

## LAVORO ORIGINALE

# Soppressione dell'artrite sperimentale murina mediante trasferimento genetico con adenovirus ricombinanti\*

## *Recombinant adenovirus-mediated gene transfer suppresses experimental arthritis*

E. Quattrocchi<sup>1</sup>, M. Feldmann

Kennedy Institute of Rheumatology, Charing Cross Hospital, Londra

<sup>1</sup>Divisione di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Messina

### SUMMARY

Collagen Induced Arthritis (CIA) is a widely studied animal model to develop and test novel therapeutic approaches for treating Rheumatoid Arthritis (RA) in humans. Soluble Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4-Ig), which binds B7 molecule on antigen presenting cells and blocks CD28 mediated T-lymphocyte activation, has been shown to ameliorate experimental autoimmune diseases such as lupus, diabetes and CIA.

Objective of our research was to investigate in vivo the effectiveness of blocking the B7/CD28 T-lymphocyte co-stimulatory pathway, utilizing a gene transfer technology, as a therapeutic strategy against CIA. Replication-deficient adenoviruses encoding a chimeric CTLA4-Ig fusion protein, or  $\beta$ -galactosidase as control, have been injected intravenously once at arthritis onset. Disease activity has been monitored by the assessment of clinical score, paw thickness and type II collagen (CII) specific cellular and humoral immune responses for 21 days.

The adenovirally delivered CTLA4-Ig fusion protein at a dose of  $2 \times 10^8$  pfu suppressed established CIA, whereas the control  $\beta$ -galactosidase did not significantly affect the disease course. CII-specific lymphocyte proliferation, IFN $\gamma$  production and anti-CII antibodies were significantly reduced by CTLA4-Ig treatment.

Our results demonstrate that blockade of the B7/CD28 co-stimulatory pathway by adenovirus-mediated CTLA4-Ig gene transfer is effective in treating established CIA suggesting its potential in treating RA.

Reumatismo, 2001; 53(1):46-54

### INTRODUZIONE

L'artrite collagene-indotta (CIA) del topo è il modello sperimentale più studiato di Artrite Reumatoide (AR), malattia infiammatoria cronica delle articolazioni sinoviali che esita in perdita della fisiologica funzionalità articolare e in anchilosi. La CIA viene indotta in animali geneticamente suscettibili mediante immunizzazione con collagene di tipo II (CII) in adiuvante completo di Freund (CFA) che determina la comparsa di un'artrite acuta con eritema ed edema di vario grado a carico delle quattro zampe dell'animale. La reazione infiammatoria, localizzata a livello della membrana

sinoviale articolare, anche nel topo geneticamente predisposto, induce la formazione del panno sinoviale con raccolta di un numero crescente di macrofagi e fibroblasti cui fa seguito l'erosione della cartilagine articolare e dell'osso subcondrale e conseguente anchilosi delle articolazioni colpite (1,2). Sebbene l'esatta sequenza patogenetica resti tuttora sconosciuta, è noto che in seguito all'attivazione dei T-linfociti sia l'immunità cellulo-mediata che la immunità umorale verso il collagene sono determinanti nell'innescare il processo flogistico con produzione di citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita che contribuiscono a mantenere e perpetuare la flogosi (3, 4).

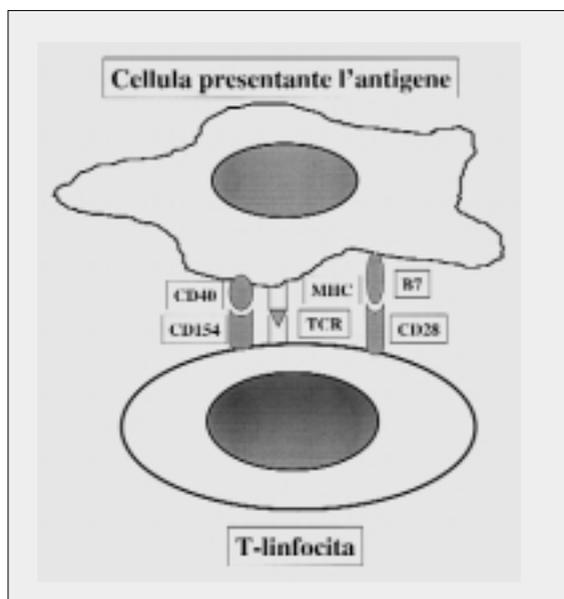
L'attivazione dei T-linfociti necessita di almeno due segnali: il primo segnale è antigene-specifico ed è generato dall'interazione tra il recettore dei T-linfociti (TCR) con il peptide antigenico nel contesto delle molecole di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) singenico presente a livello di cellule presentanti l'an-

\* Lavoro premiato al XXXVI Congresso della Società Italiana di Reumatologia, S. Margherita di Pula, 1999

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Emilia Quattrocchi, Via dei Mille 243 - 98123 Messina, Tel. 090-2931807 - Fax 090-2937124

tigene (APC) (5,6). Tale segnale è potenziato dalla interazione tra CD4 ed MHC di classe II e può essere inibito da anticorpi monoclonali contro il CD4 o l'MHC (7). Vari studi hanno dimostrato che l'induzione della CIA può essere prevenuta dal pre-trattamento con anticorpi anti-CD4, TCR o MHC di classe II, dimostrando l'importanza dell'attivazione delle cellule T nella fase di induzione della malattia. Tuttavia, quando il trattamento viene iniziato ad artrite conclamata, la sua efficacia risulta notevolmente ridotta (8). Il secondo segnale è denominato "co-stimolatorio" in quanto sebbene essenziale non è però in grado da solo di indurre una corretta attivazione T-linfocitaria. La cosiddetta "co-stimolazione" gioca pertanto un ruolo cruciale in quanto determina l'attivazione o viceversa l'anergia dei T linfociti. Due paia di recettori/co-recettori, il CD40/CD154 ed il CD80-CD86 (anche denominato B7)/CD28 sono stati studiati negli ultimi anni nell'ambito della patogenesi delle malattie autoimmunitarie poichè il CD40/CD154 è necessario per una corretta attivazione delle APC (9) ed il B7/CD28 è importante per la corretta attivazione dei T-linfociti (10) (vedi Figura 1). Al contrario, il CTLA-



**Figura 1 - Schema rappresentativo dei segnali richiesti per l'attivazione dei T-linfociti.**

Il segnale: la cellula presentante l'antigene (APC) "presenta" l'antigene nel contesto dell'antigene MHC di classe II al recettore del T-linfocita (TCR); Il segnale (co-stimolatorio): interazione tra gli antigeni CD40 e B7 espressi sulla superficie dell'APC rispettivamente con il CD154 ed il CD28 espressi sulla superficie del T-linfocita.

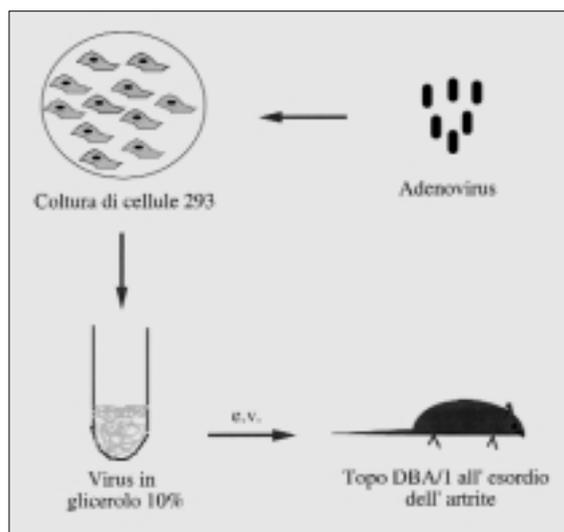
4 (antigene associato ai T-linfociti) che viene espresso dalle cellule T in seguito alla loro attivazione ed è in grado di legare il co-recettore del B7 espresso sulle APC con una affinità più elevata del CD28 blocca l'attivazione dei T-linfociti (12). La forma solubile del CTLA-4, coniugata cioè ad una immunoglobulina (CTLA4-Ig), è in grado di legare le molecole del B7 con elevata affinità, inibisce la trasduzione del segnale da parte del CD28 inibendo quindi il segnale di attivazione dei T-linfociti sia *in vitro* che *in vivo* (10). Il trattamento con CTLA4-Ig è stato utilizzato con successo nei trapianti d'organo (14-16), per inibire risposte anticorpali verso antigeni T-dipendenti (17) e nel prevenire lo sviluppo di malattie autoimmuni in modelli animali di LES e di sclerosi multipla (18-20). È stato inoltre precedentemente dimostrato che somministrazioni ripetute della proteina di fusione CTLA4-Ig prevengono lo sviluppo di CIA (21, 22) e se somministrata all'esordio dei sintomi artrici si ottiene un miglioramento significativo della malattia (22).

Le tecnologie di trasferimento genetico consentono oggi una prolungata ed efficiente espressione di citochine *in vivo* (23-26) e gli adenovirus ricombinanti a replicazione interrotta risultano estremamente utili per veicolare il DNA all'interno delle cellule in quanto in grado di infettare svariati tipi cellulari ed anche cellule in stato di quiescenza (23). Scopo del presente lavoro è stato quindi valutare il potenziale terapeutico della somministrazione prolungata di CTLA4-Ig mediante trasferimento genetico con adenovirus ricombinanti sul decorso della CIA.

## MATERIALI E METODI

### Vettori adenovirali ricombinanti

I vettori adenovirali ricombinanti a replicazione interrotta utilizzati in questo studio sono stati generati dai Dott. A. Byrnes, M. Wood e M. Dallmann (Università di Oxford, Oxford, UK) e contengono rispettivamente il cDNA della proteina di fusione solubile CTLA-4 murina coniugata ad una IgG umana (AdCTLA4-Ig) ed il cDNA della  $\beta$ -galattosidasi (Ad $\beta$ gal) come controllo (27). I virus sono stati propagati mediante la linea cellulare 293 e purificati mediante ultracentrifugazione su gradiente di cloruro di cesio (Boeriger Mannheim, Lewes, East Sussex, UK). Per la titolazione della preparazione finale aliquote del



**Figura 2 - Schema rappresentativo della metodica di trasferimento genetico.**

La figura schematizza la metodica di trasferimento genetico utilizzata in questo studio e descritta nella sezione Materiali e Metodi.

virus sono state diluite e testate per la capacità di formare placche su un monostrato di cellule 293 come precedentemente descritto (24) (vedi Figura 2).

#### **Induzione e monitoraggio dell'artrite**

L'induzione e monitoraggio dell'artrite sono stati eseguiti come precedentemente descritto (28). Topi DBA/1 sono stati immunizzati con una emulsione di CII in CFA (Difco laboratories, West Molesey, UK). Esordio dell'artrite è stato considerato il giorno di comparsa del primo segno di eritema/edema a carico delle zampe ed uno score clinico da 0 a 3 per arto assegnato in base all'entità della sintomatologia. In particolare è stato assegnato 0 = articolazione normale, 1 = presenza di eritema e/o edema di grado lieve, 2 = presenza di edema pronunciato, 3 = deformità ed anchilosi articolari. Lo spessore delle zampe posteriori è stato inoltre misurato con un calibro per valutare l'entità dell'edema per tutto il decorso della malattia.

#### **Protocollo del trattamento**

I vettori adenovirali sono stati iniettati per via endovenosa all'esordio dei sintomi articolari (giorno 1 di malattia) alle dosi di  $2 \times 10^7$  e  $2 \times 10^8$  pfu in soluzione isotonica e gli animali (10 per gruppo) sono stati monitorati per 21 giorni. Anche topi non immunizzati sono stati sottoposti al trattamento con

adenovirus e non hanno riportato segni macroscopici di malattia. Ulteriori gruppi di animali sono stati trattati con somministrazioni multiple della proteina di fusione CTLA4-Ig (generosamente fornita dal Dott. G. Larsen, Genetics Institute, Boston, USA) alla dose di 200  $\mu$ g a giorni alterni. Sieri prelevati dopo 3, 10 e 21 giorni dall'inizio del trattamento sono stati congelati a  $-80^\circ\text{C}$  per le determinazioni successive.

#### **Determinazione della produzione di CTLA4-Ig**

La proteina di fusione prodotta mediante trasferimento genetico è stata quantificata nel siero degli animali trattati al citofluorimetro (Beckton & Dickinson, Oxford, UK). Una linea cellulare transfettata con il legante del CTLA-4 (CHO-CD80) ed un anticorpo anti-IgG umana FITC sono stati utilizzati per evidenziarne la presenza nel siero.

#### **Test di proliferazione linfocitaria**

I linfonodi inguinali dei topi trattati e dei controlli sono stati asportati dopo 10 e 21 giorni dall'inizio del trattamento e la sospensione cellulare è stata piastrata ad una densità di  $5 \times 10^5$  cellule in 0.2 ml di terreno per colture cellulari DMEM in piastra da 96 pozzetti. Le cellule sono state incubate 72 ore a  $37^\circ\text{C}$  con o senza CII denaturato e per le successive 24 ore in presenza di 1 mCi per pozzetto di timidina triziata (Amersham International, Amersham, UK). L'incorporazione di timidina da parte delle cellule proliferanti è stata misurata mediante spettrofotometro (LKB Instruments Inc., Bromma, Sweden) ed i risultati espressi come media aritmetica delle cpm (counts per minute) dei triplicati  $\pm$  SEM.

#### **Determinazione della produzione di IFN $\gamma$**

La sospensione cellulare ottenuta dai linfonodi inguinali al giorno 10 e 21 è stata anche testata per la capacità di produrre IFN $\gamma$  dopo stimolazione *in vitro* con CII denaturato o anti-CD3 (attivatore dei T-linfociti). Dopo 72 ore di incubazione i surnatanti delle colture sono stati prelevati e testati in ELISA come precedentemente descritto (29).

#### **Valutazione della risposta anticorpale**

I livelli degli anticorpi anti-CII circolanti sono stati determinati su ciascun siero in ELISA. Piastre da 96 pozzetti sono state incubate con 2  $\mu$ g/ml di CII a  $4^\circ\text{C}$  per 12 ore, quindi bloccate con BSA al 2%. Diluizioni scalari dei vari sieri sono state aggiunte

alla piastra ed incubate a 4°C per altre 12 ore e, dopo lavaggio, anticorpi anti-IgG1 ed anti-IgG2a murini coniugati a fosfatasi alcalina (The Binding Site, Birmingham, UK) incubati a temperatura ambiente per 1 ora. I risultati sono stati letti ad una lunghezza d'onda di 405 nm mediante spettrofotometro.

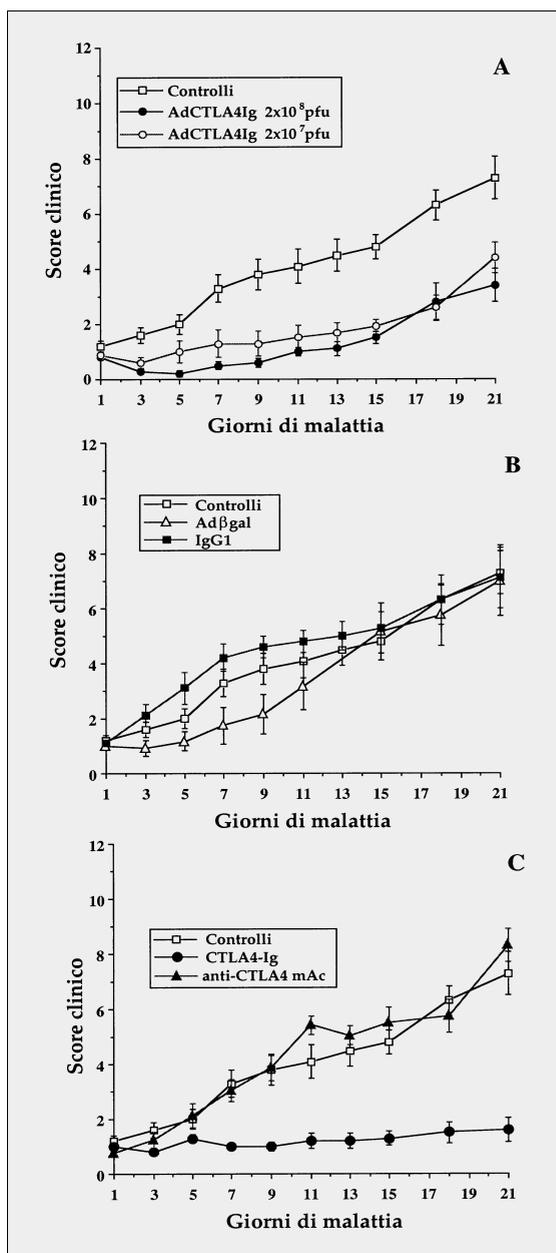
### Analisi statistica

L'analisi statistica di tutti i risultati è stata effettuata mediante il test Mann-Whitney del software Minitab (Minitab, State College, PA, USA). Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

### Soppressione della CIA mediante trasferimento genetico di CTLA4-Ig

È stato precedentemente dimostrato che la somministrazione ripetuta della proteina di fusione CTLA4-Ig determina un miglioramento della sintomatologia artritica nell'animale da esperimento (22) e la terapia genetica con adenovirus ricombinanti risulta essere molto efficace nell'indurre una elevata concentrazione sierica delle proteine prodotte per periodi prolungati (24-26, 30). L'adenovirus ricombinante utilizzato in questo studio, AdCTLA4-Ig, è stato quindi somministrato per via endovenosa in doppia dose,  $2 \times 10^7$  e  $2 \times 10^8$  pfu in soluzione isotonica, a gruppi di 10 animali all'esordio dei sintomi articolari. I controlli erano costituiti da animali iniettati con la sola soluzione isotonica, con la dose più alta di un adenovirus di controllo Ad $\beta$ gal o con iniezioni multiple della proteina di fusione CTLA4-Ig. Come mostrato in Figura 3A il trattamento con la dose più elevata di AdCTLA4-Ig ha determinato un miglioramento statisticamente significativo dell'infiammazione articolare a partire da giorno 3 ( $p=0.001$ ) sino alla fine dell'esperimento ( $p=0.01$  giorno 21). Tali risultati non si possono ascrivere al vettore virale in quanto l'andamento della malattia nei topi iniettati con Ad $\beta$ gal è risultato sovrapponibile all'andamento della malattia nei topi di controllo (Figura 3B). Conferma dello avvenuto trasferimento genetico si è avuta dalla misurazione della concentrazione sierica della proteina prodotta. Livelli circolanti di CTLA4-Ig sono stati rilevati il decimo giorno ( $69.6 \pm 15.7 \mu\text{g/ml}$ ) e si sono mantenuti elevati nelle settimane successive



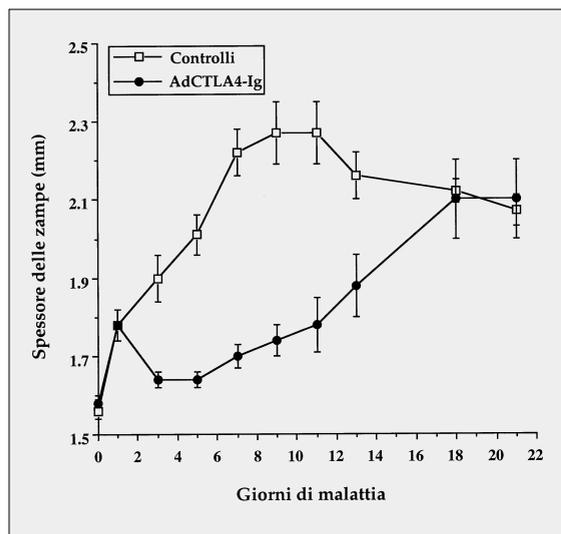
**Figura 3 - Il trasferimento genetico di CTLA4-Ig migliora il decorso della CIA.**

(A) Gruppi di 10 topi immunizzati con CII e CFA sono stati inoculati per via endovenosa con  $2 \times 10^7$  (cerchi bianchi) e  $2 \times 10^8$  pfu (cerchi neri) di AdCTLA4-Ig o soluzione isotonica (quadrati) il primo giorno di malattia. Gli animali sono stati monitorati per 21 giorni e la media dello score clinico per gruppo riportata in figura  $\pm$  SEM.

(B) Come controlli, due gruppi di topi sono stati iniettati giorno 1 con  $2 \times 10^8$  pfu di Ad $\beta$ gal (triangoli bianchi) o con iniezioni multiple di una IgG1 umana (quadrati neri) dimostrando un decorso di malattia sovrapponibile a quello degli animali non trattati (quadrati bianchi).

(C) Un gruppo di animali è stato anche trattato con iniezioni ripetute della proteina di fusione CTLA4-Ig (cerchi neri) o con iniezioni multiple di un anticorpo anti-CTLA4.

( $127.2 \pm 9.6 \mu\text{g/ml}$  giorno 21 e  $115 \pm 10.3 \mu\text{g/ml}$  giorno 45). Il dosaggio della proteina a 24, 48 ore e 5 giorni dalla somministrazione è risultato al di sotto dei livelli dosabili ma probabilmente la proteina prodotta inizialmente è stata sequestrata nei siti di legame cellulari e non è stato quindi possibile dosarla nel siero. Analogamente al trattamento con AdCTLA4-Ig anche la somministrazione ripetuta di CTLA4-Ig ha prodotto un miglioramento significativo della sintomatologia artritica (Figura 3C).

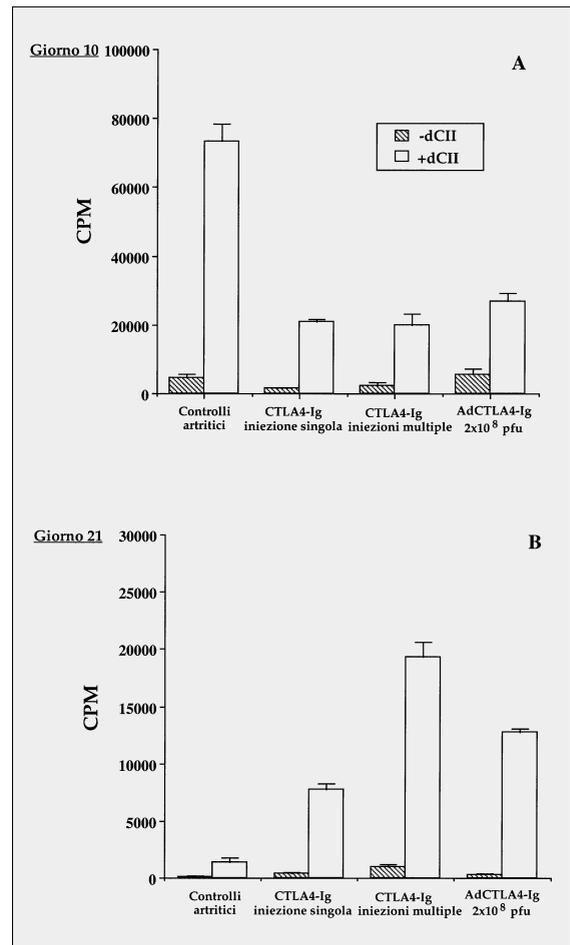


**Figura 4 - Effetto del trattamento con AdCTLA4-Ig sull'edema della zampa.**

Lo spessore delle zampe posteriori è stato misurato a giorni alterni in animali trattati con  $2 \times 10^8$  pfu (cerchi neri) rispetto ai controlli (quadrati bianchi) e la media  $\pm$  SEM per gruppo è riportata in figura.

### **Effetto del trattamento con AdCTLA4-Ig sull'edema della zampa**

La misurazione dello spessore delle zampe posteriori ha messo in evidenza la netta riduzione dell'edema nella fase infiammatoria acuta della CIA nei topi trattati con la dose più alta di AdCTLA4-Ig (Figura 4) statisticamente significativa a partire dal terzo giorno ( $p = 0.008$ ) sino a giorno 11 ( $p = 0.004$ ). Ciò indica l'efficacia di questo trattamento nella fase edematosa acuta della CIA che potrebbe essere dovuta al blocco della attivazione continua dei T-linfociti a livello articolare (32).

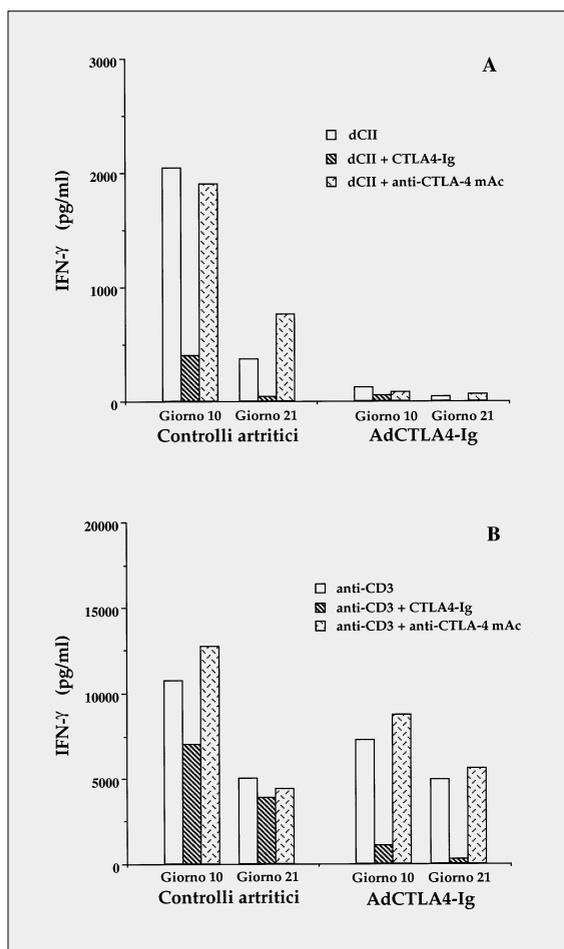


**Figura 5 - L'inibizione del segnale co-stimolatorio *in vivo* riduce la proliferazione linfocitaria antigene-specifica.**

Gruppi di tre topi immunizzati sono stati iniettati il giorno 1 con soluzione isotaonia o iniezione singola di CTLA4-Ig, iniezioni multiple di CTLA4-Ig o con  $2 \times 10^8$  pfu di AdCTLA4-Ig. Giorno 10 (A) e giorno 21 (B) I linfonodi inguinali sono stati asportati e la sospensione cellulare piatrata in pozzetti con 0.2 ml di DMEM +/- CII denaturato.

### **Il blocco della "co-stimolazione" *in vivo* inibisce l'attivazione dei T-linfociti**

La misurazione della proliferazione e quindi dell'attivazione linfocitaria in seguito a stimolazione *in vitro* con CII è mostrata in Figura 5. Gruppi di tre animali sono stati inoculati con una dose singola o dosi ripetute di CTLA4-Ig o con  $2 \times 10^8$  pfu di AdCTLA4-Ig e la proliferazione linfocitaria è stata misurata a 10 e 21 giorni. A 10 giorni l'attivazione linfocitaria è risultata ridotta in tutti e tre i gruppi trattati (Figura 5A) a conferma dell'azione immunosoppressiva operata dal blocco del segnale co-stimolatorio. A 21 giorni dalla somministrazione invece la proliferazione linfocitaria



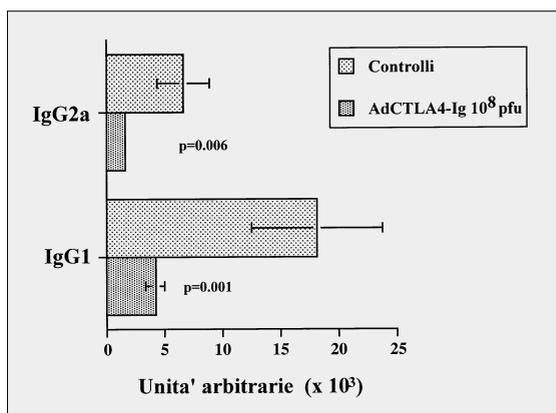
**Figura 6 - Effetto del trattamento con AdCTLA4-Ig sulla produzione di IFN $\gamma$  antigene-indotta.**

Cellule linfonodali di topi trattati con  $2 \times 10^8$  pfu di AdCTLA4-Ig o soluzione isotonica sono state piastrate a 10 e 21 giorni dalla somministrazione e ristimate *in vitro* con CII denaturato (A) o anti-CD3 (B), con o senza CTLA4-Ig ed anticorpo anti-CTLA-4, per 72 ore. La presenza di IFN $\gamma$  è stata misurata dai surnatanti in ELISA.

collagene-indotta *in vitro* è risultata più elevata nei gruppi trattati rispetto ai rispettivi controlli (Figura 5B) ma ridotta ulteriormente se si analizza la proliferazione ottenuta dai trattati al giorno 10.

**Effetto del trattamento con AdCTLA4-Ig sulla produzione di IFN $\gamma$**

L'IFN $\gamma$  è una delle citochine prodotte dai linfociti Th1 implicati nella patogenesi delle malattie autoimmuni sperimentali. Il dosaggio dell'IFN $\gamma$  *in vitro* dopo stimolazione di colture linfocitarie miste con il CII che rappresenta l'antigene "patogeno" in questo modello sperimentale di artrite e che necessita di un'opportuna presentazione ai linfoci-



**Figura 7 - Effetto del trattamento con AdCTLA4-Ig sulla produzione anticorpale.**

I sieri dei topi a 10 giorni dall'inizio del trattamento sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-CII dell'isotipo IgG1 e IgG2a mediante determinazione ELISA. I risultati mostrano i livelli medi di unità arbitrarie rispetto ad un siero di riferimento  $\pm$  SEM.

ti da parte delle APC, o con anticorpo anti-CD3 che invece è un attivatore policlonale aspecifico dei T-linfociti, è risultato ridotto in maniera significativa nel gruppo dei ristimolati *in vitro* con CII sia a 10 che a 21 giorni dalla somministrazione di AdCTLA4-Ig (Figura 6A e 6B). Tale risultato avvalorava l'ipotesi che i linfociti Th1 siano continuamente attivati dal CII durante il decorso della CIA.

**Effetto del trattamento con AdCTLA4-Ig sulla risposta anticorpale**

La risposta anticorpale collagene-specifica misurata sia a 10 che a 21 giorni è risultata significativamente ridotta dal trattamento con AdCTLA4-Ig (Figura 7). Sia gli anticorpi della sottoclasse IgG2a che IgG1 sono risultati ugualmente diminuiti. Poiché tali isotipi sono associati rispettivamente con un tipo di risposta T-linfocitaria Th1 e Th2 la loro riduzione conferma l'effetto immunosoppressivo generale sulla risposta T-linfocitaria collagene-specifica del trattamento con AdCTLA4-Ig (33-36).

**DISCUSSIONE**

Il blocco del segnale costimolatorio innescato dall'interazione tra B7 e CD28/CTLA-4 espressi rispettivamente a livello di APC e linfociti T è in grado di ridurre la risposta immunitaria sia *in vitro* che *in vivo* e di prevenire lo sviluppo di malattie autoimmuni sperimentali (18-22, 37, 40). In particolare, è stato precedentemente dimostrato che la

somministrazione della proteina di fusione CTLA4-Ig, che lega ad elevata affinità il B7 espresso sulle APC e ne impedisce quindi la interazione con il CD28 espresso dai T-linfociti inibendone la corretta attivazione, previene la comparsa dell'artrite sperimentale, migliorando la sintomatologia anche se somministrato a malattia conclamata (22). Tuttavia, la necessità di somministrazioni ripetute e prolungate della proteina di fusione (che ha un'emivita molto breve in circolo) ed i costi connessi con tali tipi di trattamento ne rendono poco probabile un eventuale utilizzo su un numero elevato di pazienti affetti da malattie a patogenesi immunomediata. Studi recenti sulla possibilità di trasferimento genetico di prodotti ad azione anti-infiammatoria e/o immunosoppressiva *in vivo*, mediante vettori virali ricombinanti a replicazione interrotta, hanno dimostrato l'estrema efficacia di questa tecnica nell'indurre elevate concentrazioni di una proteina "terapeutica" nell'animale da esperimento per periodi di tempo prolungati (24-26). Abbiamo quindi valutato nel presente studio l'efficacia ed il potenziale terapeutico della somministrazione "continua" di CTLA4-Ig mediante trasferimento genetico con adenovirus ricombinanti sul decorso dell'artrite sperimentale conclamata. I nostri dati confermano l'efficacia della somministrazione unica sistemica del vettore virale nell'indurre elevati livelli sierici della proteina terapeutica che è risultata dosabile nel siero sino a 45 giorni dalla sommini-

strazione del vettore virale. L'utilizzo in particolare di un costrutto ad ampia azione immunosoppressiva, quale la proteina di fusione CTLA4-Ig, rende probabilmente ulteriormente prolungato il periodo di espressione dell'adenovirus ricombinante in quanto risulta ridotta in generale la reattività immunologica sia di tipo cellulo-mediato che di tipo anticorpale dell'organismo quindi anche nei confronti del vettore virale (38, 39). Il nostro studio inoltre dimostra l'efficacia terapeutica del blocco del segnale co-stimolatorio dei T-linfociti nella artrite indotta sperimentalmente *in vivo* con collagene di tipo II ed identifica nella riduzione della risposta anti-collagene sia di tipo cellulo-mediato che di tipo umorale il meccanismo d'azione.

Se confermato da attente ricerche future soprattutto sul monitoraggio di reazioni avverse sia al vettore virale (che nel nostro studio sul topo non sono state riscontrate) che al prodotto del trasferimento genetico questo tipo di trattamento potrebbe rappresentare l'evoluzione delle strategie terapeutiche per una serie di malattie ad oggi inguaribili tra cui alcune malattie reumatologiche.

*Ringraziamenti: Gli Autori ringraziano il Dott. G. Larsen del Genetics Institute di Boston per aver fornito la proteina di fusione CTLA4-Ig e la Dott.ssa M. Dallman dell'Imperial College di Londra per aver fornito i vettori adenovirali utilizzati in questo studio.*

#### RIASSUNTO

L'artrite indotta dal collagene (CIA) è una malattia infiammatoria delle articolazioni largamente utilizzata come modello sperimentale di Artrite Reumatoide.

La CIA può essere trattata inibendo il segnale co-stimolatorio a livello di linfociti T con somministrazioni ripetute di CTLA4-Ig. Abbiamo quindi valutato il potenziale terapeutico del trasferimento genetico di CTLA4-Ig mediante adenovirus ricombinanti (AdCTLA4-Ig) sulla CIA. La somministrazione di AdCTLA4-Ig ha indotto un miglioramento statisticamente significativo della malattia con elevate concentrazioni sieriche della proteina prodotta. La risposta proliferativa linfocitaria ed anticorpale al collagene sono risultate ridotte nei gruppi trattati.

Questo studio dimostra l'efficacia del trasferimento genetico con adenovirus nella CIA.

**Parole chiave:** Artrite, terapia genetica, immunosoppressione, CTLA4-Ig

**Key words:** Arthritis, gene therapy, immunosuppression, CTLA4-Ig

#### BIBLIOGRAFIA

1. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980; 283: 666-8.
2. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146: 857-68.
3. Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 1990; 118: 193-232.
4. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.
5. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal ex-

- pansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 445-80.
6. Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 1992; 70: 631-45.
  7. Swain SL, Dialynas DP, Fitch FW, English M. Monoclonal antibody to L3T4 blocks the function of T cells specific for class 2 major histocompatibility complex antigens. *J Immunol* 1984; 132: 1118-23.
  8. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN. Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2762-6.
  9. Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, Xu J, Hardardottir F, Baron JL, et al. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996; 273: 1864-7.
  10. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233-58.
  11. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261: 609-12.
  12. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1: 405-13.
  13. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 176: 1595-604.
  14. Lin H, Bolling SF, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, et al. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4lg plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 1993; 178: 1801-6.
  15. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992; 257: 789-92.
  16. Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei RQ, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11102-5.
  17. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992; 257: 792-5.
  18. Perrin PJ, Scott D, Quigley L, Albert PS, Feder O, Gray GS, et al. Role of B7:CD28/CTLA-4 in the induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1995; 154: 1481-90.
  19. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 1994; 265: 1225-7.
  20. Cross AH, Girard TJ, Giacometto KS, Evans RJ, Keeling RM, Lin RF, et al. Long-term inhibition of murine experimental autoimmune encephalomyelitis using CTLA-4-Fc supports a key role for CD28 costimulation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2783-9.
  21. Knoerzer DB, Karr RW, Schwartz BD, Mengle-Gaw LJ. Collagen-induced arthritis in the BB rat. Prevention of disease by treatment with CTLA-4-Ig. *J Clin Invest* 1995; 96: 987-93.
  22. Webb LM, Walmsley MJ, Feldmann M. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2320-8.
  23. Bramson JL, Graham FL, Gaudie J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6: 590-5.
  24. Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In: Murray EJ, editor *Gene Transfer and Expression Protocols. Methods in Molecular Biology Vol 7*. Clifton, N.J.: The Humana Press Inc.; 1991. p. 109-128.
  25. Kolls J, Peppel K, Silva M, Beutler B. Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 215-9.
  26. Quattrocchi E, Walmsley M, Browne K, Williams RO, Marinova-Mutafchieva L, Buurman W, et al. Paradoxical effects of adenovirus-mediated blockade of TNF activity in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1999; 163: 1000-9.
  27. Oral HB, Larkin DF, Fehervari Z, Byrnes AP, Rankin AM, Haskard DO, et al. Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer and immunomodulatory protein production in human cornea. *Gene Ther* 1997; 4: 639-47.
  28. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 9784-8.
  29. Mauri C, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1511-8.
  30. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, Rosenfeld MA, et al. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1992; 1: 372-8.
  31. Luhder F, Hoglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med* 1998; 187: 427-32.
  32. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992; 358: 155-7.
  33. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993; 262: 909-11.
  34. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gray G, Gribben J, Nadler LM. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med* 1993; 178: 1753-63.
  35. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunvand M, Bradshaw J, et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking

- interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993; 177: 165-73.
36. Lane P, Burdet C, Hubele S, Scheidegger D, Muller U, McConnell F, et al. B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1994; 179: 819-30.
  37. Tada Y, Nagasawa K, Ho A, Morito F, Ushiyama O, Suzuki N, et al. CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1999; 162: 203-8.
  38. Sagerstrom CG, Kerr EM, Allison JP, Davis MM. Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8987-91.
  39. Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, et al. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 1333-7.
  40. Miller SD, Vanderlugt CL, Lenschow DJ, Pope JG, Karandikar NJ, Dal Canto MC, et al. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 1995; 3: 739-45.