

Advies betreffende: **Productie en gebruik van virale vectoren t.b.v. gerichte somatische gen modificatie in muizen**

Kennisgever: **Nederlands Kanker Instituut**

COGEM kenmerk
CGM/030401-02

BGGO nummer
GGO 01-216/1

Datum advies
2 april 2003

Inleiding

Het doel van het onderzoek is om de ontwikkeling van tumoren bij de mens in muizen na te bootsen. Hiertoe zijn muizenlijnen gegenereerd met conditionele mutaties in oncogenen en tumorsuppressorgen. Deze muizenlijnen worden vervaardigd door gebruik te maken van lentivirale vectoren. In de lentivirale vectoren zijn genen opgenomen voor het Cre/LoxP recombinase systeem en verschillende markergenen die onder controle staan van diverse weefsel-specifieke promotoren.

Lentivirale vectoren behoren tot de familie van retrovirussen en worden vaak gebruikt als een effectief genoverdracht systeem dat stabiele transductie in zowel delende als niet-delende cellen mogelijk maakt. De genomorganisatie van lentivirussen bevat in aanvulling op de *gag*, *pol* en *env* genen, een complexe combinatie van genen die coderen voor een zestal eiwitten. Niet alle functies van deze eiwitten zijn bekend, maar ze zijn essentieel voor het handhaven van de virulentie en interfereren mogelijk met de celcyclus en/of celgroei. In de onderhavige aanvraag worden lentivirale vectoren van het 3e generatie 'packaging' systeem gebruikt (1). Bij dit vectorsysteem zijn de noodzakelijk virale genen en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden. Bij de productie van deze vectoren zijn de *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* en *nef* genen niet nodig en afwezig. Daarnaast draagt het gebruik van 'self-inactivating' (SIN) vectoren bij aan een hogere bioveiligheid. Bij deze SIN vectoren wordt de kans op verspreiding van de vector uit de getransduceerde cel verder gereduceerd (4-6).

In de huidige wijzigingsaanvraag verzoekt de aanvrager om de muizen twee weken na infectie met lentivirale vectoren op D-I niveau te huisvesten. De COGEM heeft hierover reeds eerder geadviseerd (CGM/021112-01 en CGM/021202-02) en heeft destijds aangegeven dat de risicoanalyse nader beschreven dient te worden alvorens mogelijk overgegaan kan worden tot terugplaatsing van de dieren van D-II naar D-I niveau.

Overwegingen en Advies

De aanvrager maakt gebruik van een 'self-inactivating' lentivirale vector van de 3e generatie 'packaging' systemen. Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in vier plasmiden die geen homologe sequenties bevatten in de virale sequenties, verkleint de mogelijkheid op recombinatie gedurende vectorproductie. Hierdoor en door de

afwezigheid van vijf kleine genen wordt de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus (RCR) sterk gereduceerd. Daarnaast wordt het risico op rescue en mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementerend replicatiecompetente vector uitermate klein doordat er gebruikt gemaakt wordt van een 'self-inactivating' vector. Er worden dan geen genomische transcripten gevormd die zouden kunnen worden 'gepackaged' (6; 7). De COGEM is van mening dat de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus verwaarloosbaar klein is bij het gebruik van dit type vectoren (CGM/020823-05). Daarnaast zijn er geen lentivirussen bekend die de muis als gastheer kunnen gebruiken, waardoor het risico op mobilisatie verder wordt gereduceerd.

Door toediening van de lentivirale vector is de kans aanwezig dat horizontale verspreiding optreedt van partikels naar andere dieren vanuit muizen die de partikels niet hebben opgenomen. Uit de aangeleverde literatuurgegevens blijkt dat de kans op horizontale overdracht uitermate klein is (1; 2; 5; 6). Daarbij is de halfwaardetijd van het viruspartikel bij 37°C minder dan zes uur, waardoor de kans klein is dat het virus gedurende twee weken als extracellulair virus in de muis kan blijven bestaan (3). Indien het onwaarschijnlijke geval van horizontale verspreiding zou plaatsvinden dan is de kans uiterst gering dat het een replicatie-competent virus betreft, waardoor de risico's voor de omgeving verwaarloosbaar klein zullen zijn.

Om direct bloed-bloed contact tussen de muizen uit te sluiten om zo eventuele horizontale transmissie te voorkomen, acht de COGEM het noodzakelijk om de mannelijke dieren, die agressief gedrag kunnen vertonen, gedurende de twee weken na infectie individueel te huisvesten.

Voorts dient de aanvrager vast te stellen dat de halfwaardetijd van de lentivirale vector dusdanig is dat er op dag 14 geen infectieuze partikels meer aanwezig zijn. Een bewaarproef van het inoculum met titratie op een cellijn in vitro op verschillende tijdstippen kan hierover uitsluitsel geven. Immers, indien na 14 dagen een titer wordt gevonden die lager is dan het minimale inoculum om een muis te infecteren, dan kan de kans op enig effect van uitscheiding op de omgeving nihil geacht worden.

Indien op dag 14 geen infectieuze partikels meer aanwezig zijn en aan de andere genoemde voorwaarde is voldaan, acht de COGEM terugplaatsing van de muizen, twee weken na infectie van D-II naar D-I niveau, gerechtvaardigd. Onder deze condities acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij terugplaatsing verwaarloosbaar klein.

1. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). *J Virol* 72, blz. 8463-71
2. Galimi, F. and Verma, I. M. (2002). *Curr Top Microbiol Immunol* 261, blz. 245-54
3. Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). *Virology* 280, blz. 124-31
4. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). *J Virol* 72, blz. 8150-7
5. Vigna, E. and Naldini, L. (2000). *J Gene Med* 2, blz. 308-16
6. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovskiy, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). *J Virol* 72, blz. 9873-80
7. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). *Nat Biotechnol* 15, blz. 871-5.