for chemoprotection^{10,11}. These drug-resistance genes have shown some variable potential to be used as selectable markers¹²⁻¹⁶. We and others have reported that the human CD gene can confer drug resistance to ARA-C, a deoxynucleoside analogs used in cancer therapy^{17,18}. CD deaminate cytosine nucleoside analogs into inactive metabolites^{19,20}. These analogs are good candidate for chemoprotection and selection since they are S-phase specific and not toxic drugs for non-dividing resting cells.

Our objective was to investigate if cytosine nucleoside analogs can be used as useful tools with for dominant selection of cells that express the drug resistance

transgene, CD. In this report we demonstrated that murine BMC transduced with a bicistronic retroviral vector containing the CD and the green fluorescent protein (GFP) conferred drug resistance to two interesting deoxycytidine analogs, dFdC and 5-AZA-CdR. Both these analogs show interesting potential in tumor therapy in patients²¹⁻²⁵. dFdC, 5-AZA-CdR and ARA-C were very efficient in vitro to select CD-transduced murine leukemic cells. However, we observed that in vitro selection of CD-transduced primary murine BMC at high cell density was not possible due to the release of CD into the culture medium at amounts that were sufficient to inactivate the analog.

Materials and Methods

Vector construct and packaging cells

The pMSCV-iGFP expression vector (a gift from Dr Jacques Galipeau, Lady Davis Institute, Montreal) was used for the construction of the pMSCV-CDiGFP vector. Briefly, the CD cDNA was first removed from the pMFG-CD plasmid by sequential *Nco I* and *Bam HI* enzymatic digestion to create *Nco I* blunt end. The pMSCV-iGFP plasmid was also sequentially digested at *Xho I* and *Bam HI* sites to make *Xho I* blunt end and ligate to the previously hemi-blunted CD fragment. The proper DNA sequence of the CDiGFP cassette was confirmed by measuring functionality of the two proteins in cells. This vector was first transfected into GP+envAM12 amphotropic packaging cell line and virions collected from that cell line were used to transduce the ecotropic GP+E86 packaging cell line (both a gift from Dr A. Bank, Columbia University, New York). The titer of the retroviral GP+E86 CDiGFP packaging cell line was 1×10^6 infectious particles/ml. The vector integrity after genomic incorporation was tested by Southern blot (data not shown).

L1210 cells culture and transduction

Leukemic L1210 murine cells were grown in RPMI1640 medium (Gibco, Canada) supplemented with 5% FBS and 55 μ M mercaptoethanol under an atmosphere of 5% CO₂ at 37⁰C. Cells were transduced by co-cultivation with the GP+E86 CDiGFP retroviral packaging cell line. Briefly, 1×10^5 L1210 cells were seeded over irradiated producers (20Gy) for 24-48 hours periods in L1210 growth medium in presence of 6 μ g/ml of polybrene. Transduction efficacy was monitored by flow cytometry.

Murine bone marrow transduction and growth culture conditions

BMC were collected from 8-15 weeks old Balb/C male mice (Charles River Canada, St-Constant, Quebec) 4 days after treatment with 150 mg/kg 5-fluorouracil. The cells were then cocultivated for 72 hours with sub-confluent irradiated (20 Gy) GP+E86 CDiGFP producer cells. The viral titer of the producer cells was sufficient to transduce 60-80% of target cells as determined by flow cytometry. For mock transduction we used

parental GP+E86 packaging cells. The cocultivation medium contained 10 mg/ml BSA, 0.3 mg/ml human transferrin (Boehringer Mannheim), 6 µg/ml polybrene, 10% WEHI-3B and HTB-9 conditioned medium, 20 % FBS in alpha-MEM and 5µg/ml gentamycin (Sigma). BMC were maintained in the same medium for growth assay except that polybrene was not added. Transduced BMC were then collected, counted and plated at $1-2 \times 10^6$ cells/ml of culture medium in a 5% CO₂ incubator at 37⁰C for growth assays.

Colony-forming unit assay

After standard co-cultivation procedures and/or preselection or not in ARA-C containing medium for 72 hours at $1-2 \times 10^6$ cells/ml of culture medium, BMC were plated at $2-3 \times 10^4$ cells/ml in 1% methylcellulose containing medium (Stem cell Technologies, Vancouver, Canada). After 7-9 days of growth, colony forming unit (CFU) colonies larger than 50-100 cells were counted.

FACS analysis and GFP detection

Murine leukemic L1210 or primary BMC were first washed with phosphate buffered saline (PBS) solution and then incubated for 20 minutes with the Becton Dickinson FACS solution (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario). After centrifugation, cells were once again washed in PBS solution and finally suspended in appropriate volume of 1% paraformaldehyde in PBS prior to analysis.

Cytidine deaminase enzyme assay

Cytosol aliquots were prepared as follow; 5 to 10×10^6 primary BMC were centrifuged and washed once in PBS. They were then centrifuged and resuspended in 100 µl of 5 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 5 mM dithiothreitol. Cell membranes were than lysed following three sets of freezing and thawing. The resulting mixture was centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4⁰C. The supernatant (cytosol) molarity was then adjusted to 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and the protease inhibitors leupeptine, aprotinine and pepstatine (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec) were added to a final concentration of 1 ng/µl. CD activity was determined by measuring the conversion of ³H-cytidine to ³H-uridine with 5 µl of cytolol or filtered culture supernatant following a 30-minute

incubation at 37⁰C. Protein concentration was determined using the Bio-Rad kit and bovine serum albumin as internal standard.

Results

Chemoprotection of murine bone marrow cells to dFdC and 5-AZA-CdR

Previous work from our laboratory showed that the CD gene has the potential to confer in vitro chemoprotection against ARA-C in murine BMC using the MFG retroviral vector¹⁷. In this study we transduced the BMC using the MSCV retroviral vector containing the bicistronic CDiGFP to determine if drug resistance could be conferred to dFdC and 5-AZA-CdR, two other deoxycytidine analogs. CD gene-modified BMC showed remarkable clonogenic drug resistance to dFdC with > 90% protection at a concentration that kills almost all the control mock infected cells (Fig. 1A). In a similar experiment using 5-AZA-CdR, only a modest but significant increase in drug resistance was observed (Fig. 1B). Transduction efficacy was >90% as drug resistance to dFdC in the CFU-C type assay was observed to be >90%. FACS analyses were in accordance with such high gene transfer efficiency with 60-80% GFP positive cells after co-cultivation (data not shown). We speculate that the 20-40% GFP negative cells were terminally differentiated or dead cells that were not transduced and could not give rise to colony formation in methylcellulose. Also, it is possible that some CD positive cells had undetectable GFP expression.

In vitro selection of CD transduced L1210 leukemic cells with deoxycytidine analogs

In order to assess the potential of the CD gene as a selectable marker, we first investigated L1210 leukemic cells. These cells have similar in vitro sensitivity to deoxycytidine analogs as primary murine BMC (data not shown). Close to 100% CDiGFP transduced L1210 cells were obtained by multiple rounds of infection. These cells were subsequently mixed with mock cells at a 1:4 ratio (Fig. 2C). This cell mixture after a 72 hours exposure to either ARA-C, dFdC or 5-AZA-CdR, were allowed to grow for different periods of time before FACS analysis. This analysis revealed remarkable in vitro drug selection for all three analogs tested with values passing from 20% to >95% CDiGFP positive cells (Fig. 2D-E-F). The concentration used for the analogs was previously found to produce >90% growth inhibition for control L1210 cells. A similar type experiment was performed with the adherent human A-549 lung carcinoma cells.

Starting with a mix population of 20% CDiGFP transduced and 80% untransduced tumor cells, it was possible to increase up to > 90% the GFP positive cells following 4 day exposure to 0.1 μ M ARA-C (data not shown).

In vitro selection of CD transduced bone marrow cells with ARA-C

Similar experiments were performed with murine BMC using only ARA-C as selective agent. CDiGFP transduced murine BMC were mixed with mock transduced murine BMC to obtain a 1:4 ratio. Following 72 hours of ARA-C drug selection at 1 μ M, FACS analyses were performed and surprisingly no enrichment for the CDiGFP positive cells was observed (Fig. 3A). To make sure that the GFP signal was not only abrogated and that no selection occurred, CD enzyme activities were measured before and after drug selection on 20% CDiGFP BMC and no increase in the CD activity was observed (Table 1). These results were unexpected since mock-transduced cells were efficiently killed by the ARA-C concentration used in a cell growth assay. In fact, less than 10% of mock cells survived growth inhibition produced by 1 μ M ARA-C (Fig. 3B). The cell mixture at a 1:4 ratio (20%) or even as low as a 1:20 ratio (5%) of CDiGFP cells over mock cells showed the same level of drug resistance as only the CDiGFP cell population in this growth assay (Fig.3B).

We suspected that some sort of bystander effect was produced by CD transduced cells on the mock neighboring cells. Actually, we observed that a protective effect was produced by the release into the culture medium of CD from the cytoplasm of the CD positive dying cells. This hypothesis was validated by the observation that filtered medium collected from CD transduced BMC was capable of protecting almost completely mock cells against 1 μ M ARA-C (Fig. 3B). Recombinant virus containing the CD gene did not infect these mock cells since they recovered their drug sensitivity to ARA-C when washed free from the CD medium. In accord with these observations, CD enzyme activity was only detected in the supernatant of CD transduced BMC (Table 2). Our hypothesis is that this protective phenomenon was present only with primary murine BMC, not with L1210 cells, as only primary BMC cells have high cell turnover and were cultured at high cell density. This was verified by the fact that the same 20% CDiGFP murine BMC population that was > 90% drug resistant in a growth assay was only about

20% drug resistant when placed in methylcellulose at low cell density for a CFU-C assay (Fig. 4).

Clonogenic survival of ARA-C preselected CDiGFP murine bone marrow cells

Since selection for CD-transduced BMC at high cell density was hindered by the release of CD in the medium, we wanted to determine if preselection of these cells could lead to an enhancement of drug resistance due to an increase in transgene expression. This concept could be of importance in a clinical setting where dose escalation is often used to increase the effectiveness of cancer chemotherapy. Unexpectedly, we did not detect a significant increase in the level of drug resistance using the clonogenic assay, but we did detect a significant increase in CD activity after ARA-C selection (Fig. 5 and Table 1).

Table 1. Relative cytidine deaminase activity in mock and CDiGFP transduced murine marrow cells.

Cell line	Selection	Relative CD activity
mock (80%) + CDiGFP (20%)	none	1.0
mock (80%) + CDiGFP (20%)	1 μ M ARA-C	0.92 \pm 0.02
mock (100%)	none	1
CDiGFP (100%)	none	68 \pm 3
CDiGFP (100%)	1 μ M ARA-C	88 \pm 4
CDiGFP (100%)	2.5 μ M ARA-C	182 \pm 20

Where indicated the cells were selected in the indicated concentrations of ARA-C for 72 hours. Cytidine deaminase activity in cytosol of the cells was determined as described in Methods. Means values \pm SD for 3-4 determinations are shown

Table 2. Cytidine deaminase activity in culture medium from mock and CDiGFP transduced marrow cells.

Cell	CD activity (nmole/hr/ml)
mock	ND
CDiGFP	25 ± 6

The cells were grown in culture medium for 72 hours. The medium was then passed through a 0.2 μ m filter and 5 μ l was added to reaction mixture of the cytidine deaminase assay. Mean values \pm SD for 3-4 determinations are shown. ND, not detectable

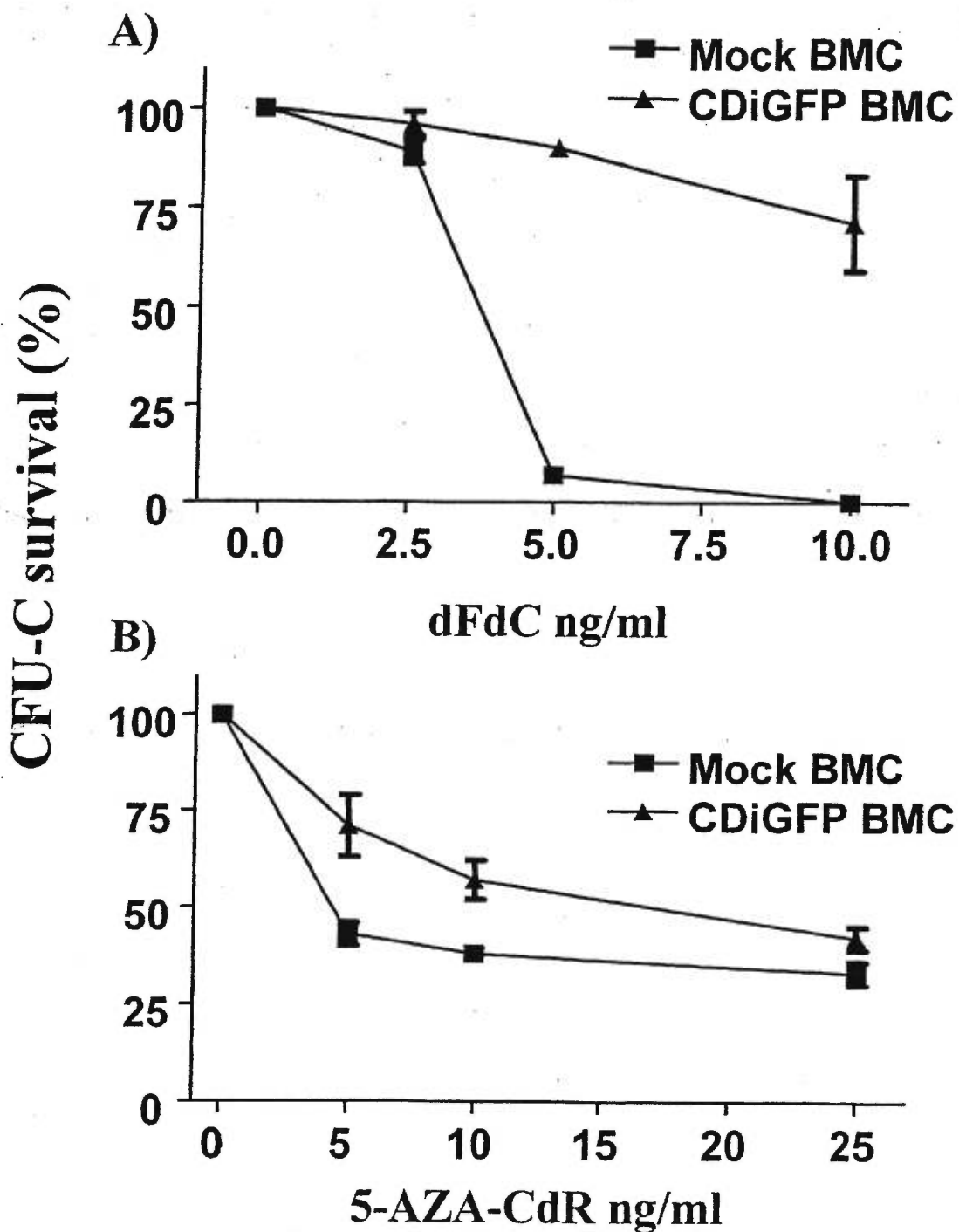


Figure 8.1 Effect of different concentrations of dFdC (A) or 5-AZA-CdR (B) on colony formation (CFU-C) of mock and CDiGFP transduced murine bone marrow cells. The cells were plated in 1% methylcellulose medium in presence of drug and colonies counted after 7-9 days of incubation. The mean \pm SD of 3 experiments are shown.

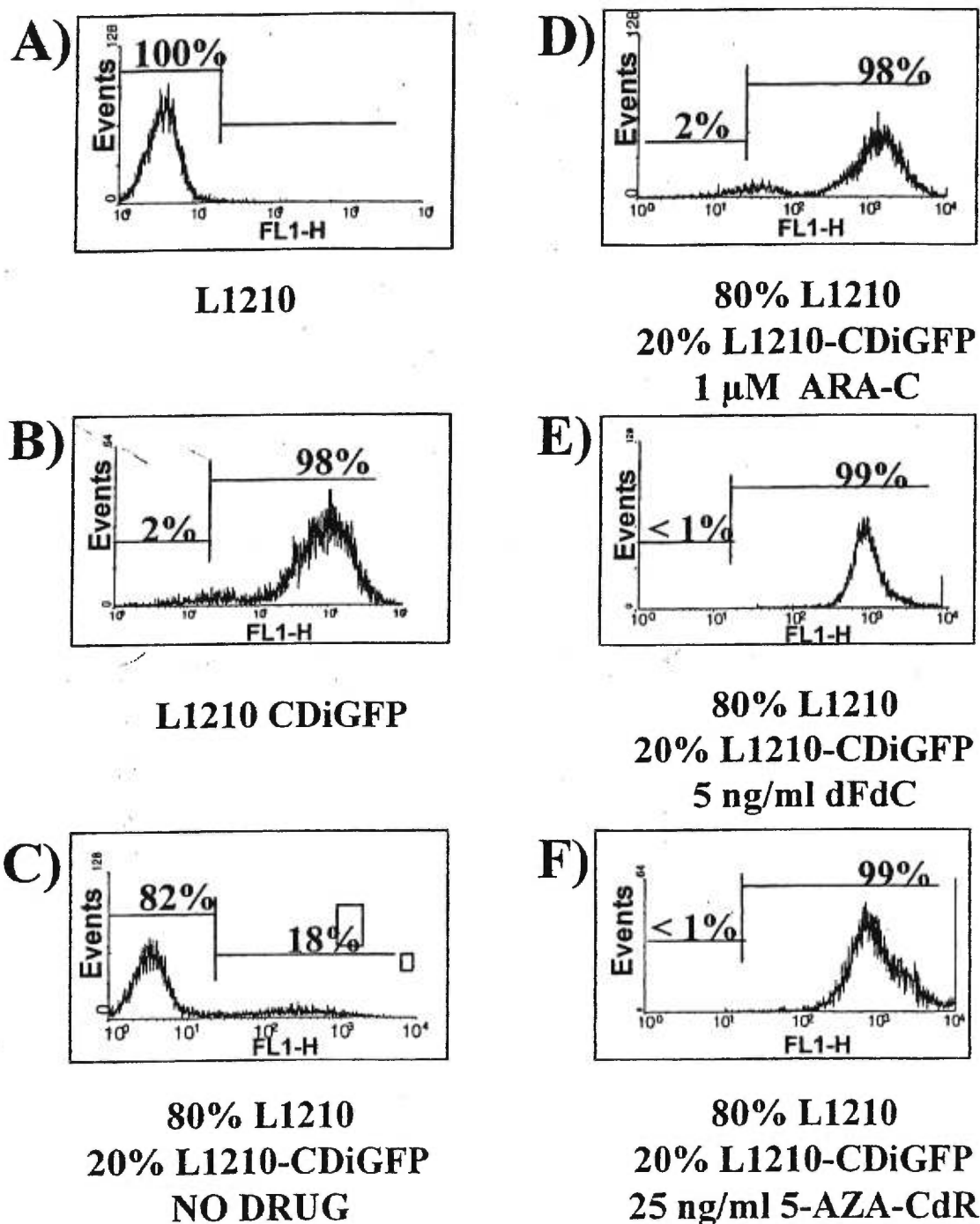
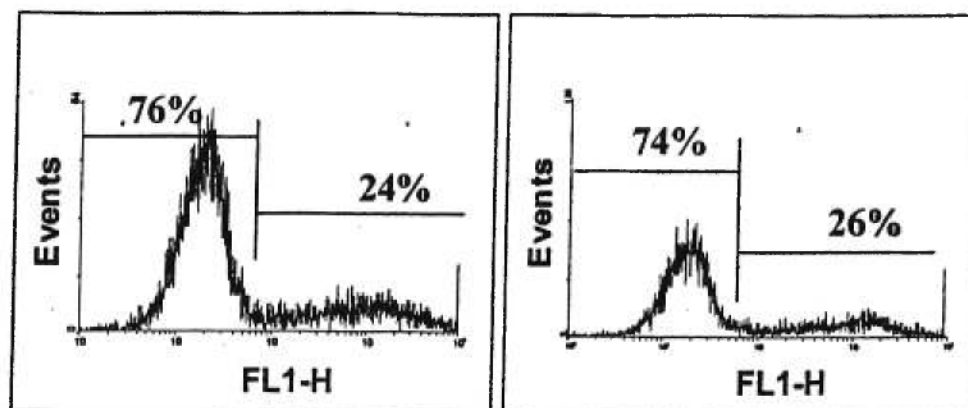


Figure 8.2 Selection by different cytosine nucleoside analogs of mixture of mock (80%) and CDiGFP transduced (20%) murine L1210 leukemic cells. The cell mixture (50,000/ml) were treated for 72 hours with 240 ng/ml (1 μM) ARA-C (D), 5 ng/ml dFdC (E) or 25 ng/ml 5-AZA-CdR (F). After drug removal the cells were incubated until enough cells were present for flow cytometry analysis. L1210 mock cells alone, CDiGFP transduced cells alone, and cell mixture in absence of drug is shown in (A), (B), and (C), respectively.

A)



80% mock
20% CDiGFP
No ARA-C

80% mock
20% CDiGFP
1 μ M ARA-C

B)

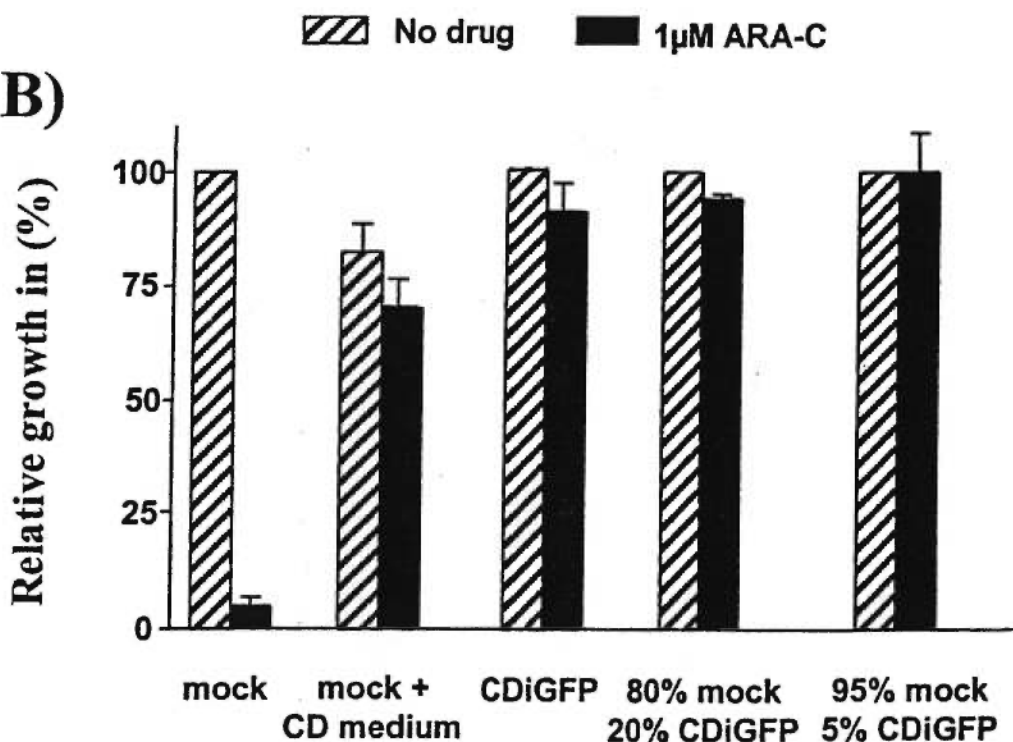


Figure 8.3 Effect of ARA-C on mixture of mock, CDiGFP transduced or mixture of mock and CDiGFP transduced murine bone marrow cells. The cells were plated at high cell density ($1-2 \times 10^6/\text{ml}$) and incubated or not with 1 μ M ARA-C for 72 hours. The effect of ARA-C selection on GFP expression of 80% mock + 20% CDiGFP cell mixture was analyzed by flow cytometry (A). The relative growth of the ARA-C-treated or not mock cell in the presence of filtered growth medium (CD medium) obtained from CDiGFP transduced cells (where indicated) was compared to untreated mock cells (B). Growth survival is expressed as the ratio of viable counted cells in the presence of drug / cells counted in the absence of drug. The mean \pm SD of 3 experiments are shown.

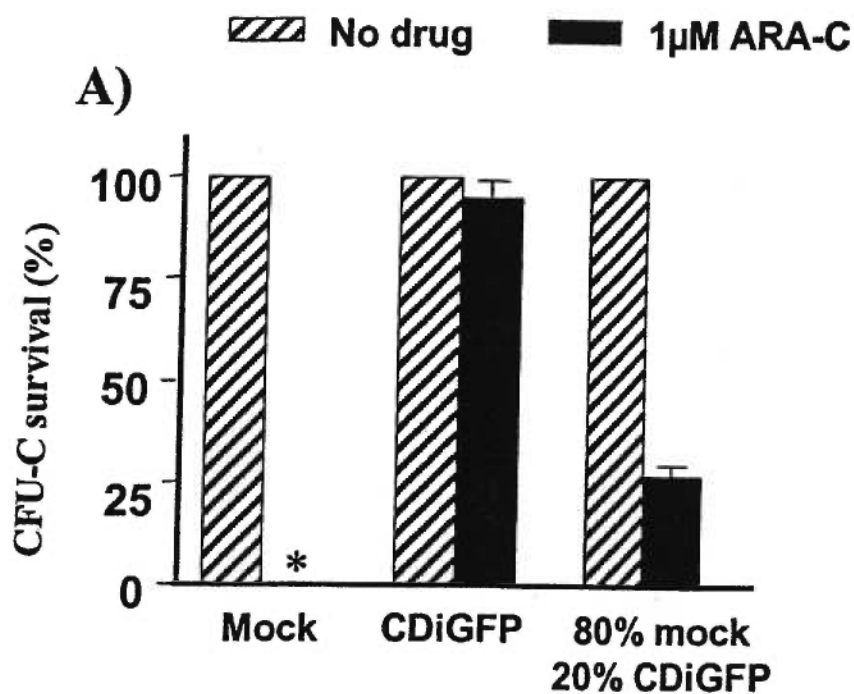


Figure 8.4 Effect of ARA-C survival (CFU-C) of mock, CDiGFP transduced, or mixture of mock (80%) and CDiGFP transduced (20%) murine bone marrow cells. The cells were plated at low cell density (2-30,000/ml) in 1% methylcellulose medium in the absence or presence of 1 μ M ARA-C. The numbers of colonies were determined after 7-9 days of incubation. The mean \pm SD of 3 experiments are indicated. * No colonies were detected.

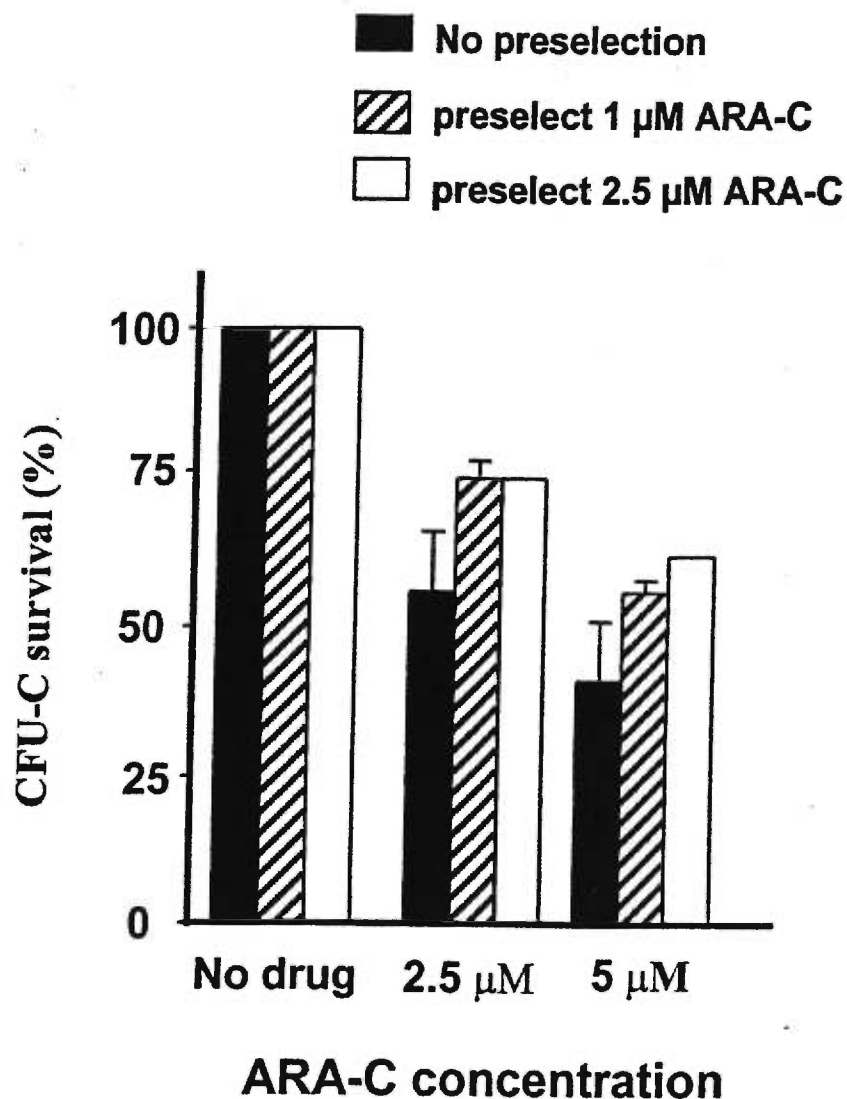


Figure 8.5 Effect of ARA-C preselection on the level of drug resistance of CDiGFP transduced murine bone marrow cells. The cells were preselected in 1 and 2.5 μM ARA-C for 72 hours and then plated in 1% methylcellulose medium to determine survival (CFU-C) in the presence of this analog. Colonies were counted 7-9 days after incubation. The mean values \pm SD of 3 experiments are shown except for the 2.5 μM ARA-C preselection where only one experiment in duplicate was performed.

Discussion

Most gene therapy strategies, for both cancer and genetic diseases, are currently limited by sub-optimal gene transfer procedures into long term repopulating stem cells. Hematopoietic stem cells are good candidate for prolonged expression of the transgene as they are easily accessible, can be purified and manipulated *ex vivo* prior to be safely transplanted back into the host. Retroviral vector used currently to obtain stable integration of the transgene are inefficient to achieve high-level gene transfer in quiescent stem cells and sustained high-level expression of the transgene. Efforts at improving gene transfer into hematopoietic stem cells are numerous and include varying the pseudotype of the viral envelope protein²⁶. Others have tried to stimulate stem cell replication by the addition of different cytokines combinations, even though this strategy may result in diminished long term repopulating ability of progenitors cells²⁷⁻²⁹. The development of the newly base lentiviral vectors is one solution to increase gene transfer into quiescent non-dividing hematopoietic stem cells³⁰. However, concerns about their safety may delay their utilization in clinical trials.

An interesting approach to surmount these limitations would be to *ex vivo* or *in vivo* select modified cells. In one of the first reports of effective gene therapy in humans, the authors note that the success obtained could be attributed to the natural selection property confer to their transduced cells³¹.

Several drug resistance genes have been evaluated for their potential to act as selectable markers *in vivo*. Among them, the MDR gene was the first one to be tested for this activity¹²⁻¹³. The ability of MDR gene to act as a selectable marker and confer chemoresistance is convincing in animal model, but as yet to be proven in human studies. In clinical trials, inappropriate gene transfers into truly long term repopulating stem cells as well as sub-optimal drug pressure were cited as the major limitations¹⁰⁻¹¹. Rapid appearance of drug resistance to MDR related drugs in non-modified stem cells might limit the selection potential of this gene. In addition, MDR transduced bone marrow cells were reported to cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice³².

The DHFR gene is also a promising candidate for conferring chemoprotection and *in vivo* selection. Using methotrexate, an antifolate drug, evidence of improved curability and reduced drug toxicities was observed in mice⁸. Trimetrexate and a

nucleoside transport inhibitor (to prevent thymidine rescue) showed promising results for in vivo selection in DHFR transplanted mice ¹⁵. However, more modest results were obtained more recently in mice using only methothrexate as the selective agent ¹⁶. In this latter study, selection was not possible in non-ablated animals indicating that selection is dependent on the ratio of transduced/non-transduced hematopoietic stem cell transplanted. The omission of the nucleoside transporter inhibitor greatly compromise the MTX toxicity in non-transduced stem cells which may have escaped drug pressure by using extra cellular thymidine as a salvage pathway. Also, Blau and coworkers reported that MTX was inefficient at killing cells at the progenitor level ³³.

Finally, the MGMT gene is certainly consider as one of the most promising in vivo selectable marker. The mutated form of the gene, in combination with O⁶-benzylghanine and BCNU did confer chemoresistance and delayed tumor progression in mice ⁶. Even more, this combination was showed to be very effective to in vivo select myeloablated and non-myeloablated mice repopulate with only low number of modified cells ¹⁴. Thus far, no in vivo data on humans has been reported, but a clinical trail was recently approved ¹⁴. However, alkylating agents are very toxic drugs and there use in clinical trial on gene therapy of disease may not be approved due to their severe side effects since these agents would have to be used on a routine basis.

Another interesting strategy to induce in vivo selection of gene-modified cells has been reported recently ³⁴. The approach is based on the induction of growth by the activation of a signaling domain of a growth factor receptor by a chemical inducer. This illustrates the current interest for the development of new selection techniques.

The ideal drug resistance gene should (i) confer high levels of drug resistance to possibly more then a single drug, (ii) be non immunogenic, (iii) of small size to facilitate its linkage to a therapeutic gene and (iv) confer resistance to a class of drugs that are not too toxic, not mutagenic or carcinogenic allowing continued in vivo administration after transplantation. Cytosine nucleoside analogs are effective anticancer drugs. We have demonstrated that elevated activity of the CD gene to be one mechanism responsible for the resistance observed against these analogs ³⁵. We feel that the human CD drug resistance gene fulfill most of these criteria to be considered as an effective drug selectable marker.

In this study, we evaluated the potential of the CD gene to act as a drug resistance gene and a selectable marker. CD overexpression in murine BMC is known to confer ARA-C resistance^{17,36}. One objective was to determine if this resistance occurs with other deoxycytidine analogs. High level of drug resistance was found against dFdC with lower, but significant, resistance against 5-AZA-CdR (Fig. 1). These findings are promising for future studies on chemoprotection since dFdC and 5-AZA-CdR are active drugs against solid tumors, whereas ARA-C is mainly used for acute leukemia. In comparison of the *in vitro* antineoplastic activity of these two analogs 5-AZA-CdR shows less activity due to its chemical instability since it has a half-life of only about 12 hours in culture medium.

Our next objective was to demonstrate that CD with a deoxycytidine analog can be used as a potent drug selectable gene. *In vitro* studies using L1210 leukemic cells, CD showed a remarkable capacity to act as a selectable marker (Fig. 2). Starting from a population containing only 20% CD modified cells, all three analogs tested were able to enrich (>95%) for drug resistant cells. Comparable results were observed with a starting population of only 5 to 10% CD positive cells (data not shown). CD *in vitro* selection potential with ARA-C was also observed to function very well with adherent human A-549 lung carcinoma cells.

Similar experiments were performed on murine BMC. CD-transduced primary murine BMC cultivated at high cell density showed that *in vitro* selection with ARA-C was not possible due to release of CD into the culture medium in sufficient amounts to inactivate the analog at a concentration known to normally produce > 90% growth inhibition (Fig. 3B and Table 2). One explanation for this phenomenon is that primary BMC cultured at high cell density have a rapid turnover. This event was not seen when primary BMC were cultivated at low cell density in methylcellulose (Fig. 4). We cannot rule out the possibility that BMC negative for the GFP signal, but positive for CD, were selected. However, this possibility is improbable since CD enzyme activity was not increased after ARA-C selection on the 20% CDiGFP BMC starting population (Table 1). However, we think that these results will not compromise the potential of the CD gene to act as a selectable marker *in vivo*, because rapid clearance of the CD protein from the marrow would take place.

ARA-C *ex vivo* selection of transduced CDiGFP BMC did not lead to a significant increase in CFU-C survival (Fig. 5). However, we did observe a significant increase, more than two fold, of the transgene expression in those cells following selection with ARA-C at high concentrations (Table 1). These findings suggest that *ex vivo* selection of BMC expressing high level of CD protein may be possible at an elevated ARA-C concentration. *Ex vivo* selection of BMC with MDR drugs also produce elevated transgene expression and showed increase chemoresistance in reconstituted bone marrow of mice ³⁷⁻³⁸.

We can conclude that the human CD gene is able to chemoprotect murine BMC against diverse deoxycytidine analogs. This protection is high enough to allow excellent *in vitro* selection potential. These results should be seen as good basis on which future *in vivo* experiments will be designed.

In conclusion, we propose that the human CD has the potential to be an effective selectable gene under *in vitro* conditions using different cytosine nucleoside analogs. We feel that the combination CD and these analogs should be considered as a promising selection strategy. One limitation of our system is poor selection efficacy on non-dividing stem cells. We believe this may be overcome by appropriate sequential drug pressure and/or cytokine prestimulation *in vivo* ³⁹. Future improvements in methods of gene transfer and expression may lead to the effective use of CD in a *in vivo* setting for both selection and chemoprotection

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Marie Blagdon for her technical assistance for FACS analysis. This work was supported by a grant MOP-13754 from the Canadian Institutes of Health Research. C.M.B is a recipient of a studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec.

References

1. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, Li F, Miller JA, DeCarlo E, Holland SM, Leitman SF, Carter CS, Butz RE, Read EJ, Fleisher TA, Schneiderman RD, Van Epps DE, Spratt SK, Maack CA, Rokovich JA, Cohen LK, Gallin JI. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12133-12138.
2. Dunbar CE, Cottler-Fox M, O'Shaughnessy JA, Doren S, Carter C, Berenson R, Brown S, Moen RC, Greenblatt J, Stewart FM. Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood*. 1995;85:3048-3057.
3. Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet*. 1993;342:1134-1137.
4. Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertinocello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol*. 1997;25:445-453.
5. Licht T, Herrmann F, Gottesman MM, Pastan I. In vivo drug-selectable genes: a new concept in gene therapy. *Stem Cells*. 1997;15:104-111.
6. Koc ON, Reese JS, Davis BM, Liu L, Majczenko KJ, Gerson SL. DeltaMGMT-transduced bone marrow infusion increases tolerance to O6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and allows intensive therapy of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human colon cancer xenografts. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1021-1030.
7. Ragg S, Xu-Welliver M, Bailey J, D'Souza M, Cooper R, Chandra S, Seshadri R, Pegg AE, Williams DA. Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to in vivo selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res*. 2000;60:5187-5195.
8. Zhao SC, Banerjee D, Mineishi S, Bertino JR. Post-transplant methotrexate administration leads to improved curability of mice bearing a mammary tumor transplanted with marrow transduced with a mutant human dihydrofolate reductase cDNA. *Hum Gene Ther*. 1997;8:903-909.
9. Spencer HT, Sleep SE, Rehg JE, Blakley RL, Sorrentino BP. A gene transfer strategy for making bone marrow cells resistant to trimetrexate. *Blood*. 1996;87:2579-2587.

10. Cowan KH, Moscow JA, Huang H, Zujewski JA, O'Shaughnessy J, Sorrentino B, Hines K, Carter C, Schneider E, Cusack G, Noone M, Dunbar C, Steinberg S, Wilson W, Goldspiel B, Read EJ, Leitman SF, McDonagh K, Chow C, Abati A, Chiang Y, Chang YN, Gottesman MM, Pastan I, Nienhuis A. Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients [see comments]. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1619-1628.
11. Moscow JA, Huang H, Carter C, Hines K, Zujewski J, Cusack G, Chow C, Venzon D, Sorrentino B, Chiang Y, Goldspiel B, Leitman S, Read EJ, Abati A, Gottesman MM, Pastan I, Sellers S, Dunbar C, Cowan KH. Engraftment of MDR1 and NeoR gene-transduced hematopoietic cells after breast cancer chemotherapy. *Blood.* 1999;94:52-61.
12. Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science.* 1992;257:99-103.
13. Podda S, Ward M, Himelstein A, Richardson C, Flor-Weiss E, Smith L, Gottesman M, Pastan I, Bank A. Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9676-9680.
14. Davis BM, Koc ON, Gerson SL. Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood.* 2000;95:3078-3084.
15. Allay JA, Persons DA, Galipeau J, Riberdy JM, Ashmun RA, Blakley RL, Sorrentino BP. In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 1998;4:1136-1143.
16. Havenga M, Valerio D, Hoogerbrugge P, Es H. In vivo methotrexate selection of murine hemopoietic cells transduced with a retroviral vector for Gaucher disease [see comments]. *Gene Ther.* 1999;6:1661-1669.
17. Momparler RL, Eliopoulos N, Bovenzi V, Letourneau S, Greenbaum M, Cournoyer D. Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther.* 1996;3:331-338.
18. Neff T, Blau CA. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol.* 1996;24:1340-1346.
19. Bouffard DY, Laliberte J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol.* 1993;45:1857-1861.

20. Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3- deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol.* 1983;32:1327-1328.
21. Momparler RL, Bouffard DY, Momparler LF, Dionne J, Belanger K, Ayoub J. Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs.* 1997;8:358-368.
22. Momparler RL, Rivard GE, Gyger M. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol Ther.* 1985;30:277-286.
23. Possinger K. Gemcitabine in advanced breast cancer. *Anticancer Drugs.* 1995;6 Suppl 6:55-59.
24. Matano E, Tagliaferri P, Libroia A, Damiano V, Fabbrocini A, De Lorenzo S, Bianco AR. Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study. *Br J Cancer.* 2000;82:1772-1775.
25. Carmichael J, Walling J. Advanced breast cancer: investigational role of gemcitabine. *Eur J Cancer.* 1997;33 Suppl 1:S27-S30.
26. Barrette S, Douglas J, Orlic D, Anderson SM, Seidel NE, Miller AD, Bodine DM. Superior transduction of mouse hematopoietic stem cells with 10A1 and VSV-G pseudotyped retrovirus vectors. *Mol Ther.* 2000;1:330-338.
27. Kittler EL, Peters SO, Crittenden RB, Debatis ME, Ramshaw HS, Stewart FM, Quesenberry PJ. Cytokine-facilitated transduction leads to low-level engraftment in nonablated hosts. *Blood.* 1997;90:865-872.
28. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL- 6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood.* 1996;87:30-37.
29. Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, Dunbar CE. Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood.* 1998;92:1131-1141.
30. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999;283:682-686.
31. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint BG, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [see comments]. *Science.* 2000;288:669-672.

32. Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood*. 1998;92:2269-2279.
33. Blau CA, Neff T, Papayannopoulou T. The hematological effects of folate analogs: implications for using the dihydrofolate reductase gene for in vivo selection. *Hum Gene Ther*. 1996;7:2069-2078.
34. Jin L, Zeng H, Chien S, Otto KG, Richard RE, Emery DW, Anthony BC. In vivo selection using a cell-growth switch [In Process Citation]. *Nat Genet*. 2000;26:64-66.
35. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;42:373-378.
36. Beausejour CM, Le NL, Letourneau S, Cournoyer D, Momparler RL. Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicistronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate. *Hum Gene Ther*. 1998;9:2537-2544.
37. Licht T, Goldenberg SK, Vieira WD, Gottesman MM, Pastan I. Drug selection of MDR1-transduced hematopoietic cells ex vivo increases transgene expression and chemoresistance in reconstituted bone marrow in mice. *Gene Ther*. 2000;7:348-358.
38. Licht T, Aran JM, Goldenberg SK, Vieira WD, Gottesman MM, Pastan I. Retroviral transfer of human MDR1 gene to hematopoietic cells: effects of drug selection and of transcript splicing on expression of encoded P-glycoprotein. *Hum Gene Ther*. 1999;10:2173-2185.
39. Blau CA, Neff T, Papayannopoulou T. Cytokine prestimulation as a gene therapy strategy: implications for using the MDR1 gene as a dominant selectable marker. *Blood*. 1997;89:146-154.

Chapitre 9 : Article 3

Potential of Ribozymes Against Deoxycytidine Kinase to Confer Drug Resistance to Cytosine Nucleoside Analogs

Christian M Beauséjour,^{*} Guy Tremblay,[§] and Richard L Momparler^{*}

^{*} Centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine, département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Canada ; and [§] Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada

Publié dans Biochemical Biophysical Research Communication 30:278:569-575 (2000)

Running title: Ribozymes against the deoxycytidine kinase to confer drug resistance.

Correspondance: Dr R.L. Momparler, centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada. tel. 345-6140, fax 345-4801, email momparlr@ere.umontreal.ca.

Abstract

Hematopoietic toxicity is the dose-limiting side effect produced in cancer chemotherapy with deoxycytidine nucleoside analogs. Deletion of the deoxycytidine kinase (dCK), results in a drug resistance phenotype to these analogs. An interesting gene therapy strategy to confer drug resistance to cytosine nucleoside analogs would be to specifically inactivate the dCK in normal hematopoietic stem cell. In this study we designed hammerhead ribozymes that can specifically cut and downregulate the murine dCK mRNA. Three different ribozymes were identified and shown to cleave *in vitro* the dCK RNA. After introduction of ribozyme cDNA into murine L1210 leukemic cells by retroviral transfer, two of the ribozymes showed some capacity in reducing dCK activity. However, analysis of transduced L1210 clones showed that the significant reduction in the dCK mRNA was not sufficient to confer drug resistance to cytosine arabinoside. Nevertheless, these results provide a new avenue of modulating the dCK enzyme activity and with improved modifications may have the potential for use in gene therapy to confer drug resistance to deoxycytidine analogs.

Key Words: ribozyme, deoxycytidine kinase, drug resistance, gene transfer, cytosine arabinoside,

Introduction

The deoxycytidine kinase (dCK) is the key enzyme in the series of phosphorylating steps necessary to metabolize the deoxycytidine nucleoside analogs to their pharmacologically active form (1). dCK is of particular interest in cancer chemotherapy because tumor cells deficient for this enzyme are resistant to deoxycytidine analogs (2,3). The deoxycytidine nucleoside analogs, cytosine arabinoside (ARA-C), 2'-2 difluorodeoxycytidine (dFdC) and 5-aza-2' deoxycytidine (5-AZA-CdR) are anticancer drugs that are activated by dCK (4-7).

Hematopoietic toxicity is the major factor that limits dose intensification and curative potential of deoxycytidine nucleoside analogs in cancer therapy (8). An approach to overcome this problem is to use the techniques of gene therapy to confer drug resistance to cytosine nucleoside analogs in normal hematopoietic stem cells (8,9). Similarly, induction of drug resistance to polycyclic anticancer drugs, antifolates and alkylating agents in normal hematopoietic stem cells is currently being investigated with the genes, MDR, DHFR and MGMT, respectively (10-12).

One strategy to overcome deoxycytidine analogs toxicity is to use the cytidine deaminase (CD) gene (13,14). CD catalyzes the deamination and inactivation of deoxycytidine nucleoside analogs (15,16). We have reported that gene transfer of the CD gene into murine bone marrow cells resulted in drug resistance to ARA-C, dFdC and 5-AZA-CdR (17). The success of this approach in clinical cancer therapy will depend on the improvement of gene transfer and expression procedures in human hematopoietic stem cells. Another possible application of this drug resistance strategy is its potential use for *in vivo* selection of therapeutic genes that need sustained and high level of gene expression in target cells (18,19).

A novel way to also confer drug resistance to deoxycytidine nucleoside analogs would be to decrease the expression of the dCK enzyme by the utilization of ribozymes that cleave its mRNA in the target cell. Recently, short-term downregulation of the dCK expression was shown to be possible by the use of antisense oligonucleotides (20).

Hammerhead ribozymes are catalytic molecules that can cleave specific RNA sequences (21). There are several genes that have been shown to be downregulated by the

action of ribozymes (22-24). Ohnuma et al. (24) used this strategy for the drug resistance gene MDR and demonstrated its downregulation by the action of specific ribozymes.

In this report we have designed hammerhead ribozymes to inactivate the dCK mRNA. Three ribozymes were identified and demonstrated *in vitro* to cleave dCK mRNA. Two of these ribozymes have shown some *in vivo* capacity to modulate dCK enzyme activity and mRNA content in L1210 murine leukemic cells.

Materials and Methods

Ribozymes synthesis and target sites identification

The potential target sites for ribozyme cleavage of the murine dCK mRNA (Genbank accession number, NM007832) were selected by analyzing secondary structure predicted by the MFOLD program version 3.0 (25). Ribozymes were synthesized by annealing complementary primers at room temperature after being heated at 95°C for 5 minutes. The sense and antisense primers used for ribozyme synthesis (Alpha DNA, Montreal) were as follows: Ribozyme 1 (Rbz 1) 5'-CGCGGGATCCTGGGAAGTTTCGTCCTCACGGACTGATCAGAACGTTTGTCCATGGGCGC-3' and 5'-GCGCCCATGGACAAACGTTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAACTTCCCAGGATCCCGCG-3'; ribozymes 4 (Rbz 4) 5'-CGCGGGATCCTTCCAGTTTCGTCCTCACG GACTCATCAGATATGCCCATGGCTCGAGGCGC-3' and 5'-GCGCCTCGAGCCATGGGCATATCTGATGAGTCCGTGAGGACGAACTGGAAGGATCCCGCG-3'; and ribozyme 6 (Rbz 6) 5'-CGCGGGATCCGTGCCCCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGCTCACACTGCCATGGGCGC-3' and 5'-GCGCCCATGGCAGTGTGAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGGGCACGGATCCCGCG-3'.

The annealed primers were digested overnight with *XhoI* and *BamHI* restriction enzymes at the 5' and 3' end, respectively. Subsequent cloning of the agarose gel purified products was performed into pCRII plasmid (Invitrogen, CA). Complete ribozyme sequence was then confirmed by sequencing with a Pharmacia automatic DNA sequencer using fluorescent-dATP labeled substrate (IAF, Laval). The verified ribozyme sequences were subcloned into the retroviral pAP2-iGFP vector (generously provided by Dr J. Galipeau, Lady Davis Institute, Montreal) at the *XhoI* and *BamHI* site (figure 2).

In vitro cleavage reaction

Both dCK RNA substrate and ribozymes were synthesized *in vitro* using the Megascript T7 polymerase system (Ambion Inc., Austin, TX). Briefly, pCRII plasmid containing ribozymes or the complete murine dCK cDNA (kindly provided by Dr Erickson, Sweden) were linearized by *HindIII* digestion and 1 µg of purified DNA was used as the template for RNA synthesis with T7 polymerase and ³²P-UTP under the

manufacturer's recommended conditions. We performed the *in vitro* cleavage reaction by mixing 50 nM radioactive dCK purified RNA with 250 nM of each ribozyme in 50 mM Tris-Hcl pH 7.5 and 10 mM MgCl₂ at 37⁰C for 30 minutes. Reaction was stop by adding the gel loading solution and results visualized on a 8% denaturing polyacrylamide gel after exposure using a Molecular Dynamics PhosphoImager.

Cell culture and retroviral transduction

Leukemic L1210 murine cells were grown in RPMI1640 medium (Gibco, Canada) supplemented with 5% FBS and 55 µM mercaptoethanol under an atmosphere of 5% CO₂ at 37⁰C. Transduction procedures were as follows: Ecotropic GP+E86 retroviral packaging cell line were transfected with the different pAP2-Rbz-iGFP plasmids and EGFP expression monitored by FACS analysis. Supernatant from stably transfected GP+E86 cells was used to transduce the L1210 cells. One hundred thousand L1210 cells were centrifuged and the cell pellet suspended in 0.45 µm filtered RPMI medium obtained from confluent producer cells. Individual L1210 clones were obtained using the soft agar method as described by Momparler et al. (26).

dCK enzyme assay

Cell cytosols were prepared as described earlier (13). dCK enzyme activity was determined by measuring the conversion of ³H-deoxycytidine to ³H-deoxycytidine monophosphate which bind to Whatman DE81 positively charged 25 mm paper discs. In brief, 5µl cytosol is incubated for 30 minutes at 37⁰C in 50 mM Tris-Hcl pH 7, 10 mM ATP, 10 mM dithiothreitol and 10 µM ³H-deoxycytidine. The protein concentrations were determined using the BioRad dye method using bovine serum albumin as the standard.

Northern blot analysis

Total RNA was isolated from cells using the Qiagen RNAsy kit (Mississauga, Ontario). Samples of 15 µg of RNA were electrophoresed in a 1.5% agarose-borate 1.1% formaldehyde gel and than blotted onto a Hybond-N nylon membrane (Amersham, Oackville, Ontario). The probes were prepared by labeling the complete cDNA sequence

of the dCK and a 983 pb fragment of the G3PDH gene with ^{32}P -dATP using PCR. The membrane was hybridized in Express Hyb solution (Clontech, Palo Alto, CA) at 65°C , washed and analyzed by a PhosphoImager.

Results

Ribozyme Design

Accessible ribozyme cleavage sites were determined by submitting the entire and different fragments of the murine dCK mRNA sequence to the mfold program (version 3.0). The six GUC cut sites on the coding sequence of the dCK were analyzed and based on their predicted secondary structure, we designed three different ribozymes that anneal primarily on the single-stranded loop structure. Ribozymes 1,4 and 6 were predicted to cleave the target GUC sequence 3' to the cytosine at positions 104, 293 and 699, respectively (figure 1). The target sequence of dCK RNA for Rbz 1 is shown in figure 2. This ribozyme which contains arms of 6 and 9 bases was designed from the observations that ribozymes with shorter stem I and longer stem III length are more active than ribozymes containing the reverse arm length (27). Rbz 4 was designed with stem I and III length of 5 and 7 bases in an attempt to increase catalytic turnover.

In Vitro Cleavage of dCK RNA

In order to evaluate the ability of our ribozymes to digest the dCK RNA with specificity, we performed *in vitro* cleavage assays (figure 3). dCK ³²P-labeled RNA and ribozymes were synthesis by *in vitro* transcription using the T7 polymerase. The entire 929 bp substrate coding sequence was synthesized. Ribozymes were mixed with radioactive dCK RNA at 5-fold excess ratio. All three ribozymes showed some capacity to digest specifically the substrate with Rbz 1 releasing cleavage products of predicted size, 747 and 182 bp. Rbz 4 produced products of 558 and 371 bp and Rbz 6 produced products of 777 and 152 bp, as predicted by their site of cleavage. The inactive ribozyme (Rbz AS) is a modified Rbz 1 with a single base mutation in the catalytic core rendering it totally inactive (figure 2). Increasing the ribozyme/substrate ratio up to 10-fold with extended period of incubation and variations in MgCl₂ concentration did not result in higher catalytic efficiency (results not shown).

Cellular Studies on Transduced L1210 Leukemic Cells

For intracellular evaluation of the cleavage efficacy of our ribozymes, we have subcloned them into a retroviral construct harboring the internal ribosome entry site (IRES) together with the enhanced green fluorescent protein (GFP) (figure 2). This construct has shown the capacity to deliver high-level gene expression in many cell lines in our laboratory, including the murine leukemic cell line L1210 used in this study. The L1210 cell line was used because of their high endogenous level of dCK enzyme activity that would make any decrease by our ribozyme easier to detect.

High titer ecotropic GP^+E86 producer cells were made for each of the ribozymes and used to transduce the L1210 cells. Transduction efficiency and ribozyme expression were rapidly determined by FACS analysis using the GFP expression. All transduced cell population showed over 80% of positive cells (data not shown).

dCK activities of transduced L1210 cell populations were measured to assess the ability of our ribozyme to downregulate dCK protein synthesis. Rbz 1 and the control Rbz AS did not reduce the activity of dCK. Rbz 4 and Rbz 6 produced a moderate, but significant, decrease in enzyme activity of approximately 18 and 17% respectively, as compared to control and cells treated with the inactive ribozymes (figure 4).

Since the active ribozyme produced only a moderate reduction in dCK activity in the mixed population, we isolated clones with high GFP expression in order to determine if they would also show more ribozyme activity. Analysis of 12 clones showed not greater reduction in dCK activity as compared to the mixed population (data not shown). These clones were also tested for their level in dCK mRNA by Northern blot analysis. As shown in figure 5, dCK mRNA levels of Rbz 4 and Rbz 6 clones were notably lower than the control and Rbz AS clones. Two clones for each population are shown (other clones gave similar results). Densitometry analysis using the G3PDH as reference standard revealed an average of 37% and 42% reduction in dCK mRNA for Rbz 4 and Rbz 6 clones, respectively. Rbz AS showed minimal activity against dCK mRNA with an average reduction of only 7%. However, the Rbz 4 and Rbz 6 clones with reduced dCK mRNA did not display drug resistance to ARA-C in a growth assay as compared to control cells (not shown).

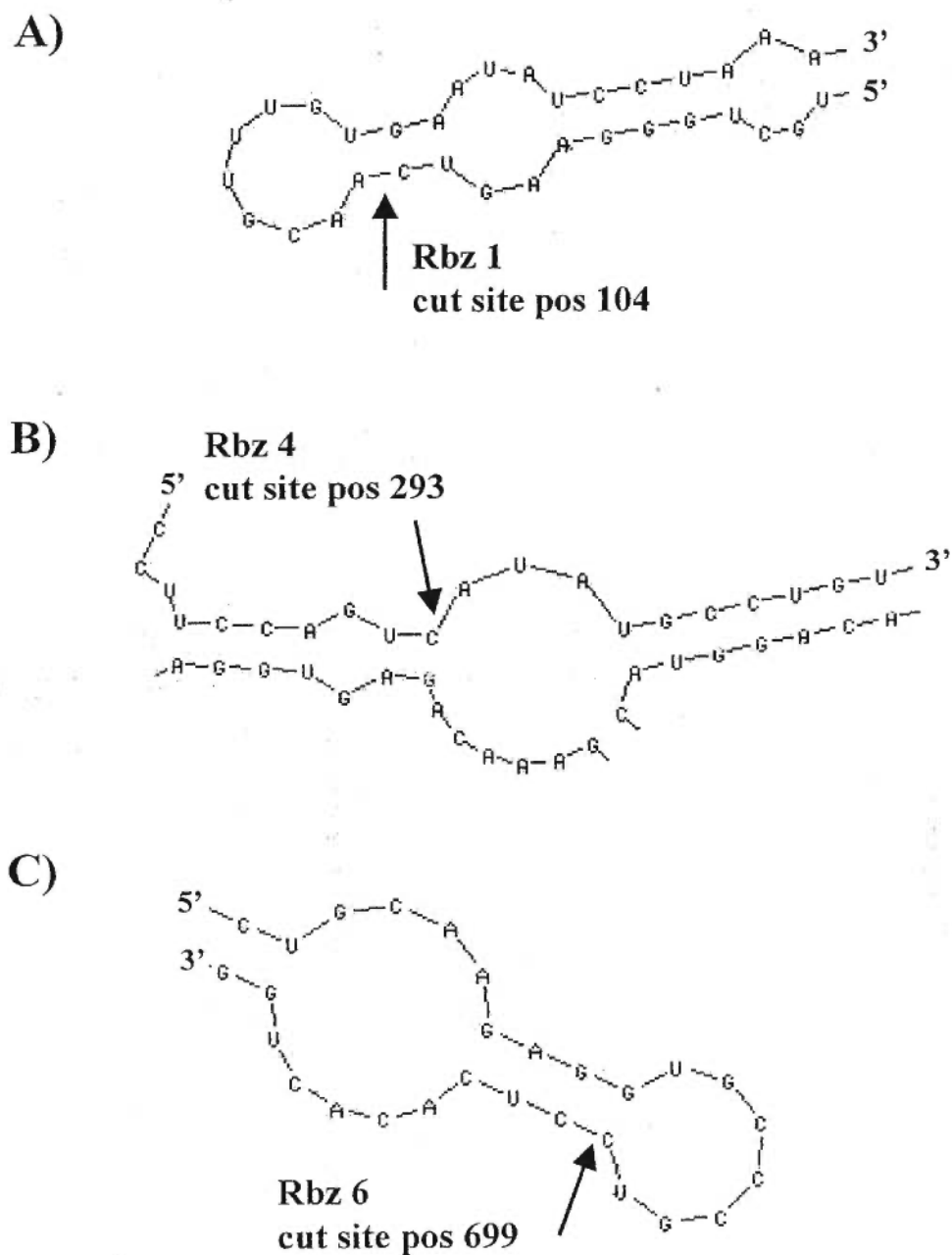


Figure 9.1 Stem-loop structure of fragment of the murine dCK mRNA as predicted by the mfold program (25). The cleavage sites of Rbz 1, 4 and 6 are indicated. These ribozymes cut at the 3' position of 5'-GUC-3' target sequence. The inactive ribozyme (Rbz AS) targets the same GUC than Rbz 1. The dCK ATG start codon is located at position 1.

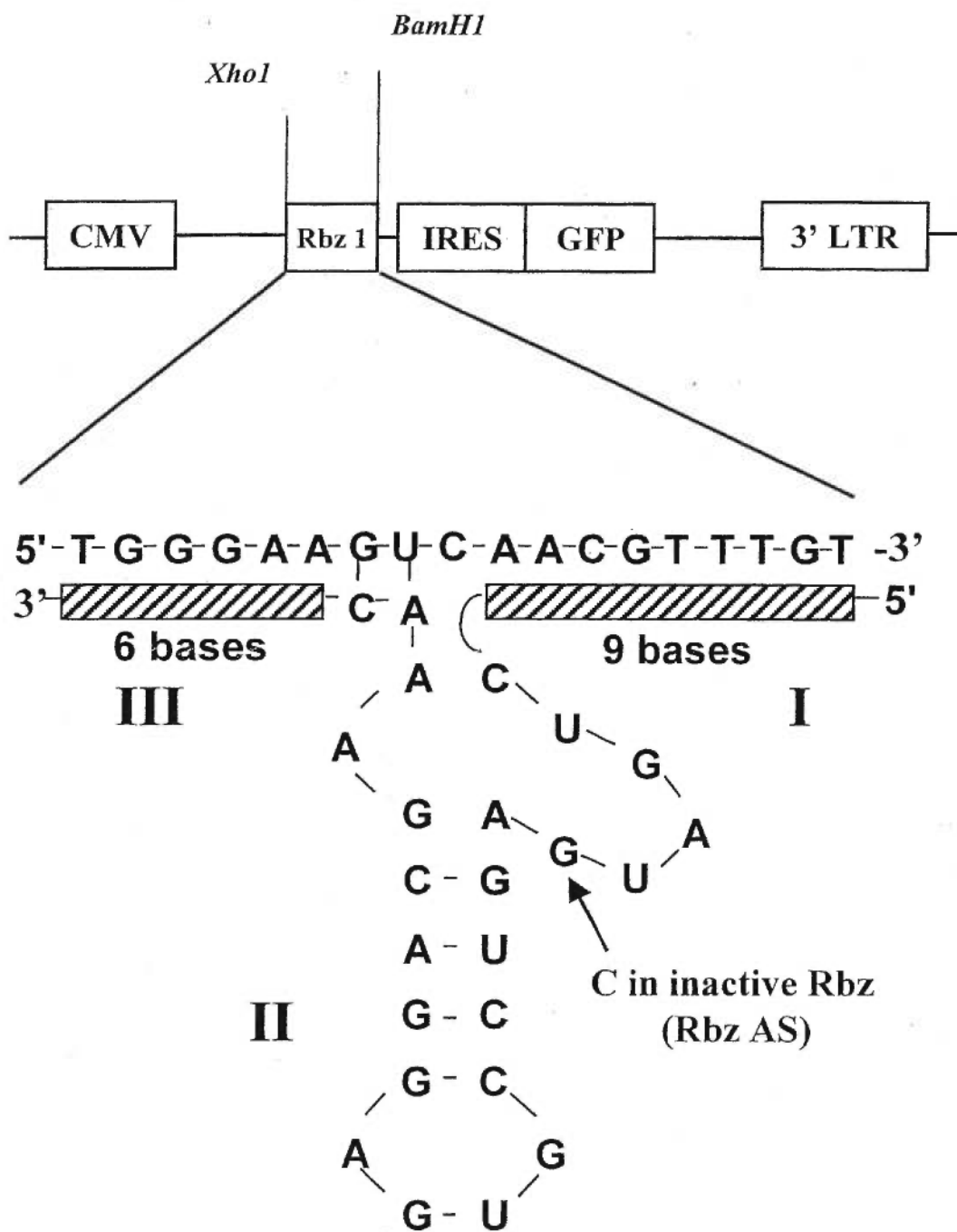


Figure 9.2 Structure of the pAP2-Rbz-IRES-GFP retroviral expression vector indicating the cloning site of the ribozyme cDNA. This vector was derived from the murine stem cell virus (MSCV). Also indicated is the schematic representation of the hammerhead Rbz 1 designed to cleave the dCK RNA. For the inactive ribozyme, the indicate guanine is replaced by a cytosine.

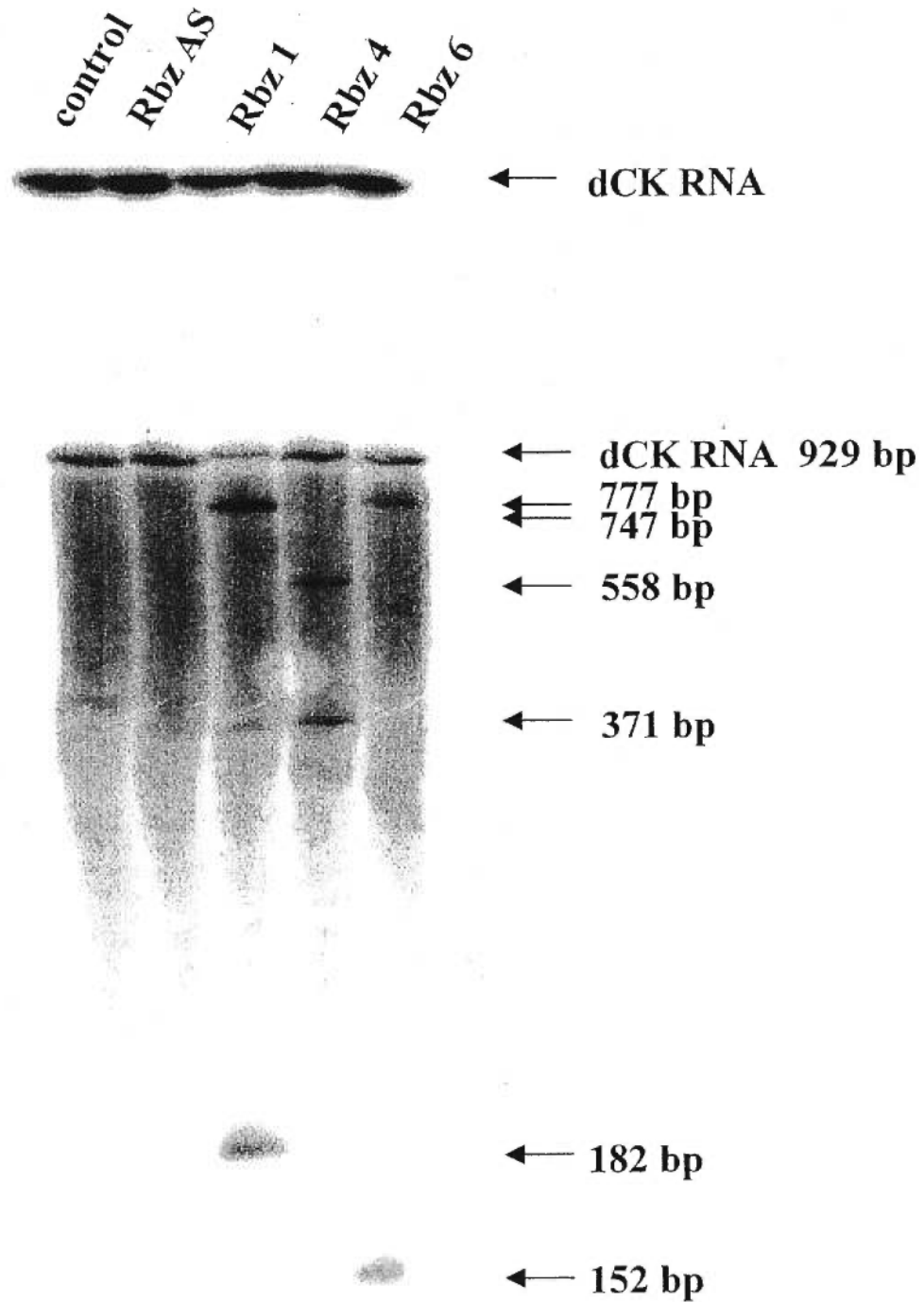


Figure 9.3 Denaturing polyacrylamide electrophoresis of cleavage products from radioactive dCK RNA after incubation with different ribozymes. The RNA (50 nM) was incubated with 250 nM of the indicated ribozymes for 30 minutes at 37°C. Rbz 1, 4 and 6 cleaved RNA to give fragments size as predicted by cut sites. The band at the top of the gel is thought to be the complete dCK RNA that was not completely denatured.

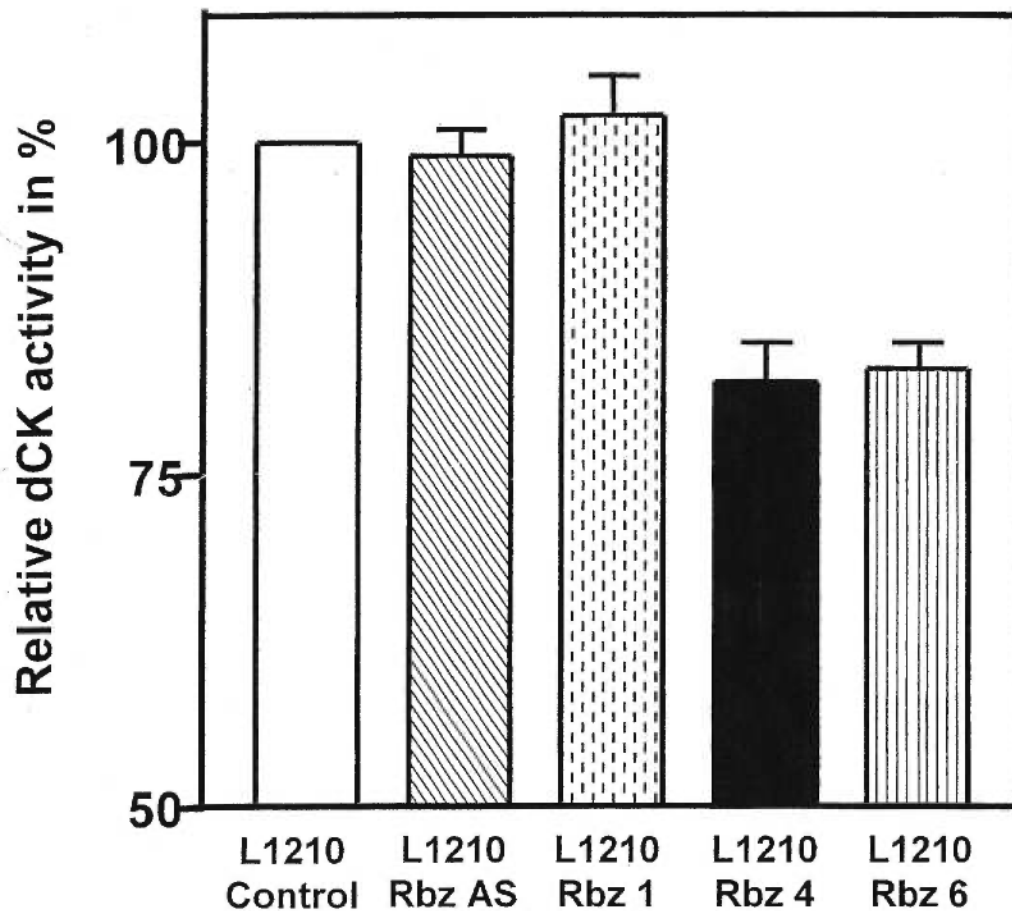


Figure 9.4 Reduction in dCK activity in L1210 murine leukemic cells by specific ribozymes. The cells were stably transduced with the pAP2-Rbz-IRES-GFP vector and showed over 80% GFP expression. Enzyme assays were performed on the cytosol from the control and transduced cells. The bar and the vertical line represent the mean values and SD, respectively, $n = 3$. The student's *t* test on the differences between the Rbz AS and Rbz 4 or 6 showed a level of significance with *p* values < 0.024 and < 0.016 , respectively.

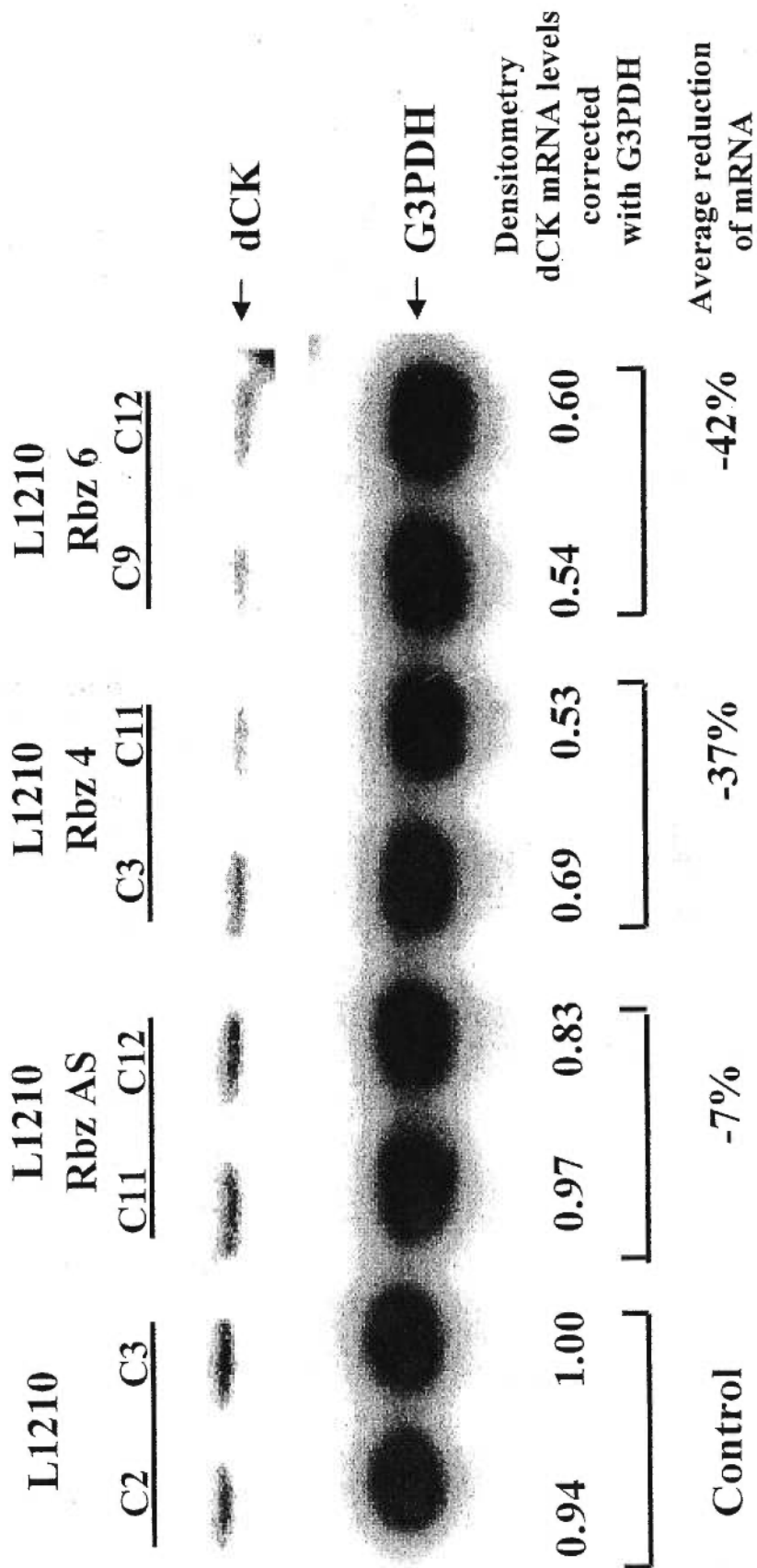


Figure 9.5 Northern blot analysis of mRNA levels of dCK and G3PDH from control and L1210 murine transduced with different ribozymes. Total RNA (15 µg) from each indicated clones was hybridized with radioactive probes of dCK and G3PDH. Densitometric analyses were performed with a PhosphorImager and results reported as the signal intensity of dCK over G3PDH arbitrarily fixed at 1.0 relative to the C3 control cells. The average reduction in dCK mRNA was obtained by designation of an average densitometric values of 1 for the control cells for comparison to the average values for the Rbz treated cells.

Discussion

Although substantial improvements have been made in cancer treatment using new drugs or by the optimal use of existing drugs, the prolongation of patient survival with advanced metastatic disease is still a major obstacle. In an attempt to overcome this problem, high dose chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue has been introduced into clinical trial with some promising results (28). The rationale for this approach is to overcome the major side effect of anticancer drugs, hematopoietic toxicity. Another way to eliminate this problem is to transduce normal hematopoietic stem cell with drug resistance genes to protect them from drug toxicity. This approach has been introduced into clinical trial for the MDR gene (29,30).

Cytosine nucleoside analogs have shown promising activity in cancer therapy, but their dose intensity is limited by the myelosuppression that they produce. Since tumor cells that lack dCK are drug resistant to these analogs, the gene for this enzyme has potential use in cancer gene therapy. The rationale would be to inactivate dCK in hematopoietic stem cells to make them resistant to deoxycytidine nucleoside analogs. These modified stem cells have the potential to eliminate the hematopoietic toxicity produced by these analogs and permit the use of high dose chemotherapy with a curative goal.

In the present study, we describe the design and synthesis of three ribozymes directed against the murine dCK. We choose the murine dCK for this study for future evaluation in animal models. Our studies revealed that Rbz 1, 4 and 6 were all capable of cleaving *in vitro* the dCK RNA substrate at specific sites with more or less to same efficacy (figure 3). In the transduced murine L1210 cell line, Rbz 1 did not reduce dCK enzyme activity, whereas Rbz 4 and Rbz 6 produced a significant reduction in activity (figure 4). Clones of these cells were analyzed for the level of dCK mRNA by Northern blot (figure 5). Interestingly, some clones containing Rbz 4 or Rbz 6 showed up to over 40% reduction in their dCK mRNA level. Unfortunately, these clones did not show resistance to ARA-C, suggesting that the reduction in dCK mRNA was not sufficient to confer drug resistance to ARA-C. One possible explanation for the lack of correlation between the reduction in the dCK levels and drug resistance in the L1210 cells is that this

<20%
no beneficial
effect on
drug resistance
and ~~survival~~
did not show
cell death

murine cell line expresses very high levels of dCK. Drug resistance may only become apparent if the ribozyme reduces dCK activity to a greater extent than what we observed.

Our *in vitro* data show that the active ribozymes cut less than 50% of dCK mRNA suggesting that the target sites may exist in equilibrium with folding structures that are resistant to ribozyme cleavage. We base our interpretation on the fact that *in vitro* analysis failed to completely digest the substrate even under conditions where the ribozyme was in 10-fold excess over the substrate. Another possible explanation is that cellular proteins may bind to the dCK mRNA interfering with the hybridization of the ribozyme. Some of these proteins may be possibly involved in the post-transcriptional modification of dCK mRNA (31). We suspect that the complete incapacity of Rbz 1 to cleave the target RNA *in vivo* was for this reason.

In order to increase the effectiveness of ribozymes other target sites, in addition to GUC, should also be considered as potential cleavage sites (32). Moreover, possible cleavage sites situated in the non transcribed regions may be interesting targets since antisense oligonucleotides directed to the 3' non transcribe region of the human dCK mRNA were reported to be effective to reduce its expression (23). For ribozymes to function as therapeutic agents one must obtain their adequate expression in target cells. The choice of the optimal expression cassette for the ribozyme is an important issue. In our laboratory the retroviral promoter of our ribozyme construct proved to be very efficient to express different genes in various cell lines. The use of GFP as a marker for gene expression for our ribozyme construct permitted us to select clones with elevated ribozyme expression. However, these clones did not show an extensive reduction in dCK activity suggesting that the ribozyme cleavage was influenced by other factors not related to promoter efficacy.

In addition, we tested the expression vector, pH β APr-1-neo (33), based on previous reports that this vector could efficiently deliver ribozyme molecules into target cells (34,35). Unfortunately, the selected transduced cells failed to show a reduction in the dCK enzyme activity, despite RT-PCR detection of our ribozymes. This observation suggested to us that the β -actin promoter of this vector was not very efficient to express our ribozymes in L1210 cells. Other promoters can be tested for our ribozymes, such as the RNA polymerase III promoter, which is reported to be one of the strongest promoters

clearly, a 20% reduction of β -actin is not sufficient what about protein level of dck.
this is the most important end point

to express ribozymes (36). Another approach reported to increase the effectiveness of ribozymes is to attach a short tRNA sequence to it to increase its resistance to enzymatic degradation (37).

Ribozymes directed against the dCK to produce drug resistance to cytosine nucleoside analogs have the potential to be used as an *in vivo* selectable marker. We have reported that CD also has this potential (12). It may be possible to combine these two genes in a bicistronic expression cassette to produce additive or synergistic drug resistance. Such a vector may have interesting therapeutic applications. } ?!

In conclusion, we have demonstrated the proof of principle that ribozymes can be designed to cut dCK mRNA and reduce enzyme activity in target cells. Further improvements are needed to increase the effectiveness of the anti-dCK ribozymes so that they can confer significant drug resistance to deoxycytidine analogs for use in cancer therapy and as a selectable marker for other therapeutic genes.

Acknowledgments

This work was supported by a grant MOP-13754 from the Canadian Institutes of Health Research. C.M.B is a recipient of a studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec.

References

1. Plagemann,P.G., Marz,R., and Wohlhueter,R.M. (1978) Transport and metabolism of deoxycytidine and 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine into cultured Novikoff rat hepatoma cells, relationship to phosphorylation, and regulation of triphosphate synthesis. *Cancer Res.* **38**, 978-989.
2. Stegmann,A.P., Honders,W.H., Willemze,R., Ruiz,v.H., V, and Landegent,J.E. (1995) Transfection of wild-type deoxycytidine kinase (dck) cDNA into an AraC- and DAC-resistant rat leukemic cell line of clonal origin fully restores drug sensitivity. *Blood* **85**, 1188-1194.
3. Heinemann,V., Hertel,L.W., Grindey,G.B., and Plunkett,W. (1988) Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'- difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* **48**, 4024-4031.
4. Keating,M.J., McCredie,K.B., Bodey,G.P., Smith,T.L., Gehan,E., and Freireich,E.J. (1982) Improved prospects for long-term survival in adults with acute myelogenous leukemia. *JAMA* **248**, 2481-2486.
5. Hertel,L.W., Boder,G.B., Kroin,J.S., Rinzel,S.M., Poore,G.A., Todd,G.C., and Grindey,G.B. (1990) Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'- deoxycytidine). *Cancer Res.* **50**, 4417-4422.
6. Adjei,A.A., Erlichman,C., Sloan,J.A., Reid,J.M., Pitot,H.C., Goldberg,R.M., Peethambaram,P., Atherton,P., Hanson,L.J., Alberts,S.R., and Jett,J. (2000) Phase I and pharmacologic study of sequences of gemcitabine and the multitargeted antifolate agent in patients with advanced solid tumors. *J.Clin.Oncol.* **18**, 1748-1757.
7. Momparler,R.L., Bouffard,D.Y., Momparler,L.F., Dionne,J., Belanger,K., and Ayoub,J. (1997) Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* **8**, 358-368.

8. Eliopoulos,N., Beausejour,C., and Momparler,R.L. (1999) Chemoprotection against cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Prog.Exp.Tumor Res.* **36** , 124-142.
9. Bertino,J.R. (1990) "Turning the tables"--making normal marrow resistant to chemotherapy [editorial; comment]. *J.Natl.Cancer Inst.* **82**, 1234-1235.
10. Sorrentino,B.P., Brandt,S.J., Bodine,D., Gottesman,M., Pastan,I., Cline,A., and Nienhuis,A.W. (1992) Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* **257**, 99-103.
11. Flasshove,M., Banerjee,D., Leonard,J.P., Mineishi,S., Li,M.X., Bertino,J.R., and Moore,M.A. (1998) Retroviral transduction of human CD34+ umbilical cord blood progenitor cells with a mutated dihydrofolate reductase cDNA. *Hum.Gene Ther.* **9**, 63-71.
12. Davis,B.M., Koc,O.N., Reese,J.S., and Gerson,S.L. (1999) O6-benzylguanine-resistant mutant MGMT genes improve hematopoietic cell tolerance to alkylating agents. *Prog.Exp.Tumor Res.* **36**, 65-81.
13. Beausejour,C.M., Le,N.L., Letourneau,S., Cournoyer,D., and Momparler,R.L. (1998) Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicistronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate. *Hum.Gene Ther.* **9**, 2537-2544.
14. Eliopoulos,N., Bovenzi,V., Le,N.L., Momparler,L.F., Greenbaum,M., Letourneau,S., Cournoyer,D., and Momparler,R.L. (1998) Retroviral transfer and long-term expression of human cytidine deaminase cDNA in hematopoietic cells following transplantation in mice. *Gene Ther.* **5**, 1545-1551.
15. Camiener,G.W. and Smith,C.G. (1965) Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem.Pharmacol.* **14**, 1405-1416.

16. Steuart,C.D. and Burke,P.J. (1971) Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nat.New Biol.* **233**, 109-110.
17. Eliopoulos,N., Cournoyer,D., and Momparler,R.L. (1998) Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **42**, 373-378.
18. Allay,J.A., Persons,D.A., Galipeau,J., Riberdy,J.M., Ashmun,R.A., Blakley,R.L., and Sorrentino,B.P. (1998) In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat.Med.* **4**, 1136-1143.
19. Davis,B.M., Koc,O.N., and Gerson,S.L. (2000) Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase- transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood* **95**, 3078-3084.
20. Funato,T., Satou,J., Nishiyama,Y., Fujimaki,S., Miura,T., Kaku,M., and Sasaki,T. (2000) In vitro leukemia cell models of Ara-C resistance. *Leuk.Res.* **24**, 535-541.
21. Kobayashi,H., Kim,N., Halatsch,M.E., and Ohnuma,T. (1994) Specificity of ribozyme designed for mutated DHFR mRNA. *Biochem.Pharmacol.* **47**, 1607-1613.
22. Gao,Z., Gao,Z., Fields,J.Z., and Boman,B.M. (1999) Tumor-specific expression of anti-mdr1 ribozyme selectively restores chemosensitivity in multidrug-resistant colon-adenocarcinoma cells. *Int.J.Cancer* **82**, 346-352.
23. Funato,T., Ishii,T., Kambe,M., Scanlon,K.J., and Sasaki,T. (2000) Anti-K-ras ribozyme induces growth inhibition and increased chemosensitivity in human colon cancer cells [In Process Citation]. *Cancer Gene Ther.* **7**, 495-500.
24. Wang,F.S., Kobayashi,H., Liang,K.W., Holland,J.F., and Ohnuma,T. (1999) Retrovirus-mediated transfer of anti-MDR1 ribozymes fully restores chemosensitivity of P-glycoprotein-expressing human lymphoma cells. *Hum.Gene Ther.* **10**, 1185-1195.

25. Zuker,M. (1989) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**, 48-52.
26. Momparler,R.L., Onetto-Pothier,N., and Momparler,L.F. (1990) Comparison of antineoplastic activity of cytosine arabinoside and 5-aza- 2'-deoxycytidine against human leukemic cells of different phenotype. *Leuk.Res.* **14**, 755-760.
27. Birikh,K.R., Heaton,P.A., and Eckstein,F. (1997) The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur.J.Biochem.* **245**, 1-16.
28. Grupp,S.A., Stern,J.W., Bunin,N., Nancarrow,C., Ross,A.A., Mogul,M., Adams,R., Grier,H.E., Gorlin,J.B., Shamberger,R., Marcus,K., Neuberg,D., Weinstein,H.J., and Diller,L. (2000) Tandem High-Dose Therapy in Rapid Sequence for Children With High-Risk Neuroblastoma. *J.Clin.Oncol.* **18**, 2567-2575.
29. Rahman,Z., Kavanagh,J., Champlin,R., Giles,R., Hanania,E., Fu,S., Zu,Z., Mehra,R., Holmes,F., Kudelka,A., Claxton,D., Verschraegen,C., Gajewski,J., Andreeff,M., Heimfeld,S., Berenson,R., Ellerson,D., Calvert,L., Mechetner,E., Holzmayr,T., Dayne,A., Hamer,J., Bachier,C., Ostrove,J., and Deisseroth,A. (1998) Chemotherapy immediately following autologous stem-cell transplantation in patients with advanced breast cancer. *Clin.Cancer Res.* **4**, 2717-2721.
30. Cowan,K.H., Moscow,J.A., Huang,H., Zujewski,J.A., O'Shaughnessy,J., Sorrentino,B., Hines,K., Carter,C., Schneider,E., Cusack,G., Noone,M., Dunbar,C., Steinberg,S., Wilson,W., Goldspiel,B., Read,E.J., Leitman,S.F., McDonagh,K., Chow,C., Abati,A., Chiang,Y., Chang,Y.N., Gottesman,M.M., Pastan,I., and Nienhuis,A. (1999) Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients [see comments]. *Clin.Cancer Res.* **5**, 1619-1628.
31. Hengstschlager,M., Denk,C., and Wawra,E. (1993) Cell cycle regulation of deoxycytidine kinase. Evidence for post- transcriptional control. *FEBS Lett.* **321**, 237-240.

32. Shimayama,T., Nishikawa,S., and Taira,K. (1995) Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes. *Biochemistry* **34**, 3649-3654.
33. Gunning,P., Leavitt,J., Muscat,G., Ng,S.Y., and Kedes,L. (1987) A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 4831-4835.
34. Yamazaki,H., Kijima,H., Ohnishi,Y., Abe,Y., Oshika,Y., Tsuchida,T., Tokunaga,T., Tsugu,A., Ueyama,Y., Tamaoki,N., and Nakamura,M. (1998) Inhibition of tumor growth by ribozyme-mediated suppression of aberrant epidermal growth factor receptor gene expression [see comments]. *J.Natl.Cancer Inst.* **90**, 581-587.
35. Yokoyama,Y., Takahashi,Y., Shinohara,A., Lian,Z., Wan,X., Niwa,K., and Tamaya,T. (1998) Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res.* **58**, 5406-5410.
36. Thompson,J.D., Ayers,D.F., Malmstrom,T.A., McKenzie,T.L., Ganousis,L., Chowrira,B.M., Couture,L., and Stinchcomb,D.T. (1995) Improved accumulation and activity of ribozymes expressed from a tRNA- based RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2259-2268.
37. Yuyama,N., Ohkawa,J., Inokuchi,Y., Shirai,M., Sato,A., Nishikawa,S., and Taira,K. (1992) Construction of a tRNA-embedded-ribozyme trimming plasmid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **186**, 1271-1279.

TROISIÈME PARTIE
DISCUSSION

CHAPITRE 10 : Discussion

La plupart des protocoles de thérapie génique sont limités par l'efficacité des techniques de transfert génique. À ce jour, les vecteurs utilisés en clinique ne permettent pas d'obtenir un transfert élevé et une expression à long terme du transgène chez les cellules souches. Ces dernières sont responsables de la repopulation d'un compartiment cellulaire et par conséquent de l'expression à long terme du transgène. Les vecteurs lentiviraux pourraient être une solution pour augmenter l'efficacité de transfert à ces cellules (Naldini et al., 1996; Mochizuki et al., 1998). Toutefois, ces vecteurs très prometteurs sont encore inadmissibles aux études cliniques pour des raisons bioéthiques. De plus, même en supposant que les vecteurs lentiviraux rencontrent les attentes établies, l'expression adéquate (à des niveaux suffisamment élevés pour observer un effet thérapeutique) et à long terme du transgène ne sera pas solutionnée. En effet, une diminution (parfois complète) de l'expression du transgène est fréquemment rapportée suite à une inhibition transcriptionnelle et/ou suite à des contrôles épigénétiques des promoteurs viraux (Hoeben et al., 1991; Challita et Kohn 1994).

Le phénomène naturel de résistance aux drogues pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des procédés de thérapie génique. Au début des années 90, le Dr Bertino, a proposé de transférer les gènes de résistance aux drogues utilisées en chimiothérapie aux tissus sains, principalement les cellules hématopoïétiques, afin de les protéger contre l'action cytotoxique de ces drogues (Bertino, 1990). Les gènes de résistance les plus étudiés à ce sujet sont les gènes MDR, DHFR et MGMT (Sorrentino et al., 1992, Li et al., 1994; Allay et al., 1995). En 1996, notre équipe a démontré le potentiel du gène de la CD pour conférer une résistance aux analogues de la CdR, des drogues couramment utilisées dans le traitement de certains types de cancer (Mompalmer et al., 1996). Ces résultats ont été confirmés par Schröder et al., (1996) ainsi que Neff et Blau, (1996). Le concept de chimioprotection est très intéressant pour la thérapie du cancer, puisqu'il laisse entrevoir la possibilité d'intensifier les doses de façon sécuritaire à des niveaux plus curatifs. Néanmoins, afin de permettre une chimioprotection significative, une large proportion des cellules hématopoïétiques du patient doivent exprimer le transgène de façon efficace. Bien que très intéressant, ce concept n'améliore pas directement les techniques de transfert ni l'expression à long terme du transgène.

Cependant, les gènes de résistance utilisés pour la chimioprotection ont le potentiel d'agir comme marqueur de sélection. Les cellules exprimant le gène de résistance (ou marqueur de sélection) ont l'avantage de se répliquer de façon préférentielle en présence de drogue. Ce phénomène de sélection résulte en l'enrichissement des cellules modifiées et permet de contourner le problème du transfert viral. L'application de ce concept aux cellules souches rendrait possible une chimioprotection efficace. De plus, un gène de résistance jumelé à un gène thérapeutique sur un vecteur bicistronique pourrait avoir une implication pour le traitement de maladies génétiques. Sous l'influence de la sélection, le gène de résistance favoriserait l'expansion de clones cellulaires exprimant à de hauts niveaux le gène thérapeutique.

Les concepts de chimioprotection et de sélection utilisant les gènes MDR, DHFR et MGMT sont efficaces et bien documentés *in vitro* et chez la souris. Toutefois, ils tardent à montrer des résultats significatifs chez l'humain. Le gène de la CD est un gène de résistance susceptible d'être un excellent candidat pour conférer une chimioprotection et agir comme marqueur de sélection. Il s'avérerait donc essentiel d'en évaluer le potentiel dans l'application de ces deux concepts.

10.1 Vecteur bicistronique DHFR-CD (article 1)

Initialement, les travaux de notre laboratoire ont montré qu'il était possible de conférer une résistance à l'ARA-C aux cellules primaires de moelle osseuse murine lorsque ces dernières expriment fortement le gène de la CD (Eliopoulos et al., 1998a). Notre premier objectif était donc d'évaluer la possibilité de conférer une résistance *in vitro* à deux classes de drogues par l'expression simultanée de deux gènes de résistance différents. Cette approche de chimioprotection à plus d'une classe de drogues est d'un grand intérêt clinique étant donné leur utilisation fréquente en combinaison dans le traitement de divers cancers.

Pour ce faire, nous avons construit un vecteur d'expression rétroviral bicistronique (pMFG-DHFR-IRES/CD) dérivé du MoMLV contenant deux gènes de résistance, soit le gène de la CD et celui de la DHFR F31S (Figure 7.1). Des clones et des populations mixtes de fibroblastes de type NIH/3T3 infectés avec ce vecteur montrent une résistance hautement significative à l'ARA-C et au MTX (Chapitre 7). La mesure de

l'activité enzymatique de la CD et de la DHFR est proportionnelle à la résistance conférée à leur drogue respective. Ces résultats montrent aussi que pour induire une résistance, il est nécessaire d'augmenter de façon importante l'activité de la CD comparativement à son niveau endogène (plus de 300X). Par contre, une faible augmentation (moins de 10X) de l'activité de la DHFR est suffisante pour induire une résistance au MTX. De plus, la résistance conférée par la faible augmentation de l'activité de la DHFR confère une résistance plus grande au MTX (plus de 100X la DL 50) comparativement à la résistance à l'ARA-C (environ 10X la DL 50) conférée par une forte augmentation de la CD.

Cette discordance peut s'expliquer de deux principales façons. Premièrement, la résistance au MTX est évaluée dans un milieu de culture cellulaire *in vitro* exempt de thymidine extracellulaire, puisque cette dernière peut prévenir l'action cytotoxique du MTX. Dans ce contexte, la sensibilité au MTX des cellules contrôles est donc fortement augmentée. Afin de reproduire cette condition *in vivo*, il est nécessaire d'utiliser un inhibiteur du transport nucléosidique (Allay et al., 1998). Deuxièmement, l'enzyme de la DHFR utilisée est une forme mutante (F31S) résistante à l'inhibition par le MTX tout en ayant conservé une excellente activité enzymatique (Patel et al., 1997).

Les formes mutantes des protéines DHFR, P-gp et MGMT permet nettement d'augmenter le potentiel de chimio-protection de leur formes sauvages respectives. Des formes mutantes de la CD ayant une activité de désamination accrue et/ou une affinité plus grande pour les analogues de la CdR (réduisant ainsi la compétition des analogues entre la CdK et la CD) serait un atout majeur dans l'utilisation de la CD comme gène de résistance. La possibilité de développer de tels mutants est envisageable puisque le site catalytique de la CD à été récemment identifié (Somasekaram et al., 1999).

Également, il apparaissait essentiel de vérifier la capacité de notre vecteur à conférer une double résistance aux cellules de moelle osseuse de souris. De façon très intéressante, le niveau de protection à l'ARA-C de ces cellules s'est avéré nettement supérieur à celui obtenu chez les fibroblastes et ce tout en utilisant le même vecteur d'expression. Cette différence peut s'expliquer par la plus grande sensibilité à l'ARA-C des cellules hématopoïétiques comparativement aux fibroblastes. Il est possible que le

promoteur viral (LTR du MoMLV) utilisé de même que l'initiation de la traduction à partir de la séquence IRES soient supérieurs chez les cellules hématopoïétiques.

De plus, chez ces cellules, une résistance similaire à l'ARA-C a été obtenue qu'on vecteur mono ou bicistronique (pMFG-CD et pMFG-DHFR-IRES/CD) soit utilisé. Ces résultats sont étonnants puisqu'il est généralement reconnu que la traduction en aval d'une séquence IRES est inférieure à une traduction cap-dépendent (Sugimoto et al., 1994; Sugimoto et al., 1995). La taille relativement petite des deux gènes (environ 600 pb pour la DHFR et 440 pb pour la CD) contribue certainement à obtenir, *in vivo*, des structures secondaires et tertiaires d'ARNm moins encombrantes et permettant un positionnement plus efficace du ribosome à la séquence IRES. La grande taille du gène MDR (plus de 3.8 kb) pourrait expliquer pourquoi l'expression d'un ADNc lié à la combinaison MDR-IRES semble être moins efficace (Sugimoto et al., 1995).

Cependant, l'expression conjointe des gènes MDR et MGMT chez des cellules souches hématopoïétiques murines, par l'intermédiaire d'un vecteur bicistronique, permet de conférer une double résistance aux drogues (Jelinek et al., 1999; Suzuki et al., 1997). Chez le même type de cellules, l'expression conjointe des gènes DHFR et MDR montre également la possibilité à conférer une double résistance aux drogues respectives de chacun de ces gènes (Galipeau et al., 1997).

Récemment, un autre gène de résistance potentiel, la glutathione-S-transférase Yc (GST-Yc), s'est montré en mesure de conférer une résistance aux agents alkylants (Létourneau et al., 1996). Des travaux faits en collaboration avec notre laboratoire ont montré que l'expression des gènes GST-Yc et CD par un vecteur bicistronique confère une double résistance *in vitro* à la chlorambucil et à l'ARA-C (Létourneau et al., 2000).

Ultérieurement, il sera très intéressant d'évaluer le potentiel de chimio-protection conféré par les gènes CD et DHFR *in vivo* chez la souris. Le groupe du Dr Bertino a récemment démontré le potentiel d'une protéine de fusion DHFR/CD à conférer une double résistance aux MTX et à l'ARA-C *in vitro* (Sauerbrey et al., 1999). Ce groupe possède l'expertise nécessaire à la démonstration *in vivo* chez des souris du potentiel de chimio-protection du gène DHFR. En effet, ils ont montré que des souris transplantées pour l'expression de la DHFR F31S sont protégées contre des doses toxiques de MTX (Zhao et al., 1997). De plus, lorsque ces souris sont inoculées avec des cellules

d'adénocarcinome mammaire, elles montrent une augmentation de leur taux de survie suite à d'intenses doses de MTX comparativement aux souris contrôle (Zhao et al., 1997). Ces chercheurs évaluent présentement, dans un modèle animal similaire, le potentiel curatif et de chimioprotection de la protéine de fusion DHFR/CD suite à des doses de MTX et d'ARA-C (communication personnelle). Dans l'éventualité où ces résultats seraient positifs, leur prochain objectif consistera à évaluer cette protéine de fusion chez l'homme au cours d'essais cliniques.

En somme, la démonstration de la possibilité d'exprimer de façon efficace deux gènes de résistance est essentielle pour assurer une chimioprotection à plusieurs classes de drogues utilisées dans le traitement de divers cancers. De plus, des vecteurs bicistroniques efficaces assurent la possibilité d'exprimer le gène de la CD conjointement avec celui d'un gène thérapeutique pour le traitement d'une maladie génétique utilisant un protocole de sélection *in vivo*.

10.2 Potentiel de sélection du gène CD (article 2)

Notre second objectif consistait à évaluer la capacité du gène CD à agir en tant que marqueur de sélection. Un gène de sélection doit comporter certaines propriétés spécifiques. Il doit être non-immunogénique (chez l'homme) et suffisamment petit afin de pouvoir facilement lui associer un gène thérapeutique dans un vecteur d'expression. Or, le gène de la CD humaine présente ces deux caractéristiques. Nous désirions ensuite savoir si le gène CD était en mesure de conférer une résistance à plus d'une drogue de la classe des analogues de la CdR. Ceci pourrait s'avérer essentiel dans la mesure où des essais cliniques chez l'homme restreindraient l'utilisation de l'ARA-C, par exemple, puisque les effets secondaires de certains analogues de la CdR pourraient être contre-indiqués chez certains patients.

De ce fait, *in vitro* chez des cellules de la moelle osseuse de souris, nous avons évalué la possibilité du gène CD à conférer une résistance à la fois à la dFdC et à la 5-AZA-CdR (Chapitre 8). Pour ce faire, nous avons construit un vecteur d'expression rétroviral bicistronique (pMSCV-CD-IRES/GFP) dérivé du MSCV contenant le gène de la CD et la protéine GFP. Ce vecteur comporte certains avantages sur le pMFG-DHFR-IRES/CD, dont la possibilité de visualiser (la protéine GFP) et de quantifier facilement la

proportion de cellules exprimant les transgènes. En utilisant ce vecteur, nous avons obtenu une infection presque complète de cellules de moelle osseuse murine: plus de 80% de ces cellules modifiées ont montré une résistance à la dFdC. Une résistance moins nette mais tout de même significative, a aussi été observée contre la 5-AZA-CdR. Dans les conditions expérimentales utilisées (culture cellulaire en méthylcellulose) il était impossible d'obtenir une inhibition de croissance complète des cellules contrôles exposées à la 5-AZA-CdR. En effet, cette dernière est une drogue plutôt instable chimiquement dotée d'un mécanisme d'action particulier dont l'effet cytotoxique s'estompe après 24 heures *in vitro*. Or, il est impossible de renouveler la 5-AZA-CdR en milieu méthylcellulose. Le faible écart entre les cellules modifiées ou non avec le gène de la CD pour leur résistance à la 5-AZA-CdR peut s'expliquer par cette raison.

Ensuite, il était important de vérifier si la CD pouvait lorsque combinée avec les analogues de la CdR, conférer un pouvoir de sélection *in vitro*. Des cellules leucémiques de type L1210 ont donc d'abord été infectées avec le vecteur pMSCV-CD-IRES/GFP puis diluées avec de cellules contrôles non-infectées à un ratio de 1:4 (Chapitre 8). Par la suite, elles ont été cultivées et sélectionnées en présence d'ARA-C, de dFdC et de 5-AZA-CdR. Après sélection, la proportion de cellules GFP⁺ est passée de 20%, à près de 100%. Ces résultats montrent clairement le potentiel de sélection du gène CD en combinaison avec les analogues de la CdR.

Suite aux résultats de sélection fort positifs obtenus chez les cellules L1210, nous avons répété le même type d'expérience sur des cellules primaires de la moelle osseuse en culture *ex vivo*. Malheureusement, il fut impossible d'observer un quelconque avantage de croissance chez ces cellules exprimant la CD en présence d'ARA-C. Ces résultats décevants compromettaient l'utilisation du gène CD comme marqueur de sélection *in vivo*. Toutefois, des études plus poussées ont révélé que l'incapacité de sélectionner ces cellules était du à la présence d'un phénomène de protection *in vitro*. En effet, la relâche extracellulaire de la protéine CD provenant du cytoplasme de cellules mortes préalablement infectées est suffisante pour protéger les cellules environnantes non-infectées. Ce phénomène de protection se produit uniquement avec les cellules primaires puisqu'une grande proportion d'entre elles sont totalement différenciées et par conséquent sur le point de relâcher leur contenu cytoplasmique au milieu de culture. De

plus, les cellules primaires sont cultivées à haute densité comparativement aux cellules transformées L1210. Cet artefact de culture ne devrait pas se reproduire *in vivo* étant donné la rapide élimination de la CD circulante par les processus physiologiques normaux.

Afin de confirmer notre hypothèse, des expériences *in vivo* chez la souris ont été initiées. Le choix de la lignée de souris s'est avéré primordial et a renforcé l'importance d'avoir un marqueur de sélection non-immunogénique. En effet, nous n'avons pas été en mesure de montrer une présence à long terme (i.e: plus d'un mois) de cellules infectées (CD-IRES/GFP) chez des souris balb/c transplantées. Chez elles, la protéine GFP est très immunogénique, menant à l'élimination complète de toutes les cellules l'exprimant. Certains épitopes de la protéine GFP sont si immunogéniques qu'ils restreignent même la croissance de cellules tumorales les exprimant chez cette lignée de souris (Gambotto et al., 2000). La forte immunogénicité de la protéine GFP est toutefois dépendante de la lignée de souris sélectionnée puisque la lignée de souris C57/bl6 supporte mieux cette protéine *in vivo* (Dr Gambotto, communication personnelle).

Nous avons donc entrepris de nouvelles expériences en utilisant, cette fois-ci, la lignée de souris C57/bl6. Avec ces dernières, nous avons pu démontrer quatre mois après la transplantation, par FACS et par PCR, la présence de cellules modifiées pour l'expression des protéines CD et GFP. Le pouvoir de sélection du gène CD chez ce type de souris n'a toutefois pas encore été démontré et pourrait s'avérer une tâche ardue. Bien que la pharmacocinétique de l'ARA-C chez la souris soit bien définie, il pourrait s'avérer nécessaire de réaliser plusieurs expériences préliminaires visant à déterminer la posologie optimale à utiliser de façon à favoriser une sélection *in vivo*. Le niveau d'expression des transgènes CD-IRES/GFP *in vivo* est très difficile à évaluer et est directement responsable du choix de l'intensité de la dose d'ARA-C à utilisée.

Nous demeurons très confiants de pouvoir confirmer le potentiel de sélection *in vivo* du gène CD à court ou à moyen terme. Dans l'éventualité où nous pourrions obtenir des souris exprimant le transgène CD dans une large proportion de leurs cellules hématopoiétiques, des expériences visant à démontrer le potentiel de chimioprotection aux analogues de la CdR seront entreprises. Des vecteurs bicistroniques exprimant conjointement le gène de la CD et un gène thérapeutique (pour le traitement de l'anémie

ou de l'hémophilie, par exemple) seront aussi construits et évalués pour leur efficacité à renverser le phénotype de ces maladies dans un modèle animal de souris.

10.3 Les ribozymes comme agents thérapeutiques (article 3)

Finalement, nous avons évalué une approche alternative à l'augmentation de l'expression de la CD comme moyen d'induire une résistance aux analogues de la CdR. L'objectif de cette approche était d'abaisser l'expression de la protéine CdK responsable de l'activation des analogues de la CdR, lesquels sont des prodrogues (Chapitre 9). Des études montrent qu'une réduction de l'activité de la CdK est associée à une résistance aux analogues de la CdR (Ruiz van Haperen et al., 1994; Kroep et al., 1998). Le développement d'une méthode en mesure de réduire de façon stable et à long terme la CdK pourrait s'avérer très utile pour l'application des concepts de chimioprotection et de sélection utilisant les analogues de la CdR.

Pour l'application de ces concepts, la nécessité d'obtenir une inhibition stable et à long terme de la CdK, limitait l'emploi des oligonucléotides AS. L'utilisation des Rbz délivrés par un vecteur d'expression rétroviral permettant l'intégration génomique et l'expression à long terme de ces derniers a donc été retenue. De plus, les Rbz ont l'avantage de posséder une activité catalytique en mesure de digérer plus d'une molécule ARNm. Par conséquent, trois Rbz dirigés contre trois séquences distinctes distribuées sur la région transcrite de l'ARNm de la CdK ont été construits. Des expériences de synthèse *in vitro* ont révélé une spécificité digestive des trois Rbz évalués (Chapitre 9).

Ces Rbz ont ensuite été insérés dans un vecteur d'expression rétroviral dérivé du MSCV, le pAP2-Rbz-IRES/GFP, afin d'évaluer leur efficacité dans un modèle cellulaire. Des cellules leucémiques de type L1210 ont été infectées et leur activité pour la CdK a été évaluée. Deux Rbz se sont avérés être en mesure de réduire significativement l'activité de la CdK chez ces cellules. Chez des clones exprimant à de hauts niveaux ces deux Rbz (déterminé par mesure de la fluorescence de la GFP), nous avons enregistré une diminution allant jusqu'à 40% de l'ARNm de la CdK. Malheureusement, la diminution du niveau d'ARNm de la CdK (40%) ne semble pas être en corrélation directe avec une diminution de l'activité enzymatique de la CdK (20%) chez ces clones. Par conséquent,

nous n'avons pu obtenir une résistance significative aux analogues de la CdR chez les cellules L1210 modifiées.

Ces expériences constituent tout de même une excellente base sur laquelle des Rbz anti-CdK améliorés pourront être construits. Nous avons démontré qu'il est possible de couper spécifiquement l'ARN de la CdK et ainsi de réduire significativement son activité *in vivo*. Des Rbz ayant une activité catalytique supérieure pourront certainement conférer une résistance significative aux analogues de la CdR.

Dans le contexte de l'étude présentée au chapitre 9, la simple mesure de l'activité enzymatique de la dCK était suffisante afin de déterminer rapidement du potentiel de Rbz anti-dCK comme approche de chimioprotection. Néanmoins, il sera nécessaire d'évaluer directement la variation de l'expression protéique de la dCK pour le développement de Rbz anti-dCK améliorés. Il a déjà été démontré plus d'une fois que seulement une fraction de l'activité enzymatique totale d'une protéine est nécessaire pour que cette dernière accomplisse entièrement son rôle physiologique. De ce fait, une détermination de l'expression protéique basale de la dCK sera essentielle afin de déterminer de la capacité d'un antisens ou d'un Rbz à inhiber son action.

Le développement d'un Rbz anti-CdR plus performant nécessite également l'identification d'un site d'hybridation plus accessible du Rbz à l'ARNm. Aucune méthode n'est présentement disponible permettant l'identification avec certitude d'un site accessible structurellement et non protégé par des protéines cellulaires. Récemment, des oligonucléotides antisenses (OAS) dirigés contre l'ARNm de la CdK (région 3' non transcrite) se sont avérés aptes à conférer une résistance aux analogues de la CdR (Funato et la., 2000). Par conséquent, l'amélioration des Rbz anti-CdK devra prioritairement se faire par le choix d'un site de coupure du Rbz à la région 3' non-transcrite ciblé par ces OAS. D'autres modifications impliquant principalement la stabilité des Rbz devront également être considérées.

L'identification d'un Rbz anti-CdK montrant une certaine capacité à conférer une résistance aux analogues de la CdR en combinaison avec le gène de la CD pourrait être d'un grand intérêt. La petite taille des Rbz rend possible une association CD et Rbz anti-CdK sur un vecteur bicistronique. Un vecteur Rbz anti-CdK-IRES/CD ciblant deux voies distinctes du métabolisme des analogues de la CdR pourrait avoir un énorme potentiel de

chimio-protection ou de sélection. De plus, Lee et al., (1997) ont montré qu'il était possible de conserver l'activité catalytique d'un Rbz lorsque ce dernier est jumelé à une séquence IRES *in vivo*. L'action additive ou même synergistique de cette approche combinée pourrait permettre de limiter les effets négatifs de la réduction de l'expression d'un l'un ou l'autre de ces transgènes avec le temps *in vivo*.

En conclusion, les avantages du gène CD comme gène de résistance et de marqueur de sélection sont nombreux et justifient pleinement les efforts investis dans le but de les démontrer. Seul ou en combinaison avec un Rbz anti-CdK, le gène de la CD constitue une approche thérapeutique intéressante dans l'amélioration du traitement du cancer par les analogues de la CdR. Néanmoins, nous croyons que l'application avec succès de cette approche chez l'homme devra coïncider avec le raffinement des techniques de transfert des cellules souches.

10.4 Différentes approches pour améliorer les protocoles de thérapie génique

Il existe plusieurs moyens par lesquels les protocoles de transfert génique peuvent être améliorés. Le développement de nouveaux vecteurs comme les vecteurs lentiviraux avec une efficacité de transfert accrue chez la majorité des types cellulaires est un exemple. L'amélioration directe des modalités d'infection par la culture des cellules primaires hématopoiétiques en présence de cellules stromales ou de fragments de fibronectines (agissant à titre de support favorisant la prolifération et/ou l'infection) sont également des exemples (Shih et al., 1999). Toutefois, jusqu'à présent, les efforts de la communauté scientifique sont majoritairement orientés vers l'une des trois catégories suivantes.

Les cytokines

Les vecteurs rétroviraux peuvent uniquement intégrer leur matériel génétique au génome des cellules en réplique. Les cellules souches sont majoritairement quiescentes et il est très difficile de les infecter avec un haut rendement. À ce sujet, il a été suggéré d'induire leur prolifération *ex vivo* (au moyen de cytokines telles IL-3 et IL-6) dans le but de favoriser leur infection. Cependant, ces mêmes études ont démontré que la

stimulation *ex vivo* de la prolifération cellulaire peut restreindre l'implantation permanente de cellules modifiées chez un hôte préalablement irradié (Peters et al., 1996; Kittler et al., 1997; Tisdale et al., 1998).

Le concept de sélection *in vivo* utilisant des gènes de résistance peut être secondé par une stimulation *in vivo* à l'aide de cytokines. En effet, chez des souris, l'administration d'une dose de doxorubicine précédée d'une dose du facteur de cellules souches (*stem cell factor*, SCF) favorise d'avantage l'élimination de cellules souches comparativement à lorsque le SCF n'est pas administré (Blau et al., 1997). Ainsi, chez ces souris, dans la mesure où des cellules seraient modifiées avec le gène MDR, la reconstitution de leur système hématopoïétique serait faite majoritairement par les cellules souches modifiées.

Également, toujours en utilisant la propriété des cytokines, une alternative au concept de sélection avec des agents de chimiothérapie a été proposée. Cette alternative, très intéressante, permet de conférer un avantage de prolifération directe et réversible aux cellules modifiées. Cette approche est fondée sur la particularité qu'ont les récepteurs des cytokines à s'activer par homodimerisation suite à la liaison de leur ligand. La stratégie consiste donc à produire une protéine de fusion comprenant le domaine de signalisation d'un facteur de croissance et le site de liaison extracellulaire d'un composé synthétique appelé inducteur chimique de dimérisation. Ainsi, les cellules modifiées pour l'expression de cette protéine de fusion seront forcées de proliférer suite à l'ajout et à la liaison de l'inducteur dimérique. En effet, ce dernier stimulera l'homodimérisation des récepteurs du facteur de croissance fusionnés à son récepteur. L'inducteur chimique peut être varié et possède l'avantage d'être potentiellement non cytotoxique.

Des exemples récents de sélection *in vitro* utilisant cette technique avec le facteur de croissance c-mpl (récepteur de la thrombopoïétine) ont montré la prolifération sélective de cellules primaires de la moelle osseuse murines et de cellules CD34⁺ humaines modifiées (Jin et al., 1998; Richard et al., 2000). Toutefois, les résultats obtenus avec le facteur c-mpl diffèrent grandement (la prolifération étant beaucoup plus grande pour les cellules murines qu'humaines). Ces résultats suggèrent que le choix du facteur de croissance puisse être différent d'un organisme à un autre. Très récemment, Jin et al., (2000) ont montré qu'il est possible d'induire une sélection *in vivo* chez des souris

transplantées avec des cellules modifiées pour l'expression du récepteur c-mpl. De plus, cette approche fondée sur la simulation d'une stimulation par cytokines *in vivo* n'a pas montré de difficulté d'implantation permanente des cellules modifiées chez des souris issues d'une transplantation secondaire.

Le tropisme viral

Le transfert rétroviral de matériel génétique nécessite obligatoirement la reconnaissance et l'attachement des particules virales à la surface membranaire de la cellule à infecter. Cet attachement se fait par une interaction entre la glycoprotéine de l'enveloppe virale spécifique à chacun des types de virus et un ligand de la membrane cellulaire. Or, les divers types cellulaires diffèrent quant à la quantité et la variété de leurs ligands présents à leur surface membranaire extracellulaire. Ces différences influencent directement la probabilité d'interaction et d'infection de chacun des types de virus pour un type cellulaire donné.

En conséquence, une stratégie pour augmenter l'efficacité de transfert aux cellules souches hématopoïétiques consiste à mesurer chez celles-ci la quantité de ligands spécifiques à chacune des glycoprotéines virales identifiées à ce jour. Cette approche devrait permettre de déterminer laquelle des enveloppes virales est la plus appropriée pour cette tâche.

Plusieurs enveloppes virales ont été identifiées et les plus documentées sont :

- (1) L'ecotropique spécifique aux virus murins. Celle-ci reconnaît un récepteur cellulaire identifié comme un transporteur d'acides aminés. Toutefois, ce transporteur n'est pas conservé chez les mammifères et confine les rétrovirus arborant une glycoprotéine ecotropic à l'infection des cellules murines seulement (Albritton et al., 1993).
- (2) L'amphotropique. Celle-ci également obtenue de virus murins lie un transporteur du phosphate à la surface membranaire (pit-2) présent chez les humains, les primates et les murins. Malheureusement, ce transporteur est présent en faible quantité à la surface des cellules souches CD34⁺CD38⁻ humaines et murines, réduisant l'efficacité de leur infection par ce type de virus (Orlic et al., 1996). À cet effet, Orlic et al. (1999) ont montré que le niveau d'ARNm du transporteur

pit-2 corrèle étroitement avec l'efficacité d'infection des rétrovirus de type amphotropic.

- (3) La glycoprotéine obtenue du *gibbon ape leukemia virus* (GALV). Celle-ci lie un récepteur membranaire (10A1 ou pit-1) présent en plus grande quantité à la surface des cellules souches hématopoïétiques murines et humaines. D'ailleurs, Barrette et al. (2000) ont montré une infection supérieure des cellules souches hématopoïétiques murines avec ce type de glycoprotéine comparativement au type amphotropic.
- (4) La glycoprotéine obtenue du *vesicular stomatitis virus* (VSVG). Celle-ci, toujours selon Barrette et al. (2000), possède une capacité à infecter des cellules souches hématopoïétiques murines similaire à celle du type GALV. La VSVG lie un phospholipide très répandu à la surface d'une grande variété de types cellulaires (Halene et Kohn, 2000). Cet avantage lui confère un tropisme supérieur aux autres types de glycoprotéines virales. De plus, uniquement les particules virales constituées de la VSVG peuvent être concentrées par ultracentrifugation (Burns et al., 1993). Cette caractéristique permet une infection avec un indice de multiplicité d'infection (*multiplicity of infection*, MOI, soit le rapport nombre de particules virales par le nombre de cellules à infecter) très élevé. Il est parfois nécessaire et avantageux de pouvoir infecter des cellules avec un indice MOI très élevé, comme par exemple dans le cas d'infection in vivo intracérébrale (Galipeau et al., 1999).

Promoteurs inductibles et spécifiques

La majorité des protocoles de thérapie génique utilisent des promoteurs constitutifs exprimant le transgène de façon incontrôlée et généralement en grande quantité. L'utilisation d'un transgène parfois cytotoxique in vivo bénéficierait grandement du développement de promoteurs inductibles en mesure d'exprimer le transgène de façon contrôlée. La production de protéines telle l'insuline doit obligatoirement être produite à l'intérieur d'une fenêtre thérapeutique restreinte et bénéficierait de l'évolution de promoteurs inductibles. De façon similaire, les gènes de

résistance tel le gène de la CD pourrait être exprimé uniquement lors des traitements de chimiothérapie.

Le promoteur inductible le plus étudié jusqu'à maintenant est celui de l'opéron tétracycline de *Escherichia coli*. Brièvement, l'activité de cet opéron est modifiée par des transactivateurs chimériques pouvant induire ou diminuer l'efficacité transcriptionnelle en présence ou en absence de tétracycline (ou, plus couramment, de son homologue la doxycycline). Utilisant ce système dans un vecteur d'expression rétroviral, Bohl et Heard, (1997) ont montré une expression régulée d'erythropoïétine provenant de tissu musculaire modifié. De nombreuses publications confirment d'ailleurs l'efficacité du système inductible à la tétracycline *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, il en ressort généralement qu'une activité basale non négligeable est présente. Celle-ci, combinée à la nature immunogénique (bactérienne) des composantes régulatrices de ce système pourrait limiter son utilisation en clinique.

D'autres promoteurs inductibles ont également été développés. Par exemple, un promoteur synthétique des glucocorticoïdes (comportant 5 éléments de réponse en tandem) peut exprimer, en réponse à la dexaméthasone (un glucocorticoïde), le gène de la GFP chez des cellules primaires stromales murines infectées *in vitro* avec un vecteur rétroviral (Jaalouk et al., 2000). Le niveau d'expression basale en absence de dexaméthasone s'est avéré très bas. De plus, ce système comporte l'avantage d'avoir des composantes régulatrices non-immunogéniques, contrairement au système inductible à la tétracycline. Un autre promoteur inductible, cette fois en réponse à la rapamycine, a aussi été décrit par Ye et al., (1999). Ce système très ingénieux dépend de la capacité de la rapamycine à rapprocher deux protéines chimériques en un facteur de transcription fonctionnel pouvant réguler l'activité d'un promoteur spécifique (un peu à la manière du système double hybride développé chez la levure). En présence de rapamycine, ces auteurs ont montré une forte induction de l'expression du gène de l'erythropoïétine (comparable à celle d'un promoteur constitutif) et une faible expression basale en son absence.

Certains systèmes de régulation à l'étude sont plutôt caractérisés par une activité transcriptionnelle restrictive aux cellules cancéreuses. Parmi ceux-ci, on retrouve le promoteur de la protéine *grp 78* (pour *glucose regulated protein*). Cette protéine est

fortement induite dans les tissus mal vascularisés (tissus tumoral) en condition de stress (faible concentration de glucose, anoxie chronique etc.). Gazit et al., (1999) ont montré que ce promoteur lié au gène suicide de la HSV-TK sur un vecteur rétroviral était fonctionnel uniquement chez des cellules tumorales *in vivo*. L'unité régulatrice du gène de l'hexokinase II possède également une activité transcriptionnelle spécifique aux cellules cancéreuses (Katabi et al., 1999). L'hexokinase II est une enzyme impliquée dans les premières étapes de la glycolyse et son expression est augmentée chez les cellules tumorales.

Finalement, le promoteur de la sous unité catalytique du gène de la télomérase est lui aussi, fortement associé à une expression préférentielle aux cellules tumorales (la télomérase étant exprimée dans environ 90% des cancers). À cet effet, Koga et al. (2000) ont montré une expression spécifique du gène de la caspase-8 aux cellules tumorales lorsque sous le contrôle du promoteur de la télomérase.

En conclusion, la bonne combinaison de cytokines nécessaires à la réplication des cellules souches *ex vivo*, la découverte de nouvelles enveloppes virales de même que la quantification des récepteurs cellulaires spécifiques à chacune d'elles et l'identification de promoteurs inductibles ou spécifiques aux cellules tumorales devraient contribuer à l'amélioration des techniques de transfert génique.

References

- Albritton,L.M., Kim,J.W., Tseng,L., and Cunningham,J.M. (1993). Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *J. Virol.* 67, 2091-2096.
- Allay,J.A., Davis,B.M., and Gerson,S.L. (1997). Human alkyltransferase-transduced murine myeloid progenitors are enriched in vivo by BCNU treatment of transplanted mice. *Exp. Hematol.* 25, 1069-1076.
- Allay,J.A., Dumenco,L.L., Koc,O.N., Liu,L., and Gerson,S.L. (1995). Retroviral transduction and expression of the human alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells. *Blood* 85, 3342-3351.
- Allay,J.A., Persons,D.A., Galipeau,J., Riberdy,J.M., Ashmun,R.A., Blakley,R.L., and Sorrentino,B.P. (1998). In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 4, 1136-1143.
- Alt,F.W., Kellems,R.E., Bertino,J.R., and Schimke,R.T. (1978). Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J. Biol. Chem.* 253, 1357-1370.
- Barrette,S., Douglas,J., Orlic,D., Anderson,S.M., Seidel,N.E., Miller,A.D., and Bodine,D.M. (2000). Superior transduction of mouse hematopoietic stem cells with 10A1 and VSV-G pseudotyped retrovirus vectors. *Mol. Ther.* 1, 330-338.
- Battaile,K.P., Bateman,R.L., Mortimer,D., Mulcahy,J., Rathbun,R.K., Bagby,G., Fleming,W.H., and Grompe,M. (1999). In vivo selection of wild-type hematopoietic stem cells in a murine model of Fanconi anemia. *Blood* 94, 2151-2158.
- Beausejour,C.M., Le,N.L., Letourneau,S., Cournoyer,D., and Momparler,R.L. (1998). Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicistronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate. *Hum. Gene Ther.* 9, 2537-2544.
- Beigelman,L., McSwiggen,J.A., Draper,K.G., Gonzalez,C., Jensen,K., Karpeisky,A.M., Modak,A.S., Matulic-Adamic,J., DiRenzo,A.B., and Haeberli,P. (1995). Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J. Biol. Chem.* 270, 25702-25708.
- Bennett,M.R. (1999). Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1089-1095.
- Bergh,J., Wiklund,T., Erikstein,B., Lidbrink,E., Lindman,H., Malmstrom,P., Kellokumpu-Lehtinen,P., Bengtsson,N.O., Soderlund,G., Anker,G., Wist,E., Ottosson,S., Salminen,E., Ljungman,P., Holte,H., Nilsson,J., Blomqvist,C., and Wilking,N. (2000). Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-

- supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomised trial. Scandinavian Breast Group 9401 study [In Process Citation]. *Lancet* 356, 1384-1391.
- Bergman,A.M., Pinedo,H.M., Jongsma,A.P., Brouwer,M., Ruiz,v.H., V, Veerman,G., Leyva,A., Eriksson,S., and Peters,G.J. (1999). Decreased resistance to gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) of cytosine arabinoside-resistant myeloblastic murine and rat leukemia cell lines: role of altered activity and substrate specificity of deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.* 57, 397-406.
- Bernard,J., Boiron,M., Jacquillat,C., Najean,Y., Seligmann,M., Tanzer,J., and Weil,M. (1966). [Current treatment of acute leukemia]. *Presse Med.* 74, 1241-1245.
- Bertino,J.R. (1990). "Turning the tables"--making normal marrow resistant to chemotherapy [editorial; comment]. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1234-1235.
- Bertolini,F., De Monte,L., Corsini,C., Lazzari,L., Lauri,E., Soligo,D., Ward,M., Bank,A., and Malavasi,F. (1994). Retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance gene into human haemopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 88, 318-324.
- Birikh,K.R., Heaton,P.A., and Eckstein,F. (1997). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.* 245, 1-16.
- Bishop,J.F., Matthews,J.P., Young,G.A., Szer,J., Gillett,A., Joshua,D., Bradstock,K., Enno,A., Wolf,M.M., and Fox,R. (1996). A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia [see comments]. *Blood* 87, 1710-1717.
- Blakley,R.L., Dihydrofolate reductase. (1984) In: Blakley, R.L. and Beakovie, S.J. (Eds). *Folates and Pterins*. John Wiley and Sons, Newyork, Vol. 1, 191-253.
- Blau,C.A., Neff,T., and Papayannopoulou,T. (1996). The hematological effects of folate analogs: implications for using the dihydrofolate reductase gene for in vivo selection. *Hum. Gene Ther.* 7, 2069-2078.
- Blau,C.A., Neff,T., and Papayannopoulou,T. (1997). Cytokine prestimulation as a gene therapy strategy: implications for using the MDR1 gene as a dominant selectable marker. *Blood* 89, 146-154.
- Bodensteiner,D.C. and Doolittle,G.C. (1993). Adverse haematological complications of anticancer drugs. Clinical presentation, management and avoidance. *Drug Saf* 8, 213-224.
- Boffetta,P. and Kaldor,J.M. (1994). Secondary malignancies following cancer chemotherapy. *Acta Oncol.* 33, 591-598.
- Bohl,D. and Heard,J.M. (1997). Modulation of erythropoietin delivery from engineered muscles in mice. *Hum. Gene Ther.* 8, 195-204.

- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review [published erratum appears in *Cancer Res* 1990 Feb 15;50(4):1352]. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.
- Bouchard, J. and Momparler, R.L. (1983). Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Mol. Pharmacol.* 24, 109-114.
- Bouffard, D.Y., Laliberte, J., and Momparler, R.L. (1993). Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* 45, 1857-1861.
- Bradford, G.B., Williams, B., Rossi, R., and Bertoncello, I. (1997). Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp. Hematol.* 25, 445-453.
- Brenner, M.K., Rill, D.R., Holladay, M.S., Heslop, H.E., Moen, R.C., Buschle, M., Krance, R.A., Santana, V.M., Anderson, W.F., and Ihle, J.N. (1993). Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 342, 1134-1137.
- Buchsacher, G.L., Jr. and Wong-Staal, F. (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95, 2499-2504.
- Bunting, K.D., Galipeau, J., Topham, D., Benaim, E., and Sorrentino, B.P. (1998). Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* 92, 2269-2279.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8033-8037.
- Camiener, G.W. and Smith, C.G. (1965). Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1405-1416.
- Carmichael, J. and Walling, J. (1997). Advanced breast cancer: investigational role of gemcitabine. *Eur. J. Cancer* 33 Suppl 1, S27-S30.
- Carter, S.K., Schabel, F.M., Jr., Broder, L.E., and Johnston, T.P. (1972). 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (bcnu) and other nitrosoureas in cancer treatment: a review. *Adv. Cancer Res.* 16, 273-332.
- Case, S.S., Price, M.A., Jordan, C.T., Yu, X.J., Wang, L., Bauer, G., Haas, D.L., Xu, D., Stripecke, R., Naldini, L., Kohn, D.B., and Crooks, G.M. (1999). Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2988-2993.

- Cavazzana-Calvo,M., Hacein-Bey,S., de Saint,B.G., Gross,F., Yvon,E., Nusbaum,P., Selz,F., Hue,C., Certain,S., Casanova,J.L., Bousso,P., Deist,F.L., and Fischer,A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [see comments]. *Science* 288, 669-672.
- Cech,T.R., Zaug,A.J., and Grabowski,P.J. (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27 , 487-496.
- Chabot,G.G., Bouchard,J., and Momparler,R.L. (1983). Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3- deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1327-1328.
- Challita,P.M. and Kohn,D.B. (1994). Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2567-2571.
- Chan,H.S., Thorner,P.S., Haddad,G., and Ling,V. (1990). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.* 8, 689-704.
- Chandler,L.A. and Jones,P.A. (1988). Hypomethylation of DNA in the regulation of gene expression. *Dev. Biol. (N. Y. 1985.)* 5, 335-349.
- Cherry,S.R., Biniszkiwicz,D., van Parijs,L., Baltimore,D., and Jaenisch,R. (2000). Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells [In Process Citation]. *Mol. Cell Biol.* 20, 7419-7426.
- Christofori,G. and Semb,H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour- suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73-76.
- Chu,P., Lutzko,C., Stewart,A.K., and Dube,I.D. (1998). Retrovirus-mediated gene transfer into human hematopoietic stem cells. *J. Mol. Med.* 76, 184-192.
- Cote,S. and Momparler,R.L. (1997). Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'- deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 8, 56-61.
- Cowan,K.H., Moscow,J.A., Huang,H., Zujewski,J.A., O'Shaughnessy,J., Sorrentino,B., Hines,K., Carter,C., Schneider,E., Cusack,G., Noone,M., Dunbar,C., Steinberg,S., Wilson,W., Goldspiel,B., Read,E.J., Leitman,S.F., McDonagh,K., Chow,C., Abati,A., Chiang,Y., Chang,Y.N., Gottesman,M.M., Pastan,I., and Nienhuis,A. (1999). Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients [see comments]. *Clin. Cancer Res.* 5, 1619-1628.

- Crone,T.M., Goodtzova,K., Edara,S., and Pegg,A.E. (1994). Mutations in human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase imparting resistance to O6-benzylguanine. *Cancer Res.* *54*, 6221-6227.
- Culver,K.W., Ram,Z., Wallbridge,S., Ishii,H., Oldfield,E.H., and Blaese,R.M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors [see comments]. *Science* *256*, 1550-1552.
- Dahm,S.C. and Uhlenbeck,O.C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* *30*, 9464-9469.
- Datto,M.B., Hu,P.P., Kowalik,T.F., Yingling,J., and Wang,X.F. (1997). The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta- mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2030-2037.
- Davis,B.M., Koc,O.N., and Gerson,S.L. (2000). Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase- transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood* *95*, 3078-3084.
- Davis,B.M., Reese,J.S., Koc,O.N., Lee,K., Schupp,J.E., and Gerson,S.L. (1997). Selection for G156A O6-methylguanine DNA methyltransferase gene- transduced hematopoietic progenitors and protection from lethality in mice treated with O6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1- nitrosourea. *Cancer Res.* *57*, 5093-5099.
- Dixon,R.L. and Adamson,R.H. (1965). Antitumor activity and pharmacologic disposition of cytosine arabinoside (NSC-63878). *Cancer Chemother. Rep.* *48*, 11-16.
- Dolan,M.E., Mitchell,R.B., Mummert,C., Moschel,R.C., and Pegg,A.E. (1991). Effect of O6-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Res.* *51*, 3367-3372.
- Drach,D., Zhao,S., Drach,J., Mahadevia,R., Gattringer,C., Huber,H., and Andreeff,M. (1992). Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype [see comments]. *Blood* *80*, 2729-2734.
- Dunbar,C.E., Cottler-Fox,M., O'Shaughnessy,J.A., Doren,S., Carter,C., Berenson,R., Brown,S., Moen,R.C., Greenblatt,J., and Stewart,F.M. (1995). Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood* *85*, 3048-3057.
- Eckert,H.G., Stockschrader,M., Just,U., Hegewisch-Becker,S., Grez,M., Uhde,A., Zander,A., Ostertag,W., and Baum,C. (1996). High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. *Blood* *88*, 3407-3415.

- Eliopoulos,N., Bovenzi,V., Le,N.L., Momparler,L.F., Greenbaum,M., Letourneau,S., Cournoyer,D., and Momparler,R.L. (1998a). Retroviral transfer and long-term expression of human cytidine deaminase cDNA in hematopoietic cells following transplantation in mice. *Gene Ther.* 5, 1545-1551.
- Eliopoulos,N., Cournoyer,D., and Momparler,R.L. (1998b). Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42, 373-378.
- Emerman,M. and Temin,H.M. (1984). Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell* 39, 449-467.
- Emerman,M. and Temin,H.M. (1986). Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. *Nucleic Acids Res.* 14, 9381-9396.
- Eppich,H.M., Foxall,R., Gaynor,K., Dombkowski,D., Miura,N., Cheng,T., Silva-Arrieta,S., Evans,R.H., Mangano,J.A., Preffer,F.I., Scadden,D.T. (2000). Pulsed electric fields for selection of haematopoietic cells and depletion of tumor cell contaminants. *Nat. Biotechnol.* 18, 882-887.
- Ercikan-Abali,E.A., Mineishi,S., Tong,Y., Nakahara,S., Waltham,M.C., Banerjee,D., Chen,W., Sadelain,M., and Bertino,J.R. (1996). Active site-directed double mutants of dihydrofolate reductase. *Cancer Res.* 56, 4142-4145.
- Evans,W.E., Relling,M.V., Rodman,J.H., Crom,W.R., Boyett,J.M., and Pui,C.H. (1998). Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 338, 499-505.
- Fackler,M.J., Krause,D.S., Smith,O.M., Civin,C.I., and May,W.S. (1995). Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* 85, 3040-3047.
- Favrot,M., Coll,J.L., Louis,N., and Negoescu,A. (1998). Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Ther.* 5, 728-739.
- Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997). Growth factors. In *Cancer Medecine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E.Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds (Baltimore, MD:Williams and Wilkins), 41-64.
- Ferrari,G., Cusella-De Angelis,G., Coletta,M., Paolucci,E., Stornaiuolo,A., Cossu,G., and Mavilio,F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors [see comments] [published erratum appears in *Science* 1998 Aug 14;281(5379):923]. *Science* 279, 1528-1530.
- Flasshove,M., Banerjee,D., Leonard,J.P., Mineishi,S., Li,M.X., Bertino,J.R., and Moore,M.A. (1998). Retroviral transduction of human CD34+ umbilical cord blood

progenitor cells with a mutated dihydrofolate reductase cDNA. *Hum. Gene Ther.* 9, 63-71.

Flasshove, M., Banerjee, D., Mineishi, S., Li, M.X., Bertino, J.R., and Moore, M.A. (1995). Ex vivo expansion and selection of human CD34+ peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA via retroviral gene transfer. *Blood* 85, 566-574.

Flasshove, M., Frings, W., Schroder, J.K., Moritz, T., Schutte, J., and Seeber, S. (1999). Transfer of the cytidine deaminase cDNA into hematopoietic cells. *Leuk. Res.* 23, 1047-1053.

Follenzi, A., Ailles, L.E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.* 25, 217-222.

Fry, D.W. and Besserer, J.A. (1988). Characterization of trimetrexate transport in human lymphoblastoid cells and development of impaired influx as a mechanism of resistance to lipophilic antifolates. *Cancer Res.* 48, 6986-6991.

Fuchs, E. and Segre, J.A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100, 143-155.

Funato, T., Ishii, T., Kambe, M., Scanlon, K.J., and Sasaki, T. (2000). Anti-K-ras ribozyme induces growth inhibition and increased chemosensitivity in human colon cancer cells [In Process Citation]. *Cancer Gene Ther.* 7, 495-500.

Galipeau, J., Benaim, E., Spencer, H.T., Blakley, R.L., and Sorrentino, B.P. (1997). A bicistronic retroviral vector for protecting hematopoietic cells against antifolates and P-glycoprotein effluxed drugs. *Hum. Gene Ther.* 8, 1773-1783.

Galipeau, J., Li, H., Paquin, A., Sicilia, F., Karpati, G., and Nalbantoglu, J. (1999). Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* 59, 2384-2394.

Galski, H., Sullivan, M., Willingham, M.C., Chin, K.V., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Merlino, G.T. (1989). Expression of a human multidrug resistance cDNA (MDR1) in the bone marrow of transgenic mice: resistance to daunomycin-induced leukopenia. *Mol. Cell Biol.* 9, 4357-4363.

Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnzi, V., Almonte, C., Kenniston, T., Watkins, S., Deleo, A. and Robbins, P. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: Identification of a H2Kd-restricted CTL epitope. *Molecular Therapy*, Vol. 1, No. 5, Third annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Denver, May 2000, Abstract 748.

- Gao,Z., Gao,Z., Fields,J.Z., and Boman,B.M. (1999). Tumor-specific expression of anti-mdr1 ribozyme selectively restores chemosensitivity in multidrug-resistant colon-adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* 82, 346-352.
- Gazit,G., Hung,G., Chen,X., Anderson,W.F., and Lee,A.S. (1999). Use of the glucose starvation-inducible glucose-regulated protein 78 promoter in suicide gene therapy of murine fibrosarcoma. *Cancer Res.* 59, 3100-3106.
- Gerson,S.L., Miller,K., and Berger,N.A. (1985). O6 alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human myeloid cells. *J. Clin. Invest* 76, 2106-2114.
- Ghalie,R., Richman,C.M., Adler,S.S., Cobleigh,M.A., Korenblit,A.D., Manson,S.D., McLeod,B.C., Taylor,S.G., Valentino,L.A., and Wolter,J. (1994). Treatment of metastatic breast cancer with a split-course high-dose chemotherapy regimen and autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* 12, 342-346.
- Ghattas,I.R., Sanes,J.R., and Majors,J.E. (1991). The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol. Cell Biol.* 11, 5848-5859.
- Glick,R.P., Lichtor,T., de Zoeten,E., Deshmukh,P., and Cohen,E.P. (1999). Prolongation of survival of mice with glioma treated with semiallogeneic fibroblasts secreting interleukin-2. *Neurosurgery* 45, 867-874.
- Gluckman,E., Auerbach,A.D., Horowitz,M.M., Sobocinski,K.A., Ash,R.C., Bortin,M.M., Butturini,A., Camitta,B.M., Champlin,R.E., and Friedrich,W. (1995). Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 86, 2856-2862.
- Goan,Y.G., Zhou,B., Hu,E., Mi,S., and Yen,Y. (1999). Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res.* 59, 4204-4207.
- Goldstein,L.J., Galski,H., Fojo,A., Willingham,M., Lai,S.L., Gazdar,A., Pirker,R., Green,A., Crist,W., and Brodeur,G.M. (1989). Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 116-124.
- Gonzalgo,M.L., Hayashida,T., Bender,C.M., Pao,M.M., Tsai,Y.C., Gonzales,F.A., Nguyen,H.D., Nguyen,T.T., and Jones,P.A. (1998). The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res.* 58, 1245-1252.
- Gottesman,M.M. and Pastan,I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.
- Graff,J.R., Herman,J.G., Lapidus,R.G., Chopra,H., Xu,R., Jarrard,D.F., Isaacs,W.B., Pitha,P.M., Davidson,N.E., and Baylin,S.B. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 55, 5195-5199.

Grigg,A., Begley,C.G., Juttner,C.A., Szer,J., To,L.B., Maher,D., McGrath,K.M., Morstyn,G., Fox,R.M., and Sheridan,W.P. (1993). Effect of peripheral blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G- CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant. 11 Suppl 2*, 23-29.

Gush,K.A., Fu,K.L., Grompe,M., and Walsh,C.E. (2000). Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood 95*, 700-704.

Hafkemeyer,P., Licht,T., Pastan,I., and Gottesman,M.M. (2000). Chemoprotection of hematopoietic cells by a mutant P-glycoprotein resistant to a potent chemosensitizer of multidrug-resistant cancers [published erratum appears in *Hum Gene Ther* 2000 May 1;11(7):1112]. *Hum. Gene Ther. 11* , 555-565.

Halene,S. and Kohn,D.B. (2000). Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest. *Hum. Gene Ther. 11*, 1259-1267.

Halene,S., Wang,L., Cooper,R.M., Bockstoe,D.C., Robbins,P.B., and Kohn,D.B. (1999). Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector. *Blood 94*, 3349-3357.

Han,S., Hickey,R.J., Tom,T.D., Wills,P.W., Syvaaja,J.E., and Malkas,L.H. (2000). Differential inhibition of the human cell DNA replication complex- associated DNA polymerases by the antimetabolite 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine triphosphate (ara-CTP). *Biochem. Pharmacol. 60*, 403-411.

Hanahan,D. and Folkman,J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell 86*, 353-364.

Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell 100*, 57-70.

Hanania,E.G. and Deisseroth,A.B. (1994). Serial transplantation shows that early hematopoietic precursor cells are transduced by MDR-1 retroviral vector in a mouse gene therapy model. *Cancer Gene Ther. 1*, 21-25.

Harrington,C. and Perrino,F.W. (1995). The effects of cytosine arabinoside on RNA-primed DNA synthesis by DNA polymerase alpha-primase. *J. Biol. Chem. 270*, 26664-26669.

Haseloff,J. and Gerlach,W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature 334* , 585-591.

Havenga,M., Valerio,D., Hoogerbrugge,P., and Es,H. (1999). In vivo methotrexate selection of murine hemopoietic cells transduced with a retroviral vector for Gaucher disease [see comments]. *Gene Ther. 6*, 1661-1669.

- Hawley,R.G., Lieu,F.H., Fong,A.Z., and Hawley,T.S. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* *1*, 136-138.
- Healy,L., May,G., Gale,K., Grosveld,F., Greaves,M., and Enver,T. (1995). The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 12240-12244.
- Heinemann,V., Hertel,L.W., Grindey,G.B., and Plunkett,W. (1988). Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'- difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* *48*, 4024-4031.
- Heinemann,V., Schulz,L., Issels,R.D., and Plunkett,W. (1995). Gemcitabine: a modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism. *Semin. Oncol.* *22*, 11-18.
- Heinemann,V., Xu,Y.Z., Chubb,S., Sen,A., Hertel,L.W., Grindey,G.B., and Plunkett,W. (1990). Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol. Pharmacol.* *38*, 567-572.
- Herschlag,D. (1991). Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules in vivo: more isn't always better. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 6921-6925.
- Hertel,K.J., Herschlag,D., and Uhlenbeck,O.C. (1996). Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. *EMBO J.* *15*, 3751-3757.
- Hesdorffer,C., Ayello,J., Ward,M., Kaubisch,A., Vahdat,L., Balmaceda,C., Garrett,T., Fetell,M., Reiss,R., Bank,A., and Antman,K. (1998). Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* *16*, 165-172.
- Hock,R.A. and Miller,A.D. (1986). Retrovirus-mediated transfer and expression of drug resistance genes in human haematopoietic progenitor cells. *Nature* *320*, 275-277.
- Hoeben,R.C., Migchielsen,A.A., van der Jagt,R.C., van Ormondt,H., and van der Eb,A.J. (1991). Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J. Virol.* *65*, 904-912.
- Hope,M.J., Mui,B., Ansell,S., and Ahkong,Q.F. (1998). Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs (review). *Mol. Membr. Biol.* *15*, 1-14.
- Hortobagyi,G.N., Buzdar,A.U., Theriault,R.L., Valero,V., Frye,D., Booser,D.J., Holmes,F.A., Giralto,S., Khouri,I., Andersson,B., Gajewski,J.L., Rondon,G., Smith,T.L., Singletary,S.E., Ames,F.C., Sneige,N., Strom,E.A., McNeese,M.D., Deisseroth,A.B., and Champlin,R.E. (2000). Randomized trial of high-dose chemotherapy and blood cell

- autografts for high-risk primary breast carcinoma [see comments]. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 225-233.
- Hsu,S.C., Volpert,O.V., Steck,P.A., Mikkelsen,T., Polverini,P.J., Rao,S., Chou,P., and Bouck,N.P. (1996). Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1. *Cancer Res.* *56*, 5684-5691.
- Huang,P., Chubb,S., Hertel,L.W., Grindey,G.B., and Plunkett,W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* *51*, 6110-6117.
- Irie,A., Anderegg,B., Kashani-Sabet,M., Ohkawa,T., Suzuki,T., Halks-Miller,M., Curiel,D.T., and Scanlon,K.J. (1999). Therapeutic efficacy of an adenovirus-mediated anti-H-ras ribozyme in experimental bladder cancer. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* *9*, 341-349.
- Jaalouk,D.E., Eliopoulos,N., Couture,C., Mader,S., and Galipeau,J. (2000). Glucocorticoid-inducible retrovector for regulated transgene expression in genetically engineered bone marrow stromal cells [In Process Citation]. *Hum. Gene Ther.* *11*, 1837-1849.
- Jang,S.K., Krausslich,H.G., Nicklin,M.J., Duke,G.M., Palmenberg,A.C., and Wimmer,E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* *62*, 2636-2643.
- Jelinek,J., Rafferty,J.A., Cmejla,R., Hildinger,M., Chinnasamy,D., Lashford,L.S., Ostertag,W., Margison,G.P., Dexter,T.M., Fairbairn,L.J., and Baum,C. (1999). A novel dual function retrovirus expressing multidrug resistance 1 and O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase for engineering resistance of haemopoietic progenitor cells to multiple chemotherapeutic agents. *Gene Ther.* *6*, 1489-1493.
- Jen,K.Y. and Gewirtz,A.M. (2000). Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem Cells* *18*, 307-319.
- Jin,L., Siritanaratkul,N., Emery,D.W., Richard,R.E., Kaushansky,K., Papayannopoulou,T., and Blau,C.A. (1998). Targeted expansion of genetically modified bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 8093-8097.
- Jin,L., Zeng,H., Chien,S., Otto,K.G., Richard,R.E., Emery,D.W., and Anthony,B.C. (2000). In vivo selection using a cell-growth switch [In Process Citation]. *Nat. Genet.* *26*, 64-66.
- Johnston,E.M. and Crawford,J. (1998). Hematopoietic growth factors in the reduction of chemotherapeutic toxicity. *Semin. Oncol.* *25*, 552-561.
- Jones,P.A. and Laird,P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* *21*, 163-167.

- Jones,P.A. and Taylor,S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20, 85-93.
- Juttermann,R., Li,E., and Jaenisch,R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11797-11801.
- Kafri,T., van Praag,H., Ouyang,L., Gage,F.H., and Verma,I.M. (1999). A packaging cell line for lentivirus vectors. *J. Virol.* 73, 576-584.
- Katabi,M.M., Chan,H.L., Karp,S.E., and Batist,G. (1999). Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Hum. Gene Ther.* 10, 155-164.
- Kaufmann,M. and von Minckwitz,G. (1997). Gemcitabine in ovarian cancer: an overview of safety and efficacy. *Eur. J. Cancer* 33 *Suppl* 1, S31-S33.
- Kay,M.A., Manno,C.S., Ragni,M.V., Larson,P.J., Couto,L.B., McClelland,A., Glader,B., Chew,A.J., Tai,S.J., Herzog,R.W., Arruda,V., Johnson,F., Scallan,C., Skarsgard,E., Flake,A.W., and High,K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector [see comments]. *Nat. Genet.* 24, 257-261.
- Keating,M.J., McCredie,K.B., Bodey,G.P., Smith,T.L., Gehan,E., and Freireich,E.J. (1982). Improved prospects for long-term survival in adults with acute myelogenous leukemia. *JAMA* 248, 2481-2486.
- Kessel,D. (1986). Circumvention of resistance to anthracyclines by calcium antagonists and other membrane-perturbing agents. *Cancer Surv.* 5, 109-127.
- King,L.A., Mitrophanous,K.A., Clark,L.A., Kim,V.N., Rohll,J.B., Kingsman,A.J., and Colello,R.J. (2000). Growth factor enhanced retroviral gene transfer to the adult central nervous system. *Gene Ther.* 7, 1103-1111.
- Kittler,E.L., Peters,S.O., Crittenden,R.B., Debatis,M.E., Ramshaw,H.S., Stewart,F.M., and Quesenberry,P.J. (1997). Cytokine-facilitated transduction leads to low-level engraftment in nonablated hosts. *Blood* 90, 865-872.
- Kobayashi,H., Kim,N., Halatsch,M.E., and Ohnuma,T. (1994). Specificity of ribozyme designed for mutated DHFR mRNA. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1607-1613.
- Koc,O.N., Reese,J.S., Davis,B.M., Liu,L., Majczenko,K.J., and Gerson,S.L. (1999). DeltaMGMT-transduced bone marrow infusion increases tolerance to O6- benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and allows intensive therapy of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant human colon cancer xenografts. *Hum. Gene Ther.* 10, 1021-1030.

- Koga,S., Hirohata,S., Kondo,Y., Komata,T., Takakura,M., Inoue,M., Kyo,S., and Kondo,S. (2000). A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter [In Process Citation]. *Hum. Gene Ther.* *11*, 1397-1406.
- Kore,A.R., Vaish,N.K., Kutzke,U., and Eckstein,F. (1998). Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res.* *26*, 4116-4120.
- Krause,D.S., Fackler,M.J., Civin,C.I., and May,W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility [see comments]. *Blood* *87*, 1-13.
- Krause,D.S., Ito,T., Fackler,M.J., Smith,O.M., Collector,M.I., Sharkis,S.J., and May,W.S. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* *84*, 691-701.
- Kroep,J.R., van Moorsel,C.J., Veerman,G., Voorn,D.A., Schultz,R.M., Worzalla,J.F., Tanzer,L.R., Merriman,R.L., Pinedo,H.M., and Peters,G.J. (1998). Role of deoxycytidine kinase (dCK), thymidine kinase 2 (TK2), and deoxycytidine deaminase (dCDA) in the antitumor activity of gemcitabine (dFdC). *Adv. Exp. Med. Biol.* *431*, 657-660.
- Kume,A., Hanazono,Y., Mizukami,H., Urabe,M., and Ozawa,K. (1999). Hematopoietic stem cell gene therapy: a current overview. *Int. J. Hematol.* *69*, 227-233.
- Kwok,W.W., Schuening,F., Stead,R.B., and Miller,A.D. (1986). Retroviral transfer of genes into canine hemopoietic progenitor cells in culture: a model for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 4552-4555.
- Laker,C., Meyer,J., Schopen,A., Friel,J., Heberlein,C., Ostertag,W., and Stocking,C. (1998). Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J. Virol.* *72*, 339-348.
- Laliberte,J. and Momparler,R.L. (1994). Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res.* *54*, 5401-5407.
- Laport,G.F., Grad,G., Grinblatt,D.L., Bitran,J.D., and Williams,S.F. (1998). High-dose chemotherapy consolidation with autologous stem cell rescue in metastatic breast cancer: a 10-year experience. *Bone Marrow Transplant.* *21*, 127-132.
- Lee,C.G., Jeang,K.T., Martin,M.A., Pastan,I., and Gottesman,M.M. (1997). Efficient long-term coexpression of a hammerhead ribozyme targeted to the U5 region of HIV-1 LTR by linkage to the multidrug-resistance gene. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* *7*, 511-522.
- Letourneau,S., Greenbaum,M., and Cournoyer,D. (1996). Retrovirus-mediated gene transfer of rat glutathione S-transferase Yc confers in vitro resistance to alkylating agents in human leukemia cells and in clonogenic mouse hematopoietic progenitor cells. *Hum. Gene Ther.* *7*, 831-840.

- Letourneau,S., Palerme,J.S., Delisle,J.S., Beausejour,C.M., Momparler,R.L., and Cournoyer,D. (2000). Coexpression of rat glutathione S-transferase A3 and human cytidine deaminase by a bicistronic retroviral vector confers in vitro resistance to nitrogen mustards and cytosine arabinoside in murine fibroblasts. *Cancer Gene Ther.* 7, 757-765.
- Levine,A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li,M.X., Banerjee,D., Zhao,S.C., Schweitzer,B.I., Mineishi,S., Gilboa,E., and Bertino,J.R. (1994). Development of a retroviral construct containing a human mutated dihydrofolate reductase cDNA for hematopoietic stem cell transduction. *Blood* 83, 3403-3408.
- Licht,T., Aran,J.M., Goldenberg,S.K., Vieira,W.D., Gottesman,M.M., and Pastan,I. (1999). Retroviral transfer of human MDR1 gene to hematopoietic cells: effects of drug selection and of transcript splicing on expression of encoded P- glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 10, 2173-2185.
- Licht,T., Goldenberg,S.K., Vieira,W.D., Gottesman,M.M., and Pastan,I. (2000). Drug selection of MDR1-transduced hematopoietic cells ex vivo increases transgene expression and chemoresistance in reconstituted bone marrow in mice. *Gene Ther.* 7, 348-358.
- Licht,T., Herrmann,F., Gottesman,M.M., and Pastan,I. (1997). In vivo drug-selectable genes: a new concept in gene therapy. *Stem Cells* 15, 104-111.
- Loh,T.P., Sievert,L.L., and Scott,R.W. (1990). Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 10, 4045-4057.
- Lorenz,T., Heinemann,V., and Jehn,U. (1992). [Pancytopenia following non-A, non-B hepatitis]. *Internist (Berl)* 33, 559-562.
- Ludwig,J., Blaschke,M., and Sproat,B.S. (1998). Extending the cleavage rules for the hammerhead ribozyme: mutating adenosine15.1 to inosine15.1 changes the cleavage site specificity from N16.2U16.1H17 to N16.2C16.1H17. *Nucleic Acids Res.* 26, 2279-2285.
- Mackey,J.R., Mani,R.S., Selner,M., Mowles,D., Young,J.D., Belt,J.A., Crawford,C.R., and Cass,C.E. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* 58, 4349-4357.
- MacLeod,A.R. and Szyf,M. (1995). Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 270, 8037-8043.
- Malech,H.L., Maples,P.B., Whiting-Theobald,N., Linton,G.F., Sekhsaria,S., Vowells,S.J., Li,F., Miller,J.A., DeCarlo,E., Holland,S.M., Leitman,S.F., Carter,C.S., Butz,R.E., Read,E.J., Fleisher,T.A., Schneiderman,R.D., Van Epps,D.E., Spratt,S.K.,

- Maack,C.A., Rokovich,J.A., Cohen,L.K., and Gallin,J.I. (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 12133-12138.
- Marini,F.C., Snell,V., Yu,Q., Zhang,X., Singletary,S.E., Champlin,R., Andreeff,M. (1999). Purging of contaminating breast cancer cells from hematopoietic stem cell grafts by adenoviral GAL-TEK gene therapy and magnetic antibody cell separation. *Clin. Cancer Res.* *5*, 1557-1568.
- Marks,P.A., Richon,V.M., and Rifkind,R.A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1210-1216.
- Marshall,E. (2000). Improving gene therapy's tool kit [news]. *Science* *288*, 953.
- Matano,E., Tagliaferri,P., Libroia,A., Damiano,V., Fabbrocini,A., De Lorenzo,S., and Bianco,A.R. (2000). Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study. *Br. J. Cancer* *82*, 1772-1775.
- Maze,R., Carney,J.P., Kelley,M.R., Glassner,B.J., Williams,D.A., and Samson,L. (1996). Increasing DNA repair methyltransferase levels via bone marrow stem cell transduction rescues mice from the toxic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, a chemotherapeutic alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 206-210.
- Merriman,R.L., Hertel,L.W., Schultz,R.M., Houghton,P.J., Houghton,J.A., Rutherford,P.G., Tanzer,L.R., Boder,G.B., and Grindey,G.B. (1996). Comparison of the antitumor activity of gemcitabine and ara-C in a panel of human breast, colon, lung and pancreatic xenograft models. *Invest New Drugs* *14*, 243-247.
- Michel,G., Landman-Parker,J., Auclerc,M.F., Mathey,C., Leblanc,T., Legall,E., Bordigoni,P., Lamagnere,J.P., Demeocq,F., Perel,Y., Auvrignon,A., Berthou,C., Bauduer,F., Pautard,B., Schneider,P., Schaison,G., Leverger,G., and Baruchel,A. (2000). Use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to increase chemotherapy dose-intensity: a randomized trial in very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* *18*, 1517-1524.
- Miyoshi,H., Smith,K.A., Mosier,D.E., Verma,I.M., and Torbett,B.E. (1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* *283*, 682-686.
- Mochizuki,H., Schwartz,J.P., Tanaka,K., Brady,R.O., and Reiser,J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J. Virol.* *72*, 8873-8883.
- Mohr,M., Dalmis,F., Hilgenfeld,E., Oelmann,E., Zuhlsdorf,M., Kratz-Albers,K., Nolte,A., Schmitmann,C., Onaldi-Mohr,D., Cassens,U., Serve,H., Sibrowski,W., Kienast,J., Berdel,W.E. (2001). Simultaneous immunomagnetic CD34+ cell selection and

B-cell depletion in peripheral blood progenitor cell samples of patients suffering from B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 51-57.

Momparler,R.L. (1969). Effect of cytosine arabinoside 5'-triphosphate on mammalian DNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 464-471.

Momparler,R.L., Bouffard,D.Y., Momparler,L.F., Dionne,J., Belanger,K., and Ayoub,J. (1997). Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* 8, 358-368.

Momparler,R.L. and Bovenzi,V. (2000). DNA methylation and cancer. *J. Cell Physiol* 183, 145-154.

Momparler,R.L., Eliopoulos,N., Bovenzi,V., Letourneau,S., Greenbaum,M., and Cournoyer,D. (1996). Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther.* 3, 331-338.

Momparler,R.L. and Fischer,G.A. (1968). Mammalian deoxynucleoside kinase. I. Deoxycytidine kinase: purification, properties, and kinetic studies with cytosine arabinoside. *J. Biol. Chem.* 243, 4298-4304.

Momparler,R.L. and Laliberte,J. (1990). Induction of cytidine deaminase in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leuk. Res.* 14, 751-754.

Momparler,R.L., Rivard,G.E., and Gyger,M. (1985). Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol. Ther.* 30, 277-286.

Momparler,R.L., Rossi,M., Bouchard,J., Vaccaro,C., Momparler,L.F., and Bartolucci,S. (1984). Kinetic interaction of 5-AZA-2'-deoxycytidine-5'-monophosphate and its 5'-triphosphate with deoxycytidylate deaminase. *Mol. Pharmacol.* 25, 436-440.

Monia,B.P., Holmlund,J., and Dorr,F.A. (2000). Antisense approaches for the treatment of cancer [In Process Citation]. *Cancer Invest* 18, 635-650.

Morel,F., Galy,A., Chen,B., and Szilvassy,S.J. (1998). Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and. *Exp. Hematol.* 26, 440-448.

Moritz,T., Mackay,W., Glassner,B.J., Williams,D.A., and Samson,L. (1995). Retrovirus-mediated expression of a DNA repair protein in bone marrow protects hematopoietic cells from nitrosourea-induced toxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 55, 2608-2614.

Moscow,J.A., Huang,H., Carter,C., Hines,K., Zujewski,J., Cusack,G., Chow,C., Venzon,D., Sorrentino,B., Chiang,Y., Goldspiel,B., Leitman,S., Read,E.J., Abati,A., Gottesman,M.M., Pastan,I., Sellers,S., Dunbar,C., and Cowan,K.H. (1999). Engraftment of MDR1 and NeoR gene-transduced hematopoietic cells after breast cancer chemotherapy. *Blood* 94, 52-61.

- Mounier,N., Haioun,C., Cole,B.F., Gisselbrecht,C., Sebban,C., Morel,P., Marit,G., Bouabdallah,R., Ravoet,C., Salles,G., Reyes,F., and Lepage,E. (2000). Quality of life-adjusted survival analysis of high-dose therapy with autologous bone marrow transplantation versus sequential chemotherapy for patients with aggressive lymphoma in first complete remission. Groupe d'Etude les Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 95, 3687-3692.
- Mukhopadhyay,T., Tainsky,M., Cavender,A.C., and Roth,J.A. (1991). Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res.* 51, 1744-1748.
- Mulligan, R.C. (1991). Gene transfer and gene therapy. Principles, Prospects, and Perspectives. In: Etiology of human Disease at the DNA Level, edited by Lindsten J and Pettersson U, Raven Press, Ltd, 143-189,
- Nakagawa,K., Miller,F.N., Sims,D.E., Lentsch,A.B., Miyazaki,M., and Edwards,M.J. (1996). Mechanisms of interleukin-2-induced hepatic toxicity. *Cancer Res.* 56, 507-510.
- Naldini,L., Blomer,U., Gallay,P., Ory,D., Mulligan,R., Gage,F.H., Verma,I.M., and Trono,D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. *Science* 272, 263-267.
- Neff,T. and Blau,C.A. (1996). Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* 24, 1340-1346.
- Ng,E.W., Sandler,A.B., Robinson,L., and Einhorn,L.H. (1999). A phase II study of carboplatin plus gemcitabine in advanced non-small- cell lung cancer (NSCLC): a hoosier oncology group study. *Am. J. Clin. Oncol.* 22, 550-553.
- Nienhuis,A.W., McDonagh,K.T., and Bodine,D.M. (1991). Gene transfer into hematopoietic stem cells. *Cancer* 67, 2700-2704.
- Orlic,D. and Bodine,D.M. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! [editorial]. *Blood* 84, 3991-3994.
- Orlic,D., Girard,L.J., Anderson,S.M., and Bodine,D.M. (1999). Retrovirus receptor mRNA expression correlates with gene transfer efficiency in pluripotent hematopoietic stem cells. *Leukemia* 13 *Suppl* 1, S52-S54.
- Orlic,D., Girard,L.J., Jordan,C.T., Anderson,S.M., Cline,A.P., and Bodine,D.M. (1996). The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11097-11102.
- Patel,M., Sleep,S.E., Lewis,W.S., Spencer,H.T., Mareya,S.M., Sorrentino,B.P., and Blakley,R.L. (1997). Comparison of the protection of cells from antifolates by transduced human dihydrofolate reductase mutants. *Hum. Gene Ther.* 8, 2069-2077.

Pectasides,D., Aspropotamitis,A., Halikia,A., Visvikis,A., Antoniou,F., Kalantaridou,A., Karvounis,N., Batzios,S., and Athanassiou,A. (1999). Combination chemotherapy with carboplatin, docetaxel, and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *J. Clin. Oncol.* *17*, 3816-3821.

Pegg,A.E. (1990). Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* *50*, 6119-6129.

Pelletier,J. and Sonenberg,N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* *334*, 320-325.

Peters,S.O., Kittler,E.L., Ramshaw,H.S., and Quesenberry,P.J. (1996). Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* *87*, 30-37.

Phylactou,L.A., Tsipouras,P., and Kilpatrick,M.W. (1998). Hammerhead ribozymes targeted to the FBN1 mRNA can discriminate a single base mismatch between ribozyme and target. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *249*, 804-810.

Pich,A. and Rancourt,C. (1999). A role for intracellular immunization in chemosensitization of tumor cells? *Gene Ther.* *6*, 1202-1209.

Pirker,R., Wallner,J., Gotzl,M., Gsur,A., Geissler,K., Havelec,L., Knapp,W., Haas,O., Linkesch,W., and Lechner,K. (1992). MDR1 RNA expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia [letter; comment]. *Blood* *80*, 557-559.

Pizzorno,G., Chang,Y.M., McGuire,J.J., and Bertino,J.R. (1989). Inherent resistance of human squamous carcinoma cell lines to methotrexate as a result of decreased polyglutamylation of this drug. *Cancer Res.* *49*, 5275-5280.

Plagemann,P.G., Marz,R., and Wohlhueter,R.M. (1978). Transport and metabolism of deoxycytidine and 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine into cultured Novikoff rat hepatoma cells, relationship to phosphorylation, and regulation of triphosphate synthesis. *Cancer Res.* *38*, 978-989.

Podda,S., Ward,M., Himelstein,A., Richardson,C., Flor-Weiss,E., Smith,L., Gottesman,M., Pastan,I., and Bank,A. (1992). Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 9676-9680.

Possinger,K. (1995). Gemcitabine in advanced breast cancer. *Anticancer Drugs* *6 Suppl* *6*, 55-59.

Poulin, F., Pyronnet, S. (2000) Interactions moléculaires et initiation de la synthèse protéique. *Médecine Sciences*, vol. 16, no. 5, 617-622.

Prince,V.E. and Rigby,P.W. (1991). Derivatives of Moloney murine sarcoma virus capable of being transcribed in embryonal carcinoma stem cells have gained a functional Sp1 binding site. *J. Virol.* *65*, 1803-1811.

Pyronnet,S., Pradayrol,L., and Sonenberg,N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol. Cell* *5*, 607-616.

Rafferty,J.A., Hickson,I., Chinnasamy,N., Lashford,L.S., Margison,G.P., Dexter,T.M., and Fairbairn,L.J. (1996). Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. *Cancer Metastasis Rev.* *15*, 365-383.

Ragg,S., Xu-Welliver,M., Bailey,J., D'Souza,M., Cooper,R., Chandra,S., Seshadri,R., Pegg,A.E., and Williams,D.A. (2000). Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to in vivo selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res.* *60*, 5187-5195.

Ramchandani,S., MacLeod,A.R., Pinard,M., von Hofe,E., and Szyf,M. (1997). Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 684-689.

Reese,J.S., Koc,O.N., Lee,K.M., Liu,L., Allay,J.A., Phillips,W.P., Jr., and Gerson,S.L. (1996). Retroviral transduction of a mutant methylguanine DNA methyltransferase gene into human CD34 cells confers resistance to O6-benzylguanine plus 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 14088-14093.

Richard,R.E., Wood,B., Zeng,H., Jin,L., Papayannopoulou,T., and Blau,C.A. (2000). Expansion of genetically modified primary human hemopoietic cells using chemical inducers of dimerization. *Blood* *95*, 430-436.

Robbins,P.B., Skelton,D.C., Yu,X.J., Halene,S., Leonard,E.H., and Kohn,D.B. (1998). Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 10182-10187.

Roth,J.A. and Cristiano,R.J. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* *89*, 21-39.

Roth,J.A., Swisher,S.G., and Meyn,R.E. (1999). p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Oncology (Huntingt)* *13*, 148-154.

Ruiz,v.H., V, Veerman,G., Eriksson,S., Boven,E., Stegmann,A.P., Hermsen,M., Vermorken,J.B., Pinedo,H.M., and Peters,G.J. (1994). Development and molecular characterization of a 2',2'- difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780. *Cancer Res.* *54*, 4138-4143.

- Ruiz,v.H., V, Veerman,G., Vermorken,J.B., and Peters,G.J. (1993). 2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 762-766.
- Salmon,S.E., Grogan,T.M., Miller,T., Scheper,R., and Dalton,W.S. (1989). Prediction of doxorubicin resistance in vitro in myeloma, lymphoma, and breast cancer by P-glycoprotein staining. *J. Natl. Cancer Inst.* *81*, 696-701.
- Santi,D.V., Garrett,C.E., and Barr,P.J. (1983). On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* *33*, 9-10.
- Santoro,S.W. and Joyce,G.F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 4262-4266.
- Sato,T., Laver,J.H., and Ogawa,M. (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells [see comments]. *Blood* *94*, 2548-2554.
- Satoh,W., Hirai,Y., Tamayose,K., and Shimada,T. (2000). Site-specific integration of an adeno-associated virus vector plasmid mediated by regulated expression of rep based on cre-loxP recombination [In Process Citation]. *J. Virol.* *74*, 10631-10638.
- Sauerbrey,A., McPherson,J.P., Zhao,S.C., Banerjee,D., and Bertino,J.R. (1999). Expression of a novel double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase fusion gene confers resistance to both methotrexate and cytosine arabinoside. *Hum. Gene Ther.* *10*, 2495-2504.
- Scarabino,D. and Tocchini-Valentini,G.P. (1996). Influence of substrate structure on cleavage by hammerhead ribozyme. *FEBS Lett.* *383*, 185-190.
- Schroder,J.K., Kirch,C., Flasshove,M., Kalweit,H., Seidelmann,M., Hilger,R., Seeber,S., and Schutte,J. (1996). Constitutive overexpression of the cytidine deaminase gene confers resistance to cytosine arabinoside in vitro. *Leukemia* *10*, 1919-1924.
- Schroder,J.K., Seidelmann,M., Kirch,H.C., Seeber,S., and Schutte,J. (1998). Assessment of resistance induction to cytosine arabinoside following transfer and overexpression of the deoxycytidylate deaminase gene in vitro. *Leuk. Res.* *22*, 619-624.
- Shand,N., Weber,F., Mariani,L., Bernstein,M., Gianella-Borradori,A., Long,Z., Sorensen,A.G., and Barbier,N. (1999). A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum. Gene Ther.* *10*, 2325-2335.
- Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* *33*, 787-791.

- Shih,C.C., Hu,M.C., Hu,J., Medeiros,J., and Forman,S.J. (1999). Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells [see comments]. *Blood* 94, 1623-1636.
- Shimayama,T., Nishikawa,S., and Taira,K. (1995). Extraordinary enhancement of the cleavage activity of a DNA-armed hammerhead ribozyme at elevated concentrations of Mg²⁺ ions. *FEBS Lett.* 368, 304-306.
- Shipp,M.A., Takvorian,R.C., and Canellos,G.P. (1984). High-dose cytosine arabinoside. Active agent in treatment of non- Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Med.* 77, 845-850.
- Sirotnak,F.M., Moccio,D.M., Kelleher,L.E., and Goutas,L.J. (1981). Relative frequency and kinetic properties of transport-defective phenotypes among methotrexate-resistant L1210 clonal cell lines derived in vivo. *Cancer Res.* 41, 4447-4452.
- Somasekaram,A., Jarmuz,A., How,A., Scott,J., and Navaratnam,N. (1999). Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 274, 28405-28412.
- Sorm,F., Piskala,A., Cihak,A., and Vesely,J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20, 202-203.
- Sorm,F. and Vesely,J. (1968). Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 15, 339-343.
- Sorrentino,B.P., Brandt,S.J., Bodine,D., Gottesman,M., Pastan,I., Cline,A., and Nienhuis,A.W. (1992). Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 257, 99-103.
- Spencer,H.T., Sleep,S.E., Rehg,J.E., Blakley,R.L., and Sorrentino,B.P. (1996). A gene transfer strategy for making bone marrow cells resistant to trimetrexate. *Blood* 87, 2579-2587.
- Sporn,M.B. (1997). The war on cancer: a review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 833, 137-146.
- Steffen,D. and Weinberg,R.A. (1978). The integrated genome of murine leukemia virus. *Cell* 15, 1003-1010.
- Steuart,C.D. and Burke,P.J. (1971). Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nat. New Biol.* 233, 109-110.
- Stryckmans,P., De Witte,T., Bitar,N., Marie,J.P., Suci,S., Solbu,G., Debusscher,L., Bury,J., Peetermans,M., and Andrien,J.M. (1987). Cytosine arabinoside for induction, salvage, and consolidation therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Oncol.* 14, 67-72.

- Sun,L.Q., Cairns,M.J., Gerlach,W.L., Witherington,C., Wang,L., and King,A. (1999). Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme. *J. Biol. Chem.* 274, 17236-17241.
- Sun,L.Q., Cairns,M.J., Saravolac,E.G., Baker,A., and Gerlach,W.L. (2000). Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol. Rev.* 52, 325-347.
- Suzuki,M., Sugimoto,Y., Tsukahara,S., Okochi,E., Gottesman,M.M., and Tsuruo,T. (1997). Retroviral coexpression of two different types of drug resistance genes to protect normal cells from combination chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 3, 947-954.
- Takeuchi,M., Shichinohe,T., Senmaru,N., Miyamoto,M., Fujita,H., Takimoto,M., Kondo,S., Katoh,H., and Kuzumaki,N. (2000). The dominant negative H-ras mutant, N116Y, suppresses growth of metastatic human pancreatic cancer cells in the liver of nude mice. *Gene Ther.* 7, 518-526.
- Thompson,J.D., Ayers,D.F., Malmstrom,T.A., McKenzie,T.L., Ganousis,L., Chowrira,B.M., Couture,L., and Stinchcomb,D.T. (1995). Improved accumulation and activity of ribozymes expressed from a tRNA- based RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.* 23, 2259-2268.
- Tisdale,J.F., Hanazono,Y., Sellers,S.E., Agricola,B.A., Metzger,M.E., Donahue,R.E., and Dunbar,C.E. (1998). Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood* 92, 1131-1141.
- Tong,W.P., Kirk,M.C., and Ludlum,D.B. (1982). Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1- deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N- nitrosourea. *Cancer Res.* 42, 3102-3105.
- Trask,T.W., Trask,R.P., Aguilar-Cordova,E., Shine,H.D., Wyde,P.R., Goodman,J.C., Hamilton,W.J., Rojas-Martinez,A., Chen,S.H., Woo,S.L., and Grossman,R.G. (2000). Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol. Ther.* 1, 195-203.
- van Tol,H., Buzayan,J.M., Feldstein,P.A., Eckstein,F., and Bruening,G. (1990). Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. *Nucleic Acids Res.* 18, 1971-1975.
- Wang,F.S., Kobayashi,H., Liang,K.W., Holland,J.F., and Ohnuma,T. (1999a). Retrovirus-mediated transfer of anti-MDR1 ribozymes fully restores chemosensitivity of P-glycoprotein-expressing human lymphoma cells. *Hum. Gene Ther.* 10, 1185-1195.
- Wang,L., Munch-Petersen,B., Herrstrom,S.A., Hellman,U., Bergman,T., Jornvall,H., and Eriksson,S. (1999b). Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett.* 443, 170-174.

- Ward,M., Richardson,C., Pioli,P., Smith,L., Podda,S., Goff,S., Hesdorffer,C., and Bank,A. (1994). Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene in human CD34+ cells. *Blood* 84, 1408-1414.
- Waters,J.S., Webb,A., Cunningham,D., Clarke,P.A., Raynaud,F., di Stefano,F., and Cotter,F.E. (2000). Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma [see comments]. *J. Clin. Oncol.* 18, 1812-1823.
- Weichselbaum,R.R. and Kufe,D. (1997). Gene therapy of cancer. *Lancet* 349 Suppl 2, SII10-SII12.
- Weinberg,R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weissman,I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
- Williams,D.A., Hsieh,K., Desilva,A., and Mulligan,R.C. (1987). Protection of bone marrow transplant recipients from lethal doses of methotrexate by the generation of methotrexate-resistant bone marrow. *J. Exp. Med.* 166, 210-218.
- Wodinsky,I. and Kensler,C.J. (1965). Activity of cytosine arabinoside (NSC-63878) in a spectrum of rodent tumors. *Cancer Chemother. Rep.* 47, 65-68.
- Wright,W.E. and Shay,J.W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.* 6, 849-851.
- Wu,Y., Yu,L., McMahon,R., Rossi,J.J., Forman,S.J., and Snyder,D.S. (1999). Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum. Gene Ther.* 10, 2847-2857.
- Xiang,J., Chen,Y., and Moyana,T. (2000). Combinational immunotherapy for established tumors with engineered tumor vaccines and adenovirus-mediated gene transfer [In Process Citation]. *Cancer Gene Ther.* 7, 1023-1033.
- Xu-Welliver,M., Kanugula,S., and Pegg,A.E. (1998). Isolation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O6-benzylguanine. *Cancer Res.* 58, 1936-1945.
- Yamazaki,H., Kijima,H., Ohnishi,Y., Abe,Y., Oshika,Y., Tsuchida,T., Tokunaga,T., Tsugu,A., Ueyama,Y., Tamaoki,N., and Nakamura,M. (1998). Inhibition of tumor growth by ribozyme-mediated suppression of aberrant epidermal growth factor receptor gene expression [see comments]. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 581-587.

- Ye,X., Rivera,V.M., Zoltick,P., Cerasoli,F., Jr., Schnell,M.A., Gao,G., Hughes,J.V., Gilman,M., and Wilson,J.M. (1999). Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science* 283, 88-91.
- Yuen,A.R., Halsey,J., Fisher,G.A., Holmlund,J.T., Geary,R.S., Kwoh,T.J., Dorr,A., and Sikic,B.I. (1999). Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* 5, 3357-3363.
- Yuyama,N., Ohkawa,J., Inokuchi,Y., Shirai,M., Sato,A., Nishikawa,S., and Taira,K. (1992). Construction of a tRNA-embedded-ribozyme trimming plasmid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 1271-1279.
- Zhang,Y., Mukhopadhyay,T., Donehower,L.A., Georges,R.N., and Roth,J.A. (1993). Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. *Hum. Gene Ther.* 4, 451-460.
- Zhao,S.C., Banerjee,D., Mineishi,S., and Bertino,J.R. (1997). Post-transplant methotrexate administration leads to improved curability of mice bearing a mammary tumor transplanted with marrow transduced with a mutant human dihydrofolate reductase cDNA. *Hum. Gene Ther.* 8, 903-909.
- Zheng,C., Baum,B.J., Iadarola,M.J., and O'Connell,B.C. (2000). Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector [see comments]. *Nat. Biotechnol.* 18, 176-180.
- Zhu,C., Johansson,M., and Karlsson,A. (2000). Incorporation of nucleoside analogs into nuclear or mitochondrial DNA is determined by the intracellular phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 275, 26727-26731.
- Ziegler,B.L., Valtieri,M., Porada,G.A., De Maria,R., Muller,R., Masella,B., Gabbianelli,M., Casella,I., Pelosi,E., Bock,T., Zanjani,E.D., and Peschle,C. (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285, 1553-1558.
- Zou,L., Zhou,H., Pastore,L., and Yang,K. (2000). Prolonged transgene expression mediated by a helper-dependent adenoviral vector (hdAd) in the central nervous system. *Mol. Ther.* 2, 105-113.
- Zuker,M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48-52.

ANNEXE 2

Article:

Gene amplification of human cytidine deaminase proviral cDNA and increased levels of its mRNA produces enhanced drug resistance to cytosine arabinoside in retroviral-transduced murine fibroblast.

Christian M. Beauséjour and Richard L. Momparler

Cancer Letters 135, 29-36 (1999).



ELSEVIER

Cancer Letters 135 (1999) 29–36

**CANCER
LETTERS**

Gene amplification of human cytidine deaminase proviral cDNA and increased levels of its mRNA produces enhanced drug resistance to cytosine arabinoside in retroviral-transduced murine fibroblasts

Christian M. Beauséjour, Richard L. Momparler*

Département de Pharmacologie, Université de Montréal et Centre de Recherche Pédiatrique, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

Received 20 May 1998; accepted 18 August 1998

Abstract

Hematopoietic toxicity is one of the major problems that limits the effectiveness of many antineoplastic drugs. One approach to overcome this problem is to confer chemoresistance to the hematopoietic cells by gene transfer of drug resistance genes. Human cytidine deaminase (CD) inactivates the cytosine nucleoside analogues, such as cytosine arabinoside (ARA-C), by deamination. We have reported previously that retroviral-mediated gene transfer of CD conferred drug resistance to ARA-C in murine cells. One of the major problems in the use of these vectors is to obtain adequate and prolonged expression of the transferred gene to produce a therapeutic effect in the transduced cells. The objective of this investigation was to determine if it is possible to increase the expression of CD proviral DNA in transduced murine fibroblast cells. We observed that by the use of continuous exposure to increasing concentrations of ARA-C it was possible to enhance drug resistance in the transduced cells. This drug resistance was found to be associated with increases in CD enzyme activity and CD proviral mRNA and by amplification of the proviral CD gene. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cytosine arabinoside; Drug resistance; Gene amplification; Cytidine deaminase; Proviral DNA; mRNA

1. Introduction

One approach to overcome the problem of bone marrow toxicity produced by anticancer drugs is to confer chemoresistance to the hematopoietic cells by transfer of drug resistance gene [1,2]. Several groups have demonstrated that gene transfer of the multidrug

resistance (MDR) gene confers drug resistance to MDR drugs in murine hematopoietic cells [3,4]. This fundamental work on the use of gene therapy for chemoprotection has been extended into clinical trials of breast cancer [5]. Other drug resistance genes have also been used to protect the bone marrow from the toxicity of different anticancer agents. Gene transfer of the dihydrofolate reductase (DHFR) gene and the glutathione *S*-transferase gene into hematopoietic cells confers drug resistance to methotrexate (MTX) [6,7] and alkylating agents [8], respectively. The guanine alkyltransferase gene was shown to

* Corresponding author. Centre de Recherche, Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada. Tel.: + 1-514-3456140; fax: + 1-514-3454801; e-mail: momparlr@ere.umontreal.ca.

confer drug resistance in hematopoietic cells to nitrosourea [9].

Cytidine deaminase (CD) catalyses the deamination of cytidine and deoxycytidine (CdR). In addition, this enzyme can deaminate cytosine nucleoside analogues, such as cytosine arabinoside (ARA-C), 2',2'-difluorodeoxycytidine (dFdC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), resulting in a significant loss of their antineoplastic activity [10,11]. ARA-C and 5-AZA-CdR are active drugs for the therapy of leukemia [12–14]. Both dFdC and 5-AZA-CdR show promising antitumor activity in clinical trials [15–17]. The dose limiting toxicity of all these cytosine nucleoside analogues is myelosuppression.

We have demonstrated that retroviral-mediated transfer of the human CD gene can confer drug resistance to ARA-C in murine hematopoietic cells [11]. Our preliminary data showed that gene transfer of the CD gene could also confer drug resistance in murine fibroblasts to dFdC and 5-AZA-CdR [10].

One of the major problems in the use of drug resistance genes to confer chemoprotection in the clinical therapy of cancer is to obtain adequate expression of these genes in hematopoietic cells [18,19] to make them resistant to cytotoxic concentrations of the anticancer agent. The classic work of Schimke et al. [20,21] showed that continuous selection with increasing concentrations of MTX produced gene amplification and enhanced the expression of the DHFR gene which conferred drug resistance to this antifolate. In this report we have investigated the use of selective pressure of increasing concentrations of ARA-C to amplify the CD proviral gene and increase its expression in CD-transduced murine fibroblasts. Our data indicate that both gene amplification and increased RNA levels are involved in the enhancement of CD activity and drug resistance to ARA-C.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture techniques

Cell lines were grown in Dulbecco's modified essential medium (Canadian Life Technologies, Burlington, Ontario) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Wisent Technologies, St-Bruno, Québec) and 5 µg/ml Gentamycin (Cana-

dian Life Technologies) at 37°C in a 7% CO₂ incubator. The 3T3-V6 clone was obtained from the transduction of NIH 3T3 mouse fibroblasts with retroviral particles containing the human CD cDNA which were collected from a virus-producing GP + E-86-CD-3 packaging cell line as described previously [11]. Clonogenic assays were performed as follows: 200 cells in 2 ml of medium were placed in six-well Costar tissue culture dishes. The next day different concentrations of ARA-C (Upjohn Canada, Don Mills, Ontario) were added to the medium. At 12–14 days later, the medium was removed and the colonies were stained with 0.5% Methylene Blue in 50% methanol and counted.

2.2. Establishment of 3T3-V6 amplified cells resistant to ARA-C

In order to increase the ARA-C resistance of the parental cells (3T3-V6), we exposed them to step-wise increasing concentrations of ARA-C. Briefly, the 3T3-V6 cells were plated at 25 000 cells per 25 cm² flask and grown up to a 90–95% confluence before dilution by trypsinization. The drug-treated cells were judged to be suitable to tolerate an increasing dose of ARA-C only when the cellular morphology appeared to be normal. The cells were then trypsinized; diluted five-fold and grown to reach confluency once again. At the end of this 26 weeks step-wise process, the 3T3-V6-treated cells (3T3-V6 amp) were able to grow in the presence of 100 µM of ARA-C with a doubling time of about 45 h as compared to the doubling time of about 30 h for the parental 3T3-V6 cells in the absence of ARA-C.

2.3. Enzyme assay

Briefly, 2–5 × 10⁷ monolayer cells were trypsinized, centrifuged and washed once in phosphate-buffered saline. They were then centrifuged and resuspended in 100 µl of 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 5 mM dithiothreitol. The cell suspension was then subjected to a rapid freeze-thaw three times. The mixture was centrifuged at maximum speed in a micro centrifuge for 15 min. The molarity of the supernatant (cytosol) was then increased to 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). The protease inhibitors leupeptin, aprotinin and pepstatin (Boehringer Mannheim, Laval, Québec) were added to a final concentration

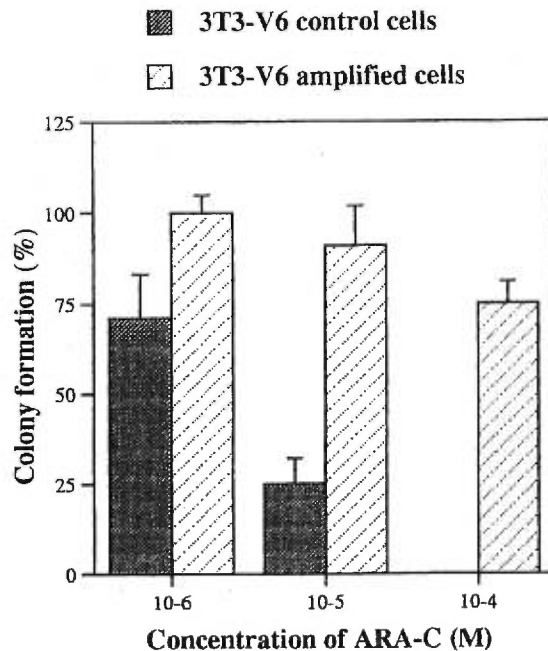


Fig. 1. Inhibition of colony formation by ARA-C. The cell lines were incubated with the indicated concentration of ARA-C for 72 h. Colony formation was measured as described in Section 2. No colonies were observed for the control cells treated with 0.1 μ M ARA-C. The bar and the vertical lines represent the mean value and SD, respectively, for three to four experiments.

of 1 ng/ μ l, respectively. Different dilutions of the cytosol were used in 30-min incubation at 37°C to determine CD activity by measuring the conversion of [³H]cytidine to [³H]uridine as described previously [22]. CdR kinase activity was determined by measuring [¹⁴C]CdR conversion into [¹⁴C]dCMP. Briefly, 5 μ l of cytosol was added to a 50 μ l total mixture containing 100 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 100 μ M tetrahydrouridine, 10 μ M [¹⁴C]CdR and 100 μ M mercaptoethanol for a 30 min incubation at 37°C. [¹⁴C]dCMP formation was determined by loading the enzyme mixture on DEAE discs previously washed with 0.01 N HCl and washed with H₂O before being dried and analyzed for radioactivity in liquid scintillation fluid.

2.4. Northern blot analysis

Total RNA was isolated from cells using the Biotex Laboratories Ultraspec II Isolation kit (Biotex Labora-

tories, Houston, TX). The cells were lysed with a guanidine solution and RNA was extracted with chloroform, precipitated with isopropanol and purified by binding to the resin. Total RNA was eluted from the resin with diethylpyrocarbonate-treated TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8)) and stored at -70°C. Samples of 10 μ g of RNA in loading buffer were heated at 65°C and electrophoresed in borate buffer through a 1.5% agarose-borate-1.1% formaldehyde gel. After ultraviolet photography of the gel, the RNA in the gel was blotted onto a Hybond-N nylon membrane (Amersham, Oakville, Ontario). The membrane was then baked at 80°C for 2 h and irradiated in a Bioslink UV linker with 0.3 J/cm². The probe was prepared by labeling the complete cDNA for human CD by PCR using two internal specific primers and [³²P]dCTP from ICN (Mississauga, Ontario). The membrane was prehybridized in 8 ml Express Hyb solution (Clontech, Palo Alto, CA) at 60°C and hybridized at 65°C with 1.2 \times 10⁷ cpm of the cDNA probe containing 1 mg of fish sperm DNA (Boehringer Mannheim). The membrane was then washed with SSC and SDS. The membrane was stripped in boiling 0.1% SDS and reprobed under the same conditions with either ribosome protein L32 DNA probe (a gift from Dr Marie Trudel, IRCM, Montreal) or CdR kinase probe; both were labeled by the random prime method (Boehringer Mannheim kit) using [³²P]dCTP. The blots were exposed on a phosphor screen for 3 days and developed using a PhosphorImager from Molecular Dynamics.

2.5. Southern blot analysis

Genomic DNA was isolated from cells with the DNA Extraction kit (Stratagene, La Jolla, CA). About 2 \times 10⁷ cells were lysed with a mixture of 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA and 2% SDS, followed by digestion with 50 mg/ml proteinase K. A saturated NaCl solution was then added, followed by centrifugation and RNase treatment of the supernatant. DNA was precipitated with ethanol, dried and suspended in TE buffer.

For Southern blot analysis, 8 μ g of DNA was digested with *Nco*I and *Bam*HI or *Bgl*III and separated by electrophoresis on a 1% agarose gel in a TAE buffer (40 mM Tris-acetate, EDTA 1 mM). After UV photography, the gel was placed in a denaturing

Table 1
Cytidine deaminase (CD) activity of 3T3-V6 control and CD amplified cells

Cell line	CD enzyme activity (units/mg) ^a
3T3-V6 control	22 ± 2
3T3-V6 amplified	178 ± 8

^a Values represent the mean ± SD ($n = 3$). Units, 1 nmol cytidine deaminated per min.

solution (0.5 mM NaOH, 0.15 mM NaCl) and then in a neutralizing buffer (0.5 mM Tris-HCl (pH 7), 1.5 M NaCl). The DNA was then transferred onto a Hybond-N nylon membrane. The membrane was probed with the same human CD cDNA in the same hybridization conditions as described for Northern blot analysis. The membrane was then exposed on a phosphor screen for 3 days and developed using a PhosphorImager from Molecular Dynamics.

3. Results

In order to determine the level of ARA-C resistance

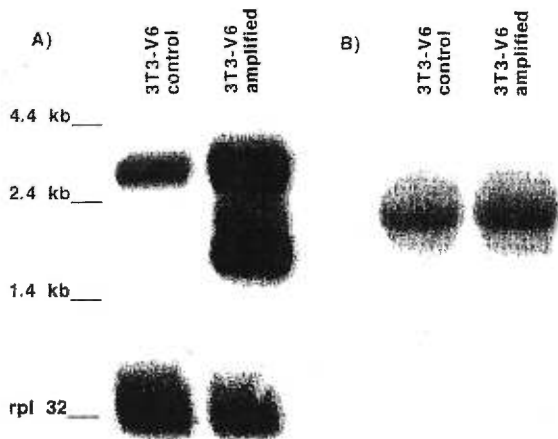


Fig. 2. Northern blot hybridization with cytidine deaminase (CD) and deoxycytidine (CdR) kinase probes. Total RNA (10 μ g) from each indicated cell line was used. The membrane was hybridized with ³²P-labeled CD cDNA probe (A) or with ³²P-labeled CdR kinase cDNA probe (B). rpl 32 ribosomal cDNA probe labeled with ³²P was used as a control to standardize the relative amounts of RNA.

acquired by the 3T3-V6 amp cells as compared to the parental 3T3-V6 cells, a clonogenic assay was used (Fig. 1). ARA-C at a concentration of 1 μ M (10^{-6} M) reduced the colony formation of the 3T3-V6 cells by more than 25% whereas at this same concentration the 3T3-V6 amp cells were unaffected. At 10 μ M (10^{-5} M) ARA-C produced a 75% loss of clonogenicity for the 3T3-V6 cells whereas the 3T3-V6 amp cells showed almost complete drug resistance. At 100 μ M (10^{-4} M) ARA-C produced only a 25% loss of colony formation for the 3T3-V6 amp cells and no colony formation by the 3T3-V6 cells.

Enzymatic assays for CD and CdR kinase activities were performed to determine the correlation between the enzymatic activity of these enzymes and resistance to ARA-C. CD activity for the 3T3-V6 amp cells was found to be eight-fold increased when compared to the 3T3-V6 cells (Table 1). However, CdR kinase activity was not significantly changed by the ARA-C treatment since only a slight decrease (< 5%) in activity was observed in 3T3-V6 amp cells (data not shown).

Northern blot analysis showed efficient mRNA expression of the transduced CD gene in both the 3T3-V6 and 3T3-V6 amp cells (Fig. 2A). Two transcripts for CD of around 2.8 and 1.9 kb were seen, which correspond to the predicted size of the unspliced and spliced transcripts of the retroviral vector (MFG-CD) that was used to transduce the 3T3 cells. The unspliced 2.8 kb transcript band was around three times more intense for the 3T3-V6 amp cells as compared to the 3T3-V6 cells. However, the 1.9 kb spliced transcript was much more intense showing a 31-fold increase in the 3T3-V6 amp cells in comparison with the 3T3-V6 cells. This extremely high level of the proviral mRNA correlates with the high CD enzyme activity of the 3T3-V6 amp cells. As expected from the CdR kinase enzyme assay, the mRNA level of CdR kinase was not changed (Fig. 2B).

In order to determine if gene amplification of the proviral CD cDNA took place, we performed a Southern blot analysis with the purified genomic DNA digested with *NcoI* and *BamHI* (Fig. 3A). The analysis revealed a DNA band of around 0.45 kb which is similar to the predicted size of the coding region of CD proviral cDNA. The intensity of the DNA band was twice as high in the 3T3-V6 amp

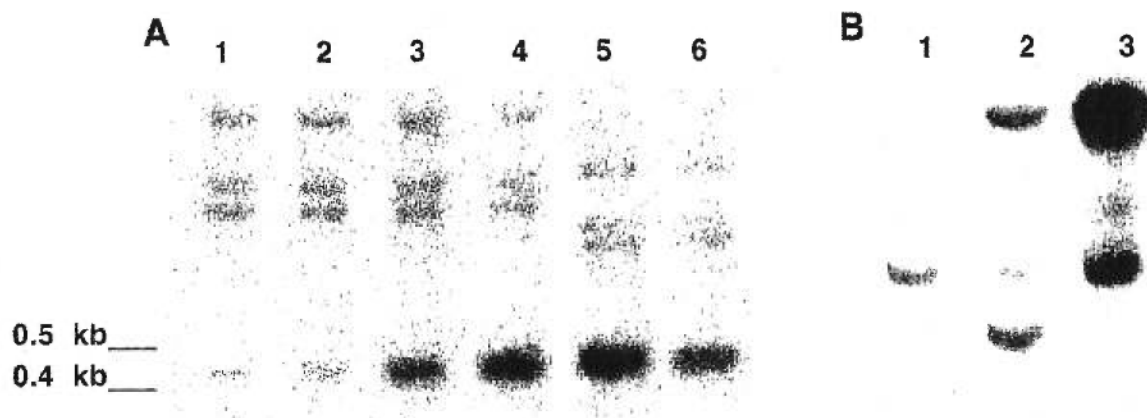


Fig. 3. Southern blot hybridization of DNA digested with *Nco*I and *Bam*HI (A) or *Nco*I and *Bgl*II (B). Hybridization was performed with 32 P-labeled cytidine deaminase (CD) cDNA probe. Estimation of the copy number was performed by adding graded amounts of MFG-CD retroviral vector to DNA from non-transduced 3T3 cells. (A) Lanes 1–4, 0.5, one, two and four copies of the proviral CD gene, respectively; lane 5, DNA from 3T3-V6 amp (pretreated with ARA-C); lane 6, DNA from 3T3-V6 control (no ARA-C treatment). (B) Lanes 1–3, 3T3, 3T3-V6 control and 3T3-V6 amp, respectively. To assess the loading of equal amounts of DNA, densitometric correction was performed using the mouse genomic CD bands as a reference.

cells as compared to the 3T3-V6 cells, indicating that the gene amplification occurred. Three other minor bands were also observed in both the 3T3-V6 amp and 3T3-V6 cells, as well as in the non-transduced parental 3T3 cells (data not shown), suggesting that these three bands may be intron-exon fragments of the mouse genomic CD gene. An estimate of the copy number was performed by loading variable amounts of CD cDNA, corresponding to a specific number of vector copies per cell, to a constant amount of genomic DNA from non-transduced cells. We also estimated the copy number by a densitometric analysis during which we compared the intensity of the mouse genomic CD bands to the CD proviral cDNA band using the mouse genomic CD bands as a reference for one copy in order to standardize the amount of DNA loaded in each lane. In both types of analysis, the copy number analysis indicated that the parental 3T3-V6 cells have two copies of the transduced CD proviral cDNA as compared to four copies for the 3T3-V6 amp cells (Fig. 3A). Genomic DNA from 3T3-V6 amp cells digested with *Nco*I and *Bgl*II showed a different hybridization pattern as compared to the 3T3-V6 control cells. One of the two copies of the proviral CD in 3T3-V6 cells was deleted or translocated (Fig. 3B).

4. Discussion

Different types of drug resistance genes have been inserted into hematopoietic cells to confer chemoprotection against the toxic effects of different anticancer agents [4,6–9]. One important problem with the use of retroviral vectors for gene transfer in these studies is in relation to obtaining adequate and prolonged expression of the therapeutic gene [18,19]. We have reported that retroviral-mediated transfer of the human CD gene can confer drug resistance to cytosine nucleoside analogues [10,11]. Gene amplification is another mechanism by which cells may become resistant to anticancer agents. Schimke et al. [20,21] demonstrated that by the use of high selective pressure of continuously increasing concentrations of methotrexate, it was possible to amplify and increase the expression in mammalian cells of the target gene of this analogue, DHFR. The objective of this work was to determine if high selective pressure of ARA-C could increase the expression of the proviral CD gene in transduced cells.

In this study, we have shown that continuous exposition of the parental 3T3-V6 cells (CD transduced) to increasing concentrations of ARA-C produced an enhancement of its resistance to this cytosine nucleo-

side analogue. Clonogenic assays were performed to evaluate the degree of enhanced resistance acquired by the 3T3-V6 amp clone. The results clearly showed that the 3T3-V6 amp cells were more resistant up to two orders of magnitude than the 3T3-V6 parental clone (Fig. 1). We then determined if this high level of drug resistance correlated with CD activity. As shown in Table 1, for the 3T3-V6 amp cells, the CD activity was increased up to eight-fold as compared to the parental 3T3-V6 cells. The increase in CD activity was proportional to the level of ARA-C resistance during the step-wise increase in concentration of this analogue (data not shown).

To evaluate if gene amplification of the proviral CD gene occurred, we digested genomic DNA at the restriction enzyme sites used to clone the CD gene into the retroviral vector. Southern blot analysis showed for the 3T3-V6 amp cells an amplified DNA fragment about twice the intensity as the one in the parental cells (Fig. 3A). If we assume that there is a high level of homology between the mouse and the human CD cDNA, the three minor bands observed in the Southern blot are probably intron-exon fragments of the mouse CD genomic DNA digested randomly. These data suggest that the proviral CD was amplified, but not the genomic CD gene, in the 3T3-V6 amp cells. It is possible that the selection process favors the amplification of the smaller size of the proviral CD (0.5 kb) rather than the larger genomic CD gene (range 10–100 kb). However, there are reports in the literature which state that under certain conditions large genes can be amplified [23].

Digestion of the genomic DNA with the same restriction enzyme that cuts the 5' site of the cloned CD and the *Bgl*III restriction enzyme cutting randomly in the genomic DNA revealed genetic variability in the 3T3-V6 amp cells (Fig. 3B). This Southern blot showed that one copy of the proviral CD from the 3T3-V6 control cells was absent. This observation suggests that deletion or translocation events could have occurred and enhanced the amplification process [24,25].

Treatment of mammalian cells with hydroxyurea, MTX and ARA-C, agents which induce transient arrest of DNA replication, has been shown to increase the rate of gene amplification [26–30]. In the case of ARA-C, this analogue was demonstrated to notably

increase drug resistance to *N*-(phosphonoacetyl)-L-aspartate and 5-fluoro-2'-deoxycytidine, which was due to gene amplification of the carbamyl-phosphate synthetase/aspartate transcarbamylase/dihydro-orotase (CAD) and thymidylate synthetase genes, respectively [26]. Apparently, when ARA-C inhibits DNA synthesis it can produce an increase in sister chromatid exchange or duplicate replication of small chromosome fragments, conditions which can increase the frequency of gene amplification.

In our Northern blot analysis (Fig. 2), we noticed a three-fold increase of the unspliced and a 31-fold increase of the spliced transcript in the 3T3-V6 amp cells. This increase cannot be explained only by the gene amplification mechanism. The elevated levels of mRNA transcript were obtained by either increased mRNA stability or splicing and appear to be the major mechanism used by the 3T3-V6 amp cells to enhance drug resistance to ARA-C. In accordance with these findings is the report that increased levels of spliced RNA could account for the increased target gene expression in hematopoietic cells transduced with the MFG retroviral vector [31], the same vector used in our experiments.

Drug resistance to ARA-C can result from other mechanisms such as a decrease in CdR kinase activity, an increase in dCTP or an increase in DNA repair [32,33]. In our study, only the CdR kinase was investigated. Enzyme assay and Northern blot analysis showed similar levels of CdR kinase enzyme activity and mRNA transcript levels, respectively, for both 3T3-V6 and 3T3-V6 amp cells (Fig. 3B). Since CD and the CdR kinase are the two key enzymes involved in ARA-C metabolism, we feel that the large increase in CD enzyme activity in the 3T3-V6 amp cells is the major mechanism of drug resistance in this clone.

The fact that continuous exposure to ARA-C of CD transduced cells has the potential to enhance drug resistance to this analogue by mechanisms that involve increased splicing or stability mRNA transcript may have important implications in chemoprotection-based gene therapy. Investigation of the molecular mechanism involved in processing of RNA leading to enhanced expression of the transduced gene may be useful to help design more efficient retroviral vectors for gene transfer.

Acknowledgements

This work was supported by a grant (MT-13754) from the Medical Research Council of Canada. C.M.B. was supported by a studentship from the Téléthon des Etoiles.

References

- [1] D. Banerjee, S.C. Zhao, M.-X. Li, B.I. Schwitzer, S. Mineishi, J. Bertino, Gene therapy. Utilizing drug resistance genes: a review, *Stem Cells* 12 (1994) 378–385.
- [2] O.N. Koc, J.A. Allay, K. Lee, B.M. Davis, J.S. Reese, S.L. Gerson, Transfer of drug resistance genes into hematopoietic progenitors to improve chemotherapy tolerance, *Semin. Oncol.* 23 (1996) 46–65.
- [3] M. Ward, C. Richardson, P. Pioli, L. Smith, S. Podda, S. Goff, C. Hesdorfer, A. Bank, Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene in human CD34 + cells, *Blood* 84 (1994) 1408–1414.
- [4] B.P. Sorrentino, S.J. Brandt, D. Bodine, M. Gottesma, I. Pastan, A. Cline, A.W. Nienhuis, Selection of drug-resistant bone marrow cells *in vivo* after retroviral transfer of human MDR1, *Science* 257 (1992) 99–103.
- [5] J.A. O'Shaughnessy, K.H. Cowan, A.W. Nienhuis, Retroviral mediated transfer of the human multidrug resistance gene (MDR-1) into hematopoietic stem cells during autologous transplantation after intensive chemotherapy for metastatic breast cancer, *Hum. Gene Ther.* 5 (1994) 891–911.
- [6] S.C. Zhao, M.-X. Li, D. Banerjee, B.I. Schwietzer, S. Mineishi, E. Giboa, J.R. Bertino, Long term protection of recipient mice from lethal doses of methotrexate by marrow infected with a double copy vector retrovirus containing a mutant dihydrofolate reductase, *Cancer Gene Ther.* 1 (1994) 27–33.
- [7] D. Banerjee, B.I. Schweitzer, M. Volkenandt, M.-X. Li, M. Waltham, S. Mineishi, S.-C. Zhao, J.R. Bertino, Transfection with a cDNA encoding a Ser31 or Ser34 mutant human dihydrofolate reductase into Chinese hamster ovary and mouse marrow progenitor cells confers methotrexate resistance, *Gene* 139 (1994) 269–284.
- [8] S. Létourneau, M. Greenbaum, D. Cournoyer, Retrovirus-mediated gene transfer of rat glutathione S-transferase Yc confers *in vitro* resistance to alkylating agents in human leukemia cells and in primary mouse hematopoietic progenitor cells, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 831–840.
- [9] J.A. Allay, L.L. Dumenco, O.N. Koc, L. Liu, S.L. Gerson, Retroviral transduction and expression of the human alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells, *Blood* 85 (1995) 3342–3351.
- [10] N. Eliopoulos, D. Cournoyer, R.L. Momparler, Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2,2'-difluorodeoxycytidine and cytosine arabinoside, conferred by gene transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998), in press.
- [11] R.L. Momparler, N. Eliopoulos, V. Bovenzi, S. Létourneau, M. Greenbaum, D. Cournoyer, Resistance to cytosine arabinoside by retroviral-mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells, *Cancer Gene Ther.* 3 (1996) 331–338.
- [12] S.N. Wolff, R.H. Herzig, G.L. Philips, H.M. Lazarus, J.P. Greer, R.S. Stein, W.A. Ray, G.P. Herzig, High-dose cytosine arabinoside and daunorubicin as consolidation therapy for acute nonlymphocytic leukemia in first remission: an update, *Semin. Oncol.* 14 (Suppl. 1) (1987) 12–17.
- [13] R.L. Momparler, G.E. Rivard, M. Gyger, Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia, *Pharmacol. Ther.* 30 (1986) 277–286.
- [14] G.E. Rivard, R.L. Momparler, J. Demers, P. Benoit, R. Raymond, K.T. Lin, L.F. Momparler, Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia, *Leuk. Res.* 5 (1981) 453–462.
- [15] B. Lund, O.P. Hansen, K. Theilade, M. Hansen, J.P. Nejt, Phase II study of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in previously treated ovarian cancer patients, *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 1530–1533.
- [16] R.P. Abratt, W.R. Bezwoda, G. Falkson, L. Goedhals, D. Hacking, T.A. Rugg, Efficacy and safety profile of gemcitabine in non-small-cell lung cancer: a phase II study, *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 1535–1540.
- [17] R.L. Momparler, D.Y. Bouffard, L.F. Momparler, J. Dionne, K. Bélanger, J. Ayoub, Pilot phase I–II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in patients with metastatic lung cancer, *Anticancer Drugs* 8 (1997) 358–368.
- [18] T.D. Palmer, G.J. Rosman, W.R. Osborne, D. Miller, Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 1330–1334.
- [19] R.C. Mulligan, The basic science of gene therapy, *Science* 260 (1993) 926–931.
- [20] F.W. Alt, R.E. Kellems, J.R. Bertino, R.T. Schimke, Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistance variants of cultured murine cells, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1357–1370.
- [21] R.T. Schimke, Gene amplification, drug resistance and cancer, *Cancer Res.* 44 (1984) 1735–1742.
- [22] J. Laliberté, R.L. Momparler, Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning and expression of its cDNA, *Cancer Res.* 54 (1994) 5401–5407.
- [23] G.R. Stark, M. Debatisse, F. Glilotto, G.M. Wahl, Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification, *Cell* 57 (1989) 901–908.
- [24] M. Meuth, Illegitimate recombination in mammalian cells, in: D.E. Berg, M. Howe (Eds.), *Mobile DNA*, American Society of Microbiology, Washington, DC, 1989, pp. 231–237.
- [25] G.M. Wahl, The importance of circular DNA in mammalian gene amplification, *Perspect. Cancer Res.* 49 (1989) 1333–1340.
- [26] B. Goz, P.L. Carl, T.D. Tlsty, 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine enhancement of resistance to several antineoplastic drugs in mammalian tissue culture cells, *Mol. Pharmacol.* 36 (1989) 360–365.
- [27] P.C. Brown, T.D. Tlsty, R.T. Schimke, Enhancement of meth-

- otrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by treatment of mouse 3T6 cells with hydroxyurea, *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983) 1097–1107.
- [28] P. Hahn, L.N. Kapp, W.F. Morgam, R.B. Painter, Chromosomal changes without DNA over-production in hydroxyurea treated mammalian cells: implications for gene amplification, *Cancer Res.* 46 (1986) 4607–4612.
- [29] G.C. Rice, V. Ling, R.T. Schimke, Frequencies of independent and simultaneous selection of Chinese hamster cells for methotrexate and dioxorubicin (adriamycin) resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 9261–9264.
- [30] G.R. Stark, DNA amplification in drug resistant cells and tumors, *Cancer Surveys* 5 (1986) 1–23.
- [31] W.J. Krall, D.C. Skelton, X.-J. Yu, I. Riviere, P. Lehn, R.C. Mulligan, D.B. Kohn, Increased levels of spliced RNA account for augmented expression from the MFG retroviral vector in hematopoietic cells, *Gene Ther.* 3 (1996) 37–48.
- [32] B.A. Chabner, Cytidine analogues, in: B.A. Chabner, J.M. Collins (Eds.), *Cancer Chemotherapy*, J.B. Lippincott, Philadelphia, PA, 1990, pp. 154–179.
- [33] R.L. Momparler, N. Onetto, Drug resistance to cytosine arabinoside, in: D. Kessel (Ed.), *Resistance to Antineoplastic Drugs*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988, pp. 353–367.