

Advies betreffende: **DNA immunisatie van *Macaca mulatta* met plasmides waarin een 'humanised' HIV-gag gen en het GFP gen worden geëxprimeerd**

Kennisgever: **Stichting Biomedical Primate Research Centre**

COGEM kenmerk  
**CGM/010509-02**

BGGO nummer  
**GGO 01-026**

Datum advies  
**9 mei 2001**

## **Inleiding**

Het onderzoek vindt plaats in het kader van de ontwikkeling van HIV-1 vaccins. In het onderzoek zullen rhesusapen worden geïmmuniseerd met DNA plasmiden die coderen voor HIV-1 specifieke eiwitten en deze tot expressie brengen. De werkzaamheden bestaan verder uit cellulaire en humoraal immunologische analyses van bloedmonsters. Tenslotte zullen geïmmuniseerde dieren worden gechallenged met chimeer HIV-1/SIV (SHIV) virus.

De aanvrager wil rhesusapen met plasmide DNA, dat een "humanised" (structureel) HIV-1 gag eiwit tot expressie brengt, immuniseren. Vervolgens wordt gezuiverd HIV-1 gag eiwit aan de apen toegediend ("booster"). Na de immunisatieperiode zullen de apen (na blijk van voldoende respons) behandeld worden met chimeer HIV-1/SIV (SHIV) virus ("challenge"). Tevens zal de effectiviteit van de immunisatie bestudeerd worden. Doorgaans bestaan SHIV chimereën uit een combinatie van HIV-1 rev en/of tat/rev/vpu genen die zijn ingebouwd in een SIV vector. Het gebruik van dergelijke chimereën verschaft de mogelijkheid om rhesusapen te infecteren met het immunodeficiëntie virus dat HIV-1 isolaat-specifieke structurele eiwitten tot expressie brengt. Van dieren die gechallenged zijn zal het bloed worden gecontroleerd op immuunresponsen en de aanwezigheid van SHIV virus. Het in vitro werk met plasmide DNA bestaat uit transfectie van uit het bloed van rhesusapen geïsoleerde mononucleaire bloedcellen (PBMC's), gekweekte dendritische cellen (DC's) en analyse van eiwitexpressie. Het gebruikte DNA expressieconstruct bestaat uit een pUC-afgeleide bacteriële vector met kanamycine-resistentie gen. De vector bevat de CMV IE promotor en een CMV intron A, 3' hiervan is het gen dat codeert voor het HIV-1SF2 isolaat gag eiwit gekloneerd gevolgd door een BGH (bovine growth hormone) terminatie sequentie.

## **Overweging en inschaling**

### *Transfectie van zoogdiercellen (rhesusaap)*

Bij de transfectie van zoogdiercellen wordt geen virale vector gebruikt. De met pCMVkm2p55 getransfecteerde zoogdiercellen bevatten genetische informatie die

codeert voor HIV-1 specifieke eiwitten. De COGEM acht het zeer onwaarschijnlijk dat de betreffende ingebrachte virale sequenties kunnen leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes. De betreffende werkzaamheden, met betrekking tot de transfectie-experimenten met zoogdiercellen, kunnen derhalve ingeschaald worden op VMT niveau (Regeling , Bijlage 4 onder 4.1.1.1.)

#### *Vaccinatie rhesusapen en booster met gag eiwit van HIV-1*

Tot op heden werd het gebruik van plasmide DNA t.b.v. vaccinatie ingeschaald op D-I mits de plasmide backbone geen virale onderdelen bevatten bevatte anders dan de CMV promotor, HSV tk-gen of SV-40 ori. In het laatste geval wordt als aanvullend voorschrift "de apen moeten vrij zijn van SV40 virus" gehanteerd.

Aangezien de aanwezigheid van virale sequenties zich tot de aanwezigheid van het gekarakteriseerde HIV-1 SF-2 isolaat gag gen beperkt, hetgeen geen aanleiding kan geven tot de vorming van replicatie-competent virus, adviseert de COGEM om deze handelingen op D-I niveau in te schalen (Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.1.).

#### *Handelingen met cellen en weefsel afkomstig van getransfecteerde zoogdiercellen (rhesusapen)*

Bij inschaling van de handelingen met cellen en weefsel van met pCMVkm2p55 plasmiden ingespoten rhesusapen zijn de overwegingen analoog aan die gehanteerd voor de transfectie van zoogdiercellen. Bij de handelingen met cellen en weefsel afkomstig van ingespoten dieren worden eveneens geen virale vectoren gebruikt. Het voor de immunisatie gebruikte plasmide pCMVkm2p55 bevat echter wel genetische informatie van een voor eukaryote cellen infectieus virus, deze ingebrachte virale sequenties kunnen niet leiden tot de vorming van autonoom replicerende deeltjes. De betreffende werkzaamheden kunnen derhalve ingeschaald worden op VMT niveau (Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.1.1.).

#### *Challenge van gevaccineerde rhesusapen*

Na de immunisatieperiode zullen de rhesusapen, na blijk van voldoende respons, worden gechallengeerd met chimeer HIV-1/SIV (SHIV) virus. De COGEM acht het van belang dat bij deze handelingen met name de medewerker beschermd moet worden. De COGEM adviseert de challenge van de dieren uit te voeren in een D-II laboratorium (Regeling1, Bijlage 4, onder 4.1.4.2).

Hierbij adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften in acht te nemen:

- het verblijf wordt betreden via een sluis bestaande uit een douchecel gelegen als enige doorgang tussen een 'schone' en een ingeperkte kleedruimte (Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. h.);
- het dierverblijf is voorzien van een waterdichte vloer waarin een afvoer voor urine en feces is aangebracht (Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. j.);

- er is een gesloten systeem voor opvang van water, urine en feces geïnstalleerd, waarin voorzieningen zijn getroffen tegen overstroming. Het opgevangen materiaal kan ontsmet of gesteriliseerd worden. De ontluchting van het systeem is voorzien van een HEPA-filter (Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. k);
- vacuümleidingen zijn voorzien van een hydrofoob absoluut-filter of van een gelijkwaardige voorziening(Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. l.);
- de waterleiding is voorzien van een terugslagklep of een breektank(Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. m.);
- in het dierverblijf wordt een onderdruk gehandhaafd van tenminste 5 Pa ten opzichte van de heersende atmosferische druk. In de luchtafvoer is een 95 % filter aanwezig;
- het verblijf is zodanig uitgevoerd dat desinfectie door middel van fumigatie plaats kan vinden(Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. p.);
- een verbrandingsoven of een andere effectieve voorziening voor de vernietiging van kadavers en kadaverresten is beschikbaar. Een doorgeefautoclaaf of een gelijkwaardige installatie wordt aanbevolen(Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.4.2.1. r.);
- het dierverblijf staat onder toezicht;
- met uitzondering van materiaal dat in biologisch actieve staat moet blijven, mag geen dierlijk materiaal uit het verblijf worden verwijderd alvorens het volgens een gevalideerde methode is ontsmet;
- dieren die geen deel uitmaken van een experiment mogen niet in het dierenverblijf aanwezig zijn;
- beschermende handschoenen, neus- en mondmaskers en veiligheidsbril worden gedragen;
- volledige beschermende kleding en apart schoeisel wordt gedragen. De kleding wordt in het verblijf of in de sluis achtergelaten en ontsmet voordat deze wordt gewassen. Het schoeisel blijft na gebruik in het verblijf of in de sluis achter;
- bij het verlaten van het verblijf is douchen verplicht;
- alle afvalwater wordt ontsmet met een gevalideerde methode.

Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van gechallengde rhesusapen

Van dieren die gechallenged zijn zullen bloed en weefsels worden gecontroleerd op immuunresponsen en de aanwezigheid van SHIV virus. Bij deze handelingen dient met name de medewerker beschermd te worden.

De COGEM adviseert de handelingen met cellen en weefsels van gechallengde dieren in te schalen op C-II niveau (Regeling1, Bijlage 4 onder 4.1.1.4.).