

Advies betreffende: **Gentherapie van leukemie met groeifactor-toxine genen**

Kennisgever: **Universitair Medisch Centrum Utrecht**

COGEM kenmerk
CGM/010213-1

BGGO nummer
GGO 00-159/1

Datum advies
13 februari 2001

Doel

Door middel van deze wijziging wil de aanvrager CD34⁺ hemapoïetische stamcellen die zijn geïsoleerd uit beenmerg of navelstrengbloed, transduceren met lentivirale vectoren die het EGFP tot expressie brengen. Vervolgens wil de aanvrager deze getransduceerde cellen gaan inspuiten in immuun-gecompromitteerde RAG-2/ γ -c dubbel knock-out muizen. Het in de kennisgeving beschreven lentivirale vectorsysteem staat centraal in het huidige advies.

Het experiment

De vector

Bij de vervaardiging van de virale vector partikels wordt gebruik gemaakt van een packagingsysteem waarbij gebruik gemaakt wordt van een zogenaamde, op het HIV virus gebaseerde, zelf inactiverende (SIN) lentivirale vector. Het principe achter deze SIN lentivirale vectoren wordt beschreven door Zufferey *et al.*, 1998. De op het HIV-genoom aanwezige genen *tat* en *rev* zijn essentieel voor de replicatie van het HIV.

Wetenschappelijk onderzoek heeft eveneens aangetoond dat een viertal additionele genen, *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*, die coderen voor essentiële virulentie factoren, noodzakelijk zijn voor replicatie en pathogenese *in vivo*. Deze additionele genen zijn niet noodzakelijk voor *in vitro* replicatie van het virus. Bij de derde generatie van het SIN lentivirale packagingsysteem zijn in de vector slechts een fractionele set van HIV-genen aanwezig namelijk: *gag*, *pol* en *rev*. De genen die coderen voor *tat* en de vier additionele genen zijn hierbij afwezig.

Bij het gebruik van dergelijke op HIV-gebaseerde systemen zijn een aantal veiligheidsvoorzieningen ingebouwd ter voorkoming van het ontstaan van replicatie-competent retrovirus (RCR).

De componenten die nodig zijn voor de productie van het retrovirus worden op afzonderlijke plasmiden aangeleverd. Hierbij wordt getracht zoveel mogelijk sequentie homologie te vermijden om het optreden van homologe recombinantie te voorkomen. In het hier beschreven packaging systeem zijn vier afzonderlijke constructen nodig om de lentivirale vector te maken; *gag/pol*, VSV-G, *rev* en RRE-transgen. De gehele U3 regio van de 5' LTR is vervangen door de heterologe Rous Sarcoma Virus (RSV) promoter. De U3 regio van de 3' LTR heeft een 400 bp deletie die de TATA-box omvat.

In de virale vector is dus geen volledige LTR aanwezig. De LTR's van het provirus zullen na integratie niet tot transcriptie-initiatie in staat zijn omdat de U3 promotor verwijderd is. Er zijn in de andere packaging constructen geen HIV LTR-elementen aanwezig zodat er door recombinatie geen volledige LTR gevormd kan worden.

De in dit systeem geproduceerde virusdeeltjes zullen gepseudotypeerd worden met het VSV (vesicular stomatitis virus) G envelop eiwit. Aangezien het gen dat codeert voor het oorspronkelijke HIV envelop eiwit *env* eiwit ook niet in het systeem aanwezig is zal het VSV G envelop eiwit uiteindelijk worden ingebouwd in de envelop van de viruspartikels. De aanvrager zal voor de productie van deze virale partikels gebruik maken van 293T cellen. Tevens wil de aanvrager gebruik maken van een tetracycline-induceerbaar VSV G-eiwit packaging systeem (tet/VP16 transactivator en tet minimale promotor systeem) in 293GPG cellen voor pseudotypering van de virusdeeltjes. Daarnaast zullen virale partikels worden gepseudotypeerd met het feline endogene virus envelop eiwit (RD114). Hierbij zal gebruik worden gemaakt van de packaging cellijn FLYRD18 (HT-1080 origine) of van met het RD114 gen stabiel-getransfecteerde 293T cellen.

De inschaling en motivatie

Productie van de retrovirale partikels

Vorming van replicatie-competente virussen is zeer onwaarschijnlijk, met het beschreven derde generatie SIN lentivirale productiesysteem, verspreiding van het virus is daarmee voldoende ingeperkt. De inschaling hoeft voor lentivirale vectoren geproduceerd met het in de aanvraag beschreven systeem daarom in principe niet op C-II niveau te geschieden, zoals voor replicatie-competente klasse 3 pathogenen vereist is, maar kan op C-I niveau gebeuren. De beschreven pseudotypering, met het VSV G-envelop eiwit, zal leiden tot een verbreding van het gastheertropisme en zorgt voor een extra risico voor de betrokken medewerkers. In deze situatie zijn echter maatregelen ter bescherming van de medewerker dan ook noodzakelijk. Hiertoe adviseert de COGEM de handelingen ter productie van de lentivirale partikels uit te voeren in een C-I faciliteit (bijlage 4 van de regeling, onder 4.1.1.3.) in een klasse II veiligheidskabinet, waarbij de medewerker handschoenen dient te gebruiken. De COGEM acht een inschaling op C-II niveau niet noodzakelijk daar dit geen extra bescherming van de medewerker op zal leveren.

Transductie van zoogdiercellen met lentiviraledeeltjes

Het te gebruiken donor materiaal dient vrij te zijn van HIV-1, HIV-2, HLTV-1 en HLTV-2. Transductie van de zoogdiercellen dient uitgevoerd te worden op C-I niveau (bijlage 4 van de regeling, onder 4.1.1.3.). Tijdens alle handelingen dienen handschoenen te worden gedragen, en dienen handelingen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse-II.

Handelingen met getransduceerde zoogdiercellen in associatie met muizen

De muizen krijgen met lentivirale vectoren getransduceerde humane CD34⁺ cellen toegediend. Het gebruikte vectorsysteem is sterk biologisch ingeperkt, zowel door de inperking van het productiesysteem als door de toediening in de vorm van een cellulair vaccin. De muizen zijn vrij van virus dat de gebruikte vector kan complementeren. Ook bij deze handelingen dient met name de medewerker beschermt te worden. Hiertoe adviseert de COGEM alle handelingen uit te voeren op D-II faciliteit niveau (bijlage 4 van de regeling, onder 4.1.4.2.) Aanvullend dienen de werkzaamheden uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet klasse-II. Eventueel kunnen dergelijke proeven buiten een klasse-II veiligheidskabinet uitgevoerd worden. In dit laatste geval dient de werknemer een mond- en neuskapje te gebruiken en een veiligheidsbril te dragen.