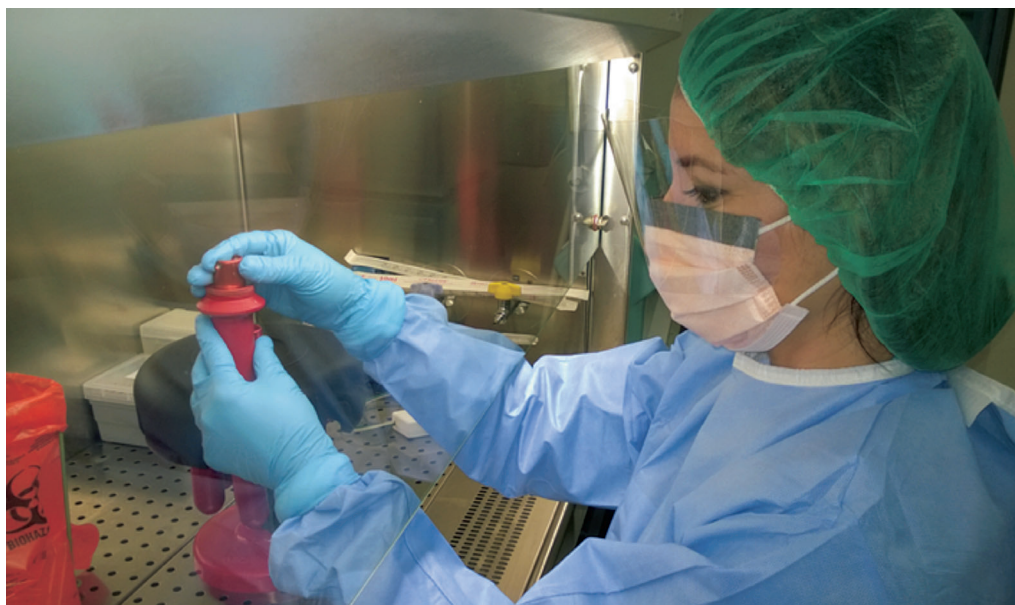


La biosicurezza connessa all'utilizzo di vettori lentivirali nella sperimentazione biotecnologica



La biosicurezza connessa all'utilizzo di vettori lentivirali nella sperimentazione biotecnologica

Pubblicazione realizzata da

INAIL

Settore Ricerca, Certificazione e Verifica

Collaborazione redazionale

Maria Castriotta, Tiziana Belli

Autori

Biancamaria Pietrangeli

INAIL Settore Ricerca, Certificazione e Verifica

Elena Fattori

Senato della Repubblica, Commissione Politiche Unione Europea

Mirella Biava, Andrea Cara, Zuleika Michelini

Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Farmaco, Reparto Farmacologia e Terapia delle Malattie da Virus

CONTATTI

INAIL - Settore Ricerca, Certificazione e Verifica

Viale Stefano Gradi, 55 - Roma

b.pietrangeli@inail.it; zuleika.michelini@iss.it

www.inail.it

© 2014 INAIL

La pubblicazione viene distribuita gratuitamente e ne è quindi vietata la vendita nonché la riproduzione con qualsiasi mezzo.

È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

ISBN 978-88-748-403-6

Tipolitografia INAIL - Milano, luglio 2014

Presentazione

I vettori lentivirali sono diventati, negli ultimi anni, di uso comune in numerosi laboratori italiani ed è quindi importante comprendere a fondo l'origine di questi importanti strumenti biologici per la veicolazione di informazioni genetiche e le potenziali implicazioni di biosicurezza secondo quanto disposto dal Titolo X del Decreto Legislativo del 9 aprile 2008, n. 81 e s.m.i. e dal Decreto Legislativo del 12 aprile 2001, n. 206.

La scelta di un particolare vettore è spesso guidata da considerazioni di tipo funzionale, quali una maggiore efficienza di trasduzione cellulare e di trasferimento genico, risulta tuttavia indispensabile procedere anche ad un'accurata valutazione del rischio per garantire la sicurezza non solo di coloro che ne beneficeranno in terapia, ma anche degli operatori che li manipolano. Notevoli, infatti, sono stati gli sforzi fatti per arrivare allo sviluppo di vettori sempre più efficienti e, allo stesso tempo, sempre più sicuri.

Nel documento vengono analizzate le diverse tipologie di vettori lentivirali e vengono discussi gli aspetti da considerare nella valutazione dei rischi connessi alle operazioni con tali vettori, al fine di giungere alla corretta definizione delle misure di contenimento del rischio professionale, come richiesto dalle normative vigenti. Sebbene a tutt'oggi non siano stati riportati incidenti a carico dei lavoratori del settore, tuttavia la messa a punto di metodi per la verifica di un'eventuale contaminazione del lavoratore può rivelarsi utile al fine di confermare l'efficacia delle misure di contenimento adottate ed a dare indicazioni per l'attivazione di piani specifici di sorveglianza sanitaria.

INDICE

Introduzione	7
1. Quadro normativo di riferimento nazionale	14
2. La notifica di impiego	15
3. I vettori lentivirali	16
4. Biologia di HIV	18
5. Costruzione di vettori lentivirali derivanti da HIV-1 e miglioramento della sicurezza biologica	19
5.1 <i>Vettori lentivirali di prima generazione</i>	21
5.2 <i>Vettori lentivirali di seconda generazione</i>	22
5.3 <i>Vettori lentivirali di terza generazione e “vettori auto-inattivanti”</i>	23
5.4 <i>Ulteriori miglioramenti</i>	26
5.5 <i>Vettori lentivirali Integrasi Difettivi (IDLV)</i>	27
6. Identificazione dei pericoli associati all'utilizzo dei vettori lentivirali	29
7. Valutazione del rischio nelle attività di laboratorio che prevedono l'uso di vettori lentivirali	32
8. Manipolazione di colture cellulari trasdotte da vettori lentivirali	32
9. Manipolazione di sospensioni di vettori lentivirali	33
10. Studi <i>in vivo</i>	33
11. Sequenze retrovirali endogene	34
12. Valutazione del rischio connesso all'utilizzo di vettori lentivirali nella sperimentazione animale	37
13. Misure di prevenzione nell'utilizzo di vettori lentivirali: Linee Guida internazionali	38
14. Test per la valutazione della presenza di vettori lentivirali competenti per la replicazione (RCL)	43
15. Test per la valutazione della mobilizzazione dei vettori lenti virali	44
16. Valutazione dell'esposizione professionale a vettori lentivirali	45
17. Procedure operative standard in seguito ad esposizione accidentale ai vettori lentivirali	45
18. Conclusioni	46
Riferimenti bibliografici	49

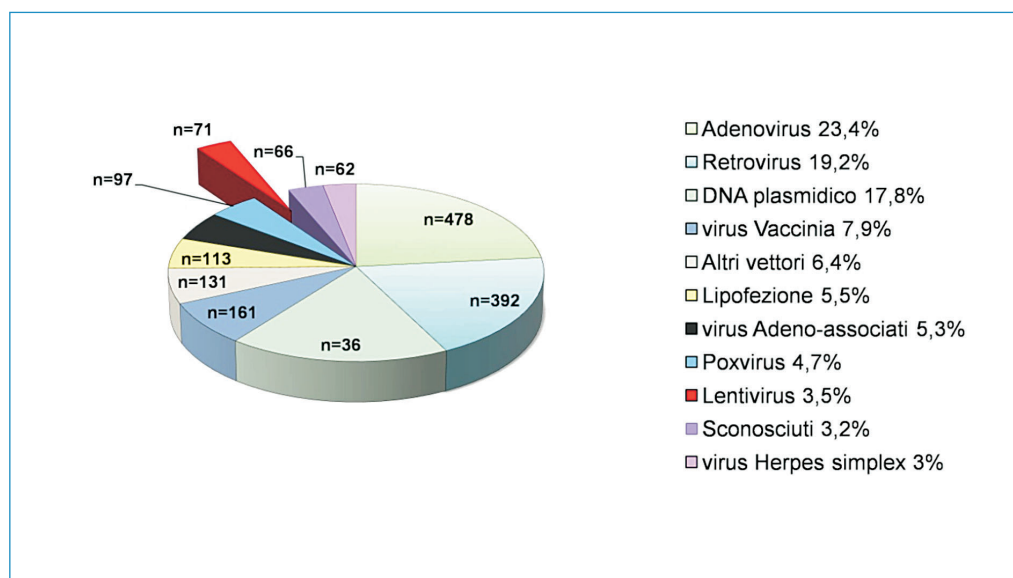
Introduzione

Grazie alla loro capacità di integrarsi stabilmente in cellule quiescenti, e quindi garantire l'espressione a lungo termine del transgene, i vettori lentivirali (VL) sono diventati, negli ultimi anni, di uso comune in numerosi laboratori di biologia molecolare come veicoli di trasferimento genico in applicazioni sia di ricerca che di terapia genica. Essi trovano, infatti, applicazione sia *in vitro* per la trasduzione di cellule eucariotiche e la produzione di proteine ricombinanti, che *in vivo*, in modelli animali, per lo sviluppo pre-clinico e clinico di vettori impiegati nella terapia genica, ma anche per lo sviluppo di nuovi *delivery system* per la produzione di vaccini di ultima generazione.

Nel caso della terapia genica l'impiego dei VL mira alla correzione della mutazione genetica che determina la patologia tramite l'addizione genica, l'eliminazione specifica di cellule bersaglio o l'inibizione mirata dell'espressione genica. Ne è un esempio il trattamento della Adenuloleucodistrofia X-linked (ALD), una grave patologia del cervello, dovuta alla demielinizzazione delle cellule neuronali causata da un deficit di proteina ALD, codificata dal gene ABCD1. Le cellule ematopoietiche staminali sono prelevate dai pazienti, geneticamente corrette *ex vivo* con un vettore lentivirale esprimente ABCD1 e reinfuse nei pazienti, dopo trattamento mieloablativo. Dopo 16 mesi dal trattamento è stato osservato nei pazienti il blocco del processo di demielinizzazione (Cartier, 2009). Recentemente, in Italia, è stata trattata con successo anche la leucodistrofia metacromatica (MLD), una malattia ereditaria, dovuta ad un errato accumulo lisosomiale di sulfatide causato dalla carenza dell'enzima cellulare Arilsolfatasi A (ARSA). I pazienti con MLD mostrano un progressivo deterioramento cognitivo e muoiono nel giro di pochi anni dall'insorgenza dei sintomi. Anche in questo caso, è stato utilizzato un vettore lentivirale esprimente il gene ARSA funzionale per correggere *ex vivo* le cellule staminali ematopoietiche e reinfonderle nei pazienti che in seguito hanno mostrato una alta espressione dell'enzima nelle linee ematopoietiche e nel liquido cerebrospinale (Biffi, 2013). In campo vaccinale, i VL, soprattutto gli integrasi difettivi (IDLV), ossia quelli che hanno una mutazione nel gene dell'integrasi che li rende incapaci di integrarsi nel genoma ospite, trovano applicazione nella messa a punto di vaccini per le infezioni da patogeni per i quali i classici vaccini (inattivati, attenuati, a subunità, ricombinanti) non hanno dato risultati soddisfacenti. Per esempio, nel caso delle malattie sessualmente trasmesse, una delle più prevalenti è l'herpes genitale, causato generalmente da Herpes simplex-2 (HSV-2), o

nelle infezioni da virus della immunodeficienza umana (HIV di tipo 1 e 2), agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). In generale, i VL possono quindi trovare applicazioni dove è richiesta una immuno-modulazione del sistema immunitario, dal momento che sono in grado di trasdurre efficacemente cellule presentanti l'antigene quali, ad esempio, le cellule dendritiche (Palmowski, 2004). Questa proprietà è stata, infatti, sfruttata per allestire vaccini contro i tumori (Bobisse, 2009; Esslinger, 2003; Iglesias, 2007) e le malattie infettive (Dai, 2009; Lemiale, 2010). Trovano poi notevole sviluppo le applicazioni di immunoterapia adottiva con linfociti diretti contro i tumori mediante l'introduzione con VL di T-cell receptor esogeni o recettori chimerici per antigeni tumorali. Per avere un'idea di quanto, in terapia genica, l'impiego di questo tipo di vettore stia aumentando nel mondo, basta consultare il database del "The Journal of Gene Medicine Gene Therapy Clinical Trials Worldwide" URL: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>, dove il loro impiego in trial clinici, rispetto alle altre classi di vettori, è passato dal 2.9% (n=55) del 2012 al 3.5% (n=71) del 2014 (Figura 1).

Figura 1. Impiego dei vettori lentivirali in terapia genica



In Tabella 1 vengono indicati nel dettaglio i trial clinici nel mondo dove sono impiegati i VL.

Tabella 1. Elenco dei trial clinici nel mondo che utilizzano vettori lentivirali

CODICE TRIAL	DATA INIZIO	TITOLO	STATO
AU-0030	2012	MGMT Gene Therapy and Chemotherapy for the treatment of Childhood Brain Tumours	Aperto
BE-0026	2012	A multi center, randomized, double blind, placebo controlled Phase I/II trial to compare the safety, tolerability and immunogenicity of the therapeutic THV01 vaccination at 5.106 TU, 5.107 TU or 5.108 TU doses to placebo in HIV 1 clade B infected patients under highly active antiretroviral therapy (HAART)	Aperto
FR-0028	2005	Treatment of X linked cerebral adrenoleukodystrophy by ex vivo transfer of the ALD gene in autologous CD34+ cells	Concluso (Cartier, 2009)
FR-0029	2006	A phase I/II open label study with anticipated clinical benefit evaluation genetic therapy of the - hemoglobinopathies (Sickle cell anemia and - thalassemia major) by transplantation of autologous CD34+ stem cells modified ex-vivowith a lentiviral A- T87Q-Globin (lentiGlobinTM) vector	Aperto
FR-0041	2008	Phase I/II Study of the Safety, Efficacy and Dose Evaluation of ProSavin for the Treatment of Bilateral Idiopathic Parkinson's Disease	Aperto
FR-0042	2009	Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy.	(Cartier, 2009)
FR-0047	2011	Gene Therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome	Aperto
FR-0048	2011	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected StarGen Administered to Patients With Stargardt Macular Degeneration	Aperto
FR-0055	2013	A Phase 1/2 Open Label Study Evaluating the Safety and Efficacy of Gene Therapy of the Hemoglobinopathies (Sickle Cell Anemia and Thalassemia Major) by Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral A-T87Q Globin Vector (LentiGlobinBB305 Drug Product)	Aperto
FR-0060	2013	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected UshStat Administered to Patients with Retinitis Pigmentosa Associated with Usher Syndrome Type 1B	Aperto
IT-0019	2010	Phase I/II study of hematopoietic stem cell gene therapy with Lentiviral Vectors for the treatment of Metachromatic Leukodystrophy	Aperto (Biffi, 2013; Aiuti, 2013)
UK-0168	2008	Phase I/II clinical trial of haematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome EudraCT 2007-004308-11	Aperto
UK-0191	2010	A phase 1/11 study of the safety, efficacy and dose evaluation of ProSavin, administered using stereotactic injection to the striatum of patients with bilateral, idiopathic ParkinsonsDisease EudraCT No: 2007-001109-26	Aperto
UK-0198	2011	Lentiviral Gene Therapy for X-Linked Chronic Granulomatous Disease (X-CGD)	Aperto

Note: Si riportano i titoli originali degli studi finanziati.

Continua

Segue Tabella

UK-0199	2011	Phase I/II, Non-controlled, Open-label, Non-randomised, Single-centre Trial to Assess the Safety and Efficacy of EF1 S-ADA Lentiviral Vector Mediated Gene Modification of Autologous CD34+ Cells From ADA-deficient Individuals	Aperto
UK-0201	2012	Phase I Study of Ex-vivo Lentiviral Gene Therapy for the Inherited Skin Disease Netherton Syndrome	Aperto
UK-0207	2013	A Phase II Trial to Assess the Activity of NY-ESO-1 Targeted T Cells in Advanced Oesophagogastric Cancer	Aperto
US-0488	2001	A Phase I Open-Label Clinical Trial of the Safety and Tolerability of Single Escalating Doses of Autologous CD4 T Cells Transduced with VRX496 in HIV Positive Subject	Concluso
US-0646	2004	A Phase I/II, Open-Label, Multicenter Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Therapeutic Effect of Repeated Doses of Autologous T Cells Transduced with VRX496 in Antiretroviral Experienced HIV-Positive Patients	Aperto
US-0667	2004	A Phase I/II, Open-Label, Single Center Study to Evaluate the Tolerability, Trafficking and Therapeutic Effects of Repeated Doses of Autologous T Cells Transduced with VRX496 in HIVInfected Subjects	Aperto
US-0725	2005	A Phase I Pilot Study of Safety and Feasibility of Stem Cell Therapy for AIDS Lymphoma using Stem Cells Treated with a Lentivirus Vector Encoding Multiple Anti-HIV RNAs	Aperto
US-0737	2005	A Pilot Study of Safety and Feasibility of T Cell Immunotherapy Using Lentivirus Vector-Expressed RNAi in Autologous T Cells of HIV-1 Infected Patients Who have Failed Anti-Retroviral Therapy	Aperto
US-0758	2006	Lentiviral-Mediated, Hematopoietic-Directed Gene Therapy for MPS VII	Aperto
US-0791	2006	Treatment and Biological Imaging of Patients with Locally Advanced or Metastatic Melanoma with Lentiviral Vector MART-1 TCR/HSV1-sr39k (FUW-M1-TCR/sr39k) Engineered Lymphocytes, MART-1 26.35-Pulsed Dendritic Cells, and Interleukin-2 after a Nonmyeloablative Conditioning Regimen	Aperto
US-0793	2006	Pilot Study of Redirected Autologous T Cells Engineered to Contain Anti-CD19 Attached to TCRz and 4-1 BB Signaling Domains in Patients with Chemotherapy Resistant or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma	Aperto
US-0852	2007	A Phase I Open-Label Clinical Trial for the Treatment of Beta-Thalassemia Major with Autologous CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells Transduced with Thalagen, a Lentiviral Vector Encoding the Normal Human Beta-Globin Gene	Aperto
US-0871	2007	A Phase I/II, Open-Label Study to Evaluate the Safety and Antiviral Activity of Autologous T-Cells Transduced with VRX496 in Treatment of Naive Subjects with Early Stage HIV-1 Infection	Aperto
US-0875	2007	A Rollover Study to Evaluate Safety and Therapeutic Effect of Re-infusing Subjects Who Completed Participation in the VRX-496-USA-05-002 Trial with Autologous T Cells with VRX496	Aperto
US-0892	2008	Phase I Study to Evaluate Cellular Immunotherapy Using Genetically-Modified Autologous CMV x CD19 Bispecific T Cells Following T-Cell Depleted Autologous Peripheral Blood Stem Cell	Aperto

Continua

Segue Tabella

Transplantation for Patients with Recurrent/Refractory Intermediate Grade B-Lineage Non-Hodgkin Lymphoma			
US-0895	2008	A Phase I Study of Gene Transfer for Patients with Fanconi Anemia Complementation Group A (FANCA)	Aperto
US-0898	2008	O(6)-Benzylguanine (BG) and Temozolomide (TMZ) Therapy of GlioblastomaMultiforme in Patients with MGMT Positive Tumors with Infusion of Autologous P140KMGMT+ Hematopoietic Progenitors to Protect Hematopoiesis	Aperto
US-0921	2008	A Phase I, Open Label, Dual Cohort, Single Center Study to Evaluate the Safety and Tolerability of Escalating Doses of Autologous T Cells Modified with Lentiviral Vectors Expressing High Affinity Gag-Specific TCRs in HLA-A*02 Patients with HIV	Aperto
US-0963	2009	A Pilot Feasibility Study of Gene Transfer for X-Linked Severe Combined Deficiency in Newly Diagnosed Infants Using A Self-Inactivating Lentiviral Vector to Transduce Autologous CD34+ Hematopoietic Cells	Aperto
US-0964	2009	Lentiviral Gene Transfer for Treatment of Children Older Than One Year of Age with X-Linked Severe Combined Immunodeficiency	Aperto
US-0975	2009	A Phase I Dose-escalation Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of a Replication-Defective HIV1 Vaccine (HIVAXTM) in HIV-1 Infected Subjects Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy	Aperto
US-0980	2009	Phase I Clinical Trial of Autologous Mesothelin Redirected T Cells Administered by Intravenous or Intratumoral Injection in Ovarian Cancer Patients	Aperto
US-1006	2009	Treatment of Subjects with Adenosine Deaminase (ADA) Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID) with Autologous Bone Marrow CD34+ Stem/Progenitor Cells after Addition of a Normal Human ADA cDNA by the EFS-ADA Lentiviral Vector	Aperto
US-1023	2010	Gene Transfer for Patients with Sickle Cell Disease Using a Gamma Globin Lentivirus Vector: An Open Label Phase I/II Pilot Study	Aperto
US-1025	2010	Pilot Study of Donor Lymphocyte Infusions Using Donor T Cells Engineered to Contain Anti-CD19 Attached to TCR- and 4-1BB Signaling Domains in Patients with Relapsed CD19+ ALL After Allogeneic Stem Cell Transplantation	Aperto
US-1052	2010	Pilot and Feasibility Study of Hematopoietic Stem Cell Gene Transfer for Wiskott-Aldrich Syndrome	Aperto
US-1056	2010	A Phase I, Dual Cohort, Two-site, Clinical Trial Evaluating the Safety and Activity of Redirected Autologous T Cells Expressing a High Affinity TCR Specific for MAGEA3/6 or NYESO1 Administered Post ASCT in Patients with Advanced Myeloma	Aperto
US-1057	2010	Phase I Study to Assess the Safety and Activity of Enhanced TCR Transduced Autologous T cells against Cancer-Testis Antigens in Metastatic Melanoma	Aperto
US-1061	2010	A Phase I Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected RetinoStat, a Lentiviral Vector Expressing Endostatin and Angiostatin, in Patients with Advanced Neovascular Age-Related Macular Degeneration	Aperto

Continua

Segue Tabella

US-1062	2010	Phase I/II Study of Cellular Immunotherapy Using Central Memory-Enriched CD8+ T Cells Lentivirally Transduced to Express a CD19-Specific Chimeric Immunoreceptor Following Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Patients with High-Risk Intermediate Grade B-Lineage Non-Hodgkin Lymphoma	Aperto
US-1067	2010	A Pilot Feasibility Study of Gene Transfer for Patients with beta-thalassemia Using a Self-Inactivating gamma-Globin Lentiviral Vector to Transduce Autologous CD34+ Hematopoietic Cells	Aperto
US-1071	2010	A Pilot Study of Genetically Engineered NY-ESO-1 Specific (c259) T Cells in HLA-A2+ Patients with Synovial Sarcoma	Aperto
US-1073	2010	An Open Label, Non-Randomized, Single Dose, Multi-Center Phase 2/3 Study of the Safety and Efficacy of Lenti-D Modified Autologous Stem Cells (Lenti-D Drug Product) for the Treatment of Subjects with Childhood Cerebral Adrenoleukodystrophy (CCALD)	Aperto
US-1076	2010	Phase I Clinical Trial of Autologous Alpha-Folate Receptor Redirected T Cells Administered Intravenously in Ovarian Cancer Patients	Aperto
US-1085	2010	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected StarGen, Administered to Patients with Stargardts Macular Degeneration	Aperto
US-1086	2011	Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes in Melanoma Patients: A Phase I Dose Escalation Study	Aperto
US-1102	2011	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected UshStat, Administered to Patients with Retinitis Pigmentosa Associated with Usher Syndrome Type 1B	Aperto
US-1105	2011	A Phase I/II Study of Lentiviral Gene Transfer for the Treatment of Fanconi Anemia Type A	Aperto
US-1112	2011	Gene Therapy for Hemophilia A Incorporating a High Expressing Factor VIII Transgene and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: a Pilot Study	Aperto
US-1130	2011	An Adaptive Phase I-II Study of the Safety of CD4+ T cells and CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Transduced with CAL-1, a Dual Anti-HIV Gene Transfer Construct, in Busulfan Conditioned HIV-Infected Adults Previously Exposed to ART	Aperto
US-1150	2012	A Phase 1/11 Study of Cellular Immunotherapy with Donor Central Memory -Derived Virus-Specific CD8+ T-Cells Engineered to Target CD 19 for CD 19+ Malignancies after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant	Aperto
US-1153	2012	Stem Cell Gene Therapy for HIV in AIDS Lymphoma Patients	Aperto
US-1161	2012	A Phase 1 Feasibility and Safety Study of Cellular Immunotherapy for Relapsed Pediatric CD19+ Acute Lymphoblastic Leukemia Using Autologous T-cells Lentivirally Transduced to Express a CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor	Aperto
US-1164	2012	A Phase 1/2, Open Label Study Evaluating the Safety and Efficacy of Gene Therapy in Subjects with Thalassemia Major by Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral A-T87Q-Globin Vector	Aperto
US-1169	2012	Phase I/II Study of Adoptive Immunotherapy after Allogeneic HCT with Virus Specific CD8+ T Cells that have been	Aperto

Continua

Segue Tabella

Transduced to Express a WT1-specific T Cell Receptor for Patients with High Risk or Relapsed AML, MDS, or CML			
US-1176	2012	A Phase I/IIa, Open Label, Clinical Trial Evaluating the Safety and Efficacy of Autologous T Cells Expressing Enhanced TCRs Specific for NY-ESO-1/LAGE-1 in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma	Aperto
US-1177	2012	A Phase I/IIa Open Label, Multiple Site Clinical Trial Evaluating the Safety and Activity of Engineered Autologous T cells Expressing an Affinity enhanced TCR Specific for NY ESO 1 and LAGE 1, in Patients with Relapsed or Progressive Disease following Prior Auto HSCT	Aperto
US-1183	2012	Phase I Study of Cellular Immunotherapy Using Central Memory Enriched T Cells Lentivirally Transduced to Express a CD19-Specific, CD28-Costimulatory Chimeric Receptor and a Truncated EGFR Following Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Patients with High-Risk Intermediate Grade B-Lineage Non-Hodgkin Lymphoma	Aperto
US-1187	2012	Clinical Research Study of Autologous Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease (SCD) using Bone Marrow CD34+ Cells Modified with the Lenti/ AS3-FB Lentiviral Vector	Aperto
US-1197	2012	Dose Optimization Trial of Autologous T Cells Engineered to Express Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor (CART-19) in Patients with Relapsed or Refractory CD19+ Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)	Aperto
US-1213	2013	Phase I/II Study of Immunotherapy for Advanced CD19+ B Cell Malignancies with Defined Subsets of Autologous T Cells Engineered to Express a CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor	Aperto
US-1223	2013	A Phase I/II, Non-randomized, Multicenter, Open-label Study of G1XCGD (Lentiviral Vector Transduced CD34+ Cells) in Patients with X-Linked Chronic Granulomatous Disease	Aperto
US-1233	2013	Pediatric Leukemia Adoptive Therapy (PLAT)-02: A Phase 1/2 Feasibility and Safety Study of CD19-CAR T Cell Immunotherapy for CD19+ Acute Lymphoblastic Leukemia	Aperto
US-1237	2013	Safety and Feasibility of Gene Transfer after Frontline Chemotherapy for Non-Hodgkin Lymphoma in AIDS Patients Using Peripheral Blood Stem/Progenitor Cells Treated With A Lentivirus Vector-Encoding Multiple Anti-HIV RNAs	Aperto
XX-0020	2012	Clinical Trial Phase I / II study to evaluate the safety and efficacy of the infusion of autologous CD34+ cells mobilized with Filgrastim and Mozobil and transduced with a lentiviral vector carrying the FANCA gene (Orphan drug) for patients with Fanconi anemia subtype A	Aperto
XX-0025	2013	A Phase I/II, Non Randomized, Multicenter, Open-label Study of g1xcgd (Lentiviral Vector Transduced cd34+ Cells) in Patients With X-linked Chronic Granulomatous Disease	Aperto
XX-0029	2013	Phase I/II Clinical Study of autologous CD34+ cells transduced ex vivo with the G1XCGD lentiviral vector containing the GP91 transgene which is a codon-optimized cDNA of the human CYBB gene (also known as GP91-PHOX gene) for the Treatment of X-linked chronic granulomatous disease (G1XCGD).	Aperto

1. Quadro normativo di riferimento nazionale

Se da un lato la messa a punto di VL ha aperto importanti prospettive applicative, dall'altro ha suscitato preoccupazione per i pericoli ad essi correlati, dovuti anche al possibile inoculo accidentale dell'operatore. Tale evento potrebbe, infatti, esporre il lavoratore ai pericoli connessi all'espressione del transgene, ad eventuali fenomeni di mutagenesi inserzionale (oncogenesi) dovuti all'integrazione stabile del genoma virale nel genoma della cellula ospite, o alla possibile generazione di lentivirus replicazione-competenti (RCL), in seguito alla presenza di co-infezioni con il virus parentale o a fenomeni di ricombinazione genica durante la produzione del vettore *in vitro*. Per la valutazione e gestione dei rischi biologici occupazionali connessi con l'utilizzo di VL nel settore biotecnologico è necessario integrare i disposti del Titolo X del Decreto Legislativo n. 81 del 9 aprile 2008 (D.Lgs. 81/2008) e successive modifiche ed integrazioni apportate dal Decreto Legislativo n. 106 del 3 agosto 2009 (D.Lgs. 106/2009), con quelli del Decreto Legislativo n. 206 del 12 aprile 2001 (D.Lgs. 206/2001) concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) che ha recepito a livello nazionale la Direttiva 98/81/CE del Consiglio (Direttiva 98/81/CE) aggiornamento della prima Direttiva in materia, la 90/219/CEE. Recentemente a livello comunitario per ragioni di chiarezza si è proceduto ad una rifusione delle disposizioni in tema di impiego confinato di MOGM e tale testo è rappresentato dalla Direttiva 2009/41/CE del Parlamento europeo e del Consiglio (Direttiva 2009/41/CE).

Le norme del Titolo X del D.Lgs. 81/2008, si applicano a tutte le attività lavorative nelle quali vi è rischio di esposizione ad agenti biologici di cui è riportata una classificazione in gruppi di rischio nell'Allegato XLVI del Decreto, in base sia alle loro caratteristiche di pericolosità che alla disponibilità di specifiche misure profilattiche e terapeutiche. Sebbene i disposti del D.Lgs. 81/2008 si applichino sia ai microrganismi naturali che a quelli geneticamente modificati, in tale classificazione non vengono però considerati i MOGM. Nello specifico è prevista l'applicazione del citato D.Lgs. 206/2001 che definisce come "microrganismo geneticamente modificato" un microrganismo il cui materiale genetico è stato modificato in un modo non naturale mediante moltiplicazione o ricombinazione naturale; sono quindi inclusi in tali definizioni i vettori virali, anche se difettivi per la replicazione. Il D.Lgs. 206/2001 definisce inoltre l'"impiego confinato" come ogni attività nella quale i microrganismi sono modificati geneticamente o nella quale tali MOGM sono messi in coltura, conservati, trasportati, distrutti, smaltiti o altrimenti utilizzati".

Sia il Titolo X del D.Lgs. 81/2008 che il D.Lgs. 206/2001 prevedono per laboratori, processi industriali e stabulari diverse misure di contenimento e relativi livelli di biosicurezza da adottare in funzione della pericolosità degli agenti presenti. Il contenimento rappresenta l'insieme delle misure tecniche, organizzative e procedurali da adottare per ridurre al minimo le possibilità di esposizione lavorativa.

Il D.Lgs. 206/2001 prevede un regime di notifica e autorizzazione per gli impieghi confinati che ricadano nel campo di applicazione e per gli impianti ove si intende

mettere in atto tali impieghi. Tutte le notifiche, sia di impiego che di impianto, devono essere presentate all'Autorità competente che è il Ministero della Salute, presso il quale è istituita la Commissione Interministeriale di valutazione.

Le notifiche devono essere presentate al Ministero compilando i moduli disponibili sul sito istituzionale del Ministero al seguente URL:

http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=3377&area=biotecnologie&menu=notifiche.

Temporalmente la prima notifica da presentare è quella relativa all'impianto ed è presentata al Ministero della Salute dal titolare dello stesso. Essa contiene le informazioni relative all'impianto secondo le specifiche contenute nella parte A dell'Allegato V al D.Lgs. 206/2001. Tale notifica non contiene le informazioni relative ai MOGM che saranno contenute nelle notifiche di impiego, obbligatorie per impieghi di classe 2, 3 e 4. Solo per impieghi di classe 1, per i quali non è prevista ulteriore notifica, la notifica di impianto conterrà un riepilogo della valutazione dei rischi, oltre alle informazioni sulla gestione dei rifiuti. Per tutti gli impieghi, inclusi quelli di classe 1, i documenti di valutazione completi saranno conservati presso l'impianto.

2. La notifica di impiego

Elemento essenziale per la presentazione di una notifica di impiego è la valutazione della classe di rischio dell'impiego confinato che si intende eseguire (art. 5 del D.Lgs. 206/2001). In analogia con i gruppi di rischio 1-4 previsti dal D.Lgs. 81/2008, sono previste, infatti, quattro classi di impiego, definite sulla base dei possibili rischi connessi con l'uso del MOGM. Da tale valutazione derivano le misure di contenimento da adottare per proteggere la salute umana e l'ambiente. Mentre a norma del D.Lgs. 81/2008 si classificano in gruppi di rischio gli agenti biologici, in questo caso l'oggetto della classificazione non sono i MOGM bensì gli impieghi previsti.

Classe 1. Impieghi che presentano rischi nulli o trascurabili per i quali un livello di contenimento 1 è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente;

Classe 2. Impieghi a basso rischio per i quali un livello di contenimento 2 è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente;

Classe 3. Impieghi a rischio moderato per i quali è richiesto un livello di contenimento 3;

Classe 4. Impieghi ad alto rischio per i quali è richiesto un livello di contenimento 4. La notifica di impiego viene presentata dall'utilizzatore, ossia il responsabile scientifico e gestionale dell'impiego, al quale compete la valutazione e la conseguente assegnazione dell'impiego confinato ad una delle 4 classi. È cura dell'Autorità competente verificare la corrispondenza tra classe di impiego e livello di contenimento realizzato presso l'impianto, verificando principalmente la correttezza della classe proposta sulla base della valutazione del rischio.

Nel processo di valutazione del rischio dell'impiego è necessario fare riferimento a quanto previsto dall'Allegato III del D.Lgs. 206/2001, lettere A e B, e valutare il rischio

proprio del microrganismo e quello connesso all'attività. A tale scopo sono state emanate dal Ministero della Salute le note orientative per la valutazione del rischio connesso all'impiego confinato di MOGM (Decreto 25 settembre 2001).

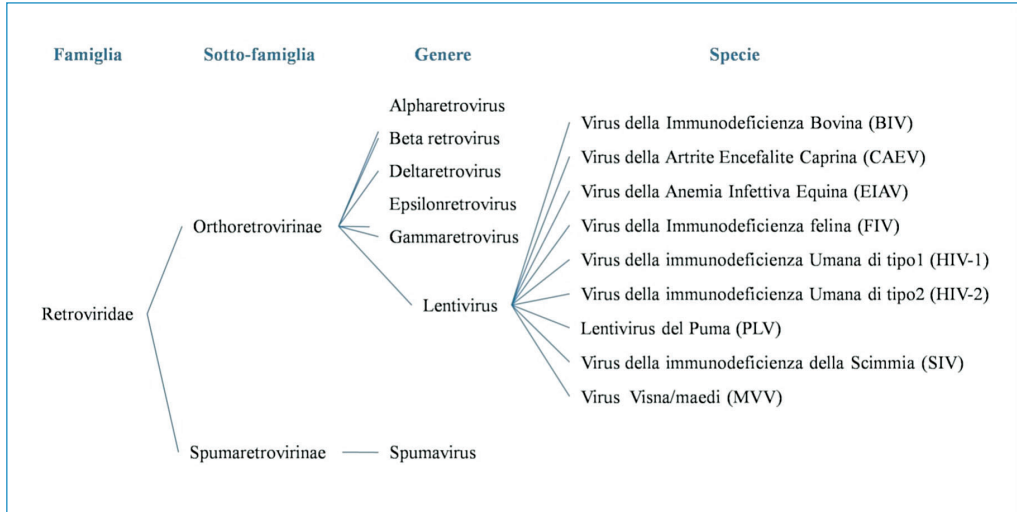
Nello specifico dell'utilizzo dei VL le informazioni da riportare sono quelle necessarie per valutare e gestire i rischi degli impieghi e quindi, oltre alla tipologia del VL è importante valutare la pericolosità delle singole operazioni previste nella sperimentazione (la manipolazione delle colture cellulari trasdotte, delle sospensioni di vettori lentivirali, l'utilizzo di animali inoculati con sospensioni di VL o cellule trasdotte dai vettori, ecc.). Il rischio di esposizione deve essere identificato per ogni procedura facendo particolare attenzione alla potenziale contaminazione dell'operatore. In ultima istanza, la valutazione di tali rischi deve portare all'assegnazione del livello di contenimento più adeguato alle varie fasi del progetto. Come buona regola pratica, il livello di contenimento più alto stabilito, darà anche la classe di impiego del MOGM, da riportare nella notifica di impiego confinato.

Una vasta attività di ricerca ha portato alla produzione di VL che combinano elevate caratteristiche di sicurezza, con riduzione dei rischi ad essi associati e con capacità di trasduzione notevolmente migliorata rispetto ai vettori di prima generazione (Pauwels et al., 2009). Nei paragrafi seguenti vengono illustrati le modalità di costruzione dei vettori lentivirali con particolare attenzione a quelle che sono le caratteristiche di biosicurezza degli stessi e le modalità di valutazione e gestione dei rischi connessi con le diverse attività di laboratorio che prevedono la manipolazione degli stessi.

3. I vettori lentivirali

I virus sono agenti biologici che introducono efficientemente il loro materiale genetico in una cellula ospite in seguito ad infezione e dipendono da essa per la loro replicazione e propagazione. I vettori virali costruiti in laboratorio a partire da virus infettivi, contengono geni di interesse al posto dei geni virali originali; grazie a queste modifiche i vettori virali perdono la capacità di replicarsi e propagarsi autonomamente mentre mantengono la capacità di infettare e trasferire il loro materiale genetico nella cellula ospite.

I VL derivano da virus appartenenti alla famiglia dei retrovirus (*Retroviridae*; genere lentivirus) e ad oggi sono considerati tra i più pratici vettori di trasferimento genico, sia per applicazioni di ricerca che di terapia genica, soprattutto grazie alla loro capacità di integrarsi nel genoma di cellule di mammifero, indipendentemente dal loro stato proliferativo e quindi garantire un'espressione a lungo termine del transgene. Il genere lentivirus è composto da nove specie di virus che includono retrovirus sia dei primati che non (Figura 2).

Figura 2. Classificazione dei virus secondo la International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

I VL attualmente in uso sono stati principalmente sviluppati dai virus HIV-1, SIV e FIV. In particolare, i virus HIV di tipo 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2), causano una grave immunodepressione nell'uomo, denominata sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). HIV-1 causa la maggior parte dei casi di AIDS nell'emisfero occidentale, in Europa, in Asia e nell'Africa centrale, meridionale e orientale; mentre HIV-2, il quale è meno virulento di HIV-1, è il principale agente eziologico di AIDS nell'Africa occidentale. Nonostante la sua ben nota patogenicità, è risultato chiaro fin dall'inizio della ricerca sui VL, che i vettori derivati da HIV-1 offrono soluzioni uniche per protocolli di terapia genica, perché sono in grado di codificare per geni di grandi dimensioni (fino a 8Kb), trasducono efficacemente sia cellule in divisione sia cellule differenziate e quiescenti, mantengono a lungo l'espressione del gene trasdotto nel genoma della cellula ospite, non presentano un'immunità pre-esistente anti-vettore, inducono una bassa risposta immunitaria dell'ospite nei confronti del vettore stesso e hanno mostrato una bassa potenzialità genotossica dovuta a mutazione inserzionale (Montini et al., 2006; Montini et al., 2009).

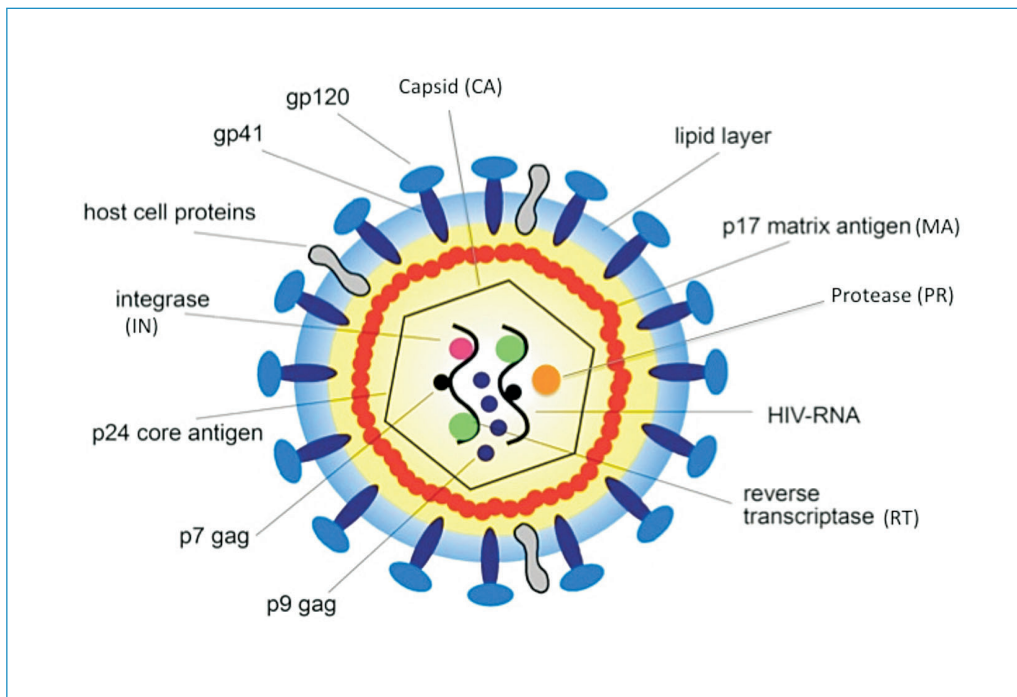
FIV infetta dal 2 al 20% dei gatti domestici nel mondo e causa una malattia simile all'AIDS umano. Anche il virus SIV induce nelle scimmie una sindrome da immunodeficienza (SAIDS) (Daniel et al., 1985) e possiede un tropismo cellulare simile a quello di HIV-1 per i linfociti CD4+. Alcune specie di primati non umani rappresentano un buon modello sperimentale per lo studio della patologia di HIV e per la messa a punto di vaccini e terapie antivirali contro di esso.

4. Biologia di HIV

Per mostrare la biologia molecolare dei lentivirus, è possibile utilizzare il virus HIV-1 come esempio prototipo.

La particella virale di HIV-1 ha una forma sferica del diametro di circa 100-120 nm ed è composta principalmente di proteine, lipidi e RNA. Il virione è composto da una membrana a doppio strato lipidico, chiamata *envelope*, o involucro, di origine cellulare, che circonda un nucleocapside proteico a forma di cono. Ogni virione contiene un genoma composto da due molecole identiche di RNA monocatenario fiancheggiato da due sequenze terminali ripetute (LTR) necessarie sia per la retrotrascrizione del genoma virale che per l'integrazione e trascrizione dei geni (Figura 3).

Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura del virus HIV-1



Note: I due singoli filamenti di RNA, gli enzimi RT, IN e PR, insieme a proteine accessorie sono circondate dal capsidico (CA).

La caratteristica peculiare della famiglia *retroviridae* è la strategia di replicazione, la quale include alcuni passaggi fondamentali: i) la retrotrascrizione del genoma virale da RNA a singolo filamento in DNA lineare a doppio filamento ad opera dell'enzima virale trascrittasi inversa (RT); ii) la successiva integrazione del DNA nel genoma della cellula ospite ad opera dell'enzima virale integrasi (IN) (provirus); iii) la trascrizione del provirus ad opera dell'enzima cellulare RNA polimerasi in trascritti che

codificano per il genoma virale e le proteine virali necessarie alla produzione della particella virale completa. L'RNA virale di HIV-1 è costituito principalmente da tre classi di geni: strutturali (*gag*, *pol* ed *env*); regolatori (*tat* e *rev*) e accessori: (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*). Il gene *gag* codifica le proteine del nucleocapside. Il gene *pol* codifica tre enzimi: la proteasi (PR), la trascrittasi inversa (RT) e l'integrasi (IN). Il gene *env* codifica per le proteine dell'envelope virale; la proteina transmembrana gp41 e la glicoproteina extramembrana gp120. I geni regolatori sono indispensabili per l'inizio e il controllo della trascrizione del genoma virale: il gene *tat* permette il controllo dell'espressione genica del virus, il gene *rev* regola selettivamente la sintesi delle proteine del virione. I geni accessori sono, in realtà, indispensabili per la patogenicità e l'infettività del virus.

Il ciclo di infezione di HIV-1 ha inizio grazie al legame della proteina gp120 con il suo recettore primario, la proteina di membrana CD4 e il successivo legame al co-recettore CXCR4, presente sui linfociti T con prevalente funzione *helper* od al corecettore CCR5, espresso soprattutto nei linfociti T, macrofagi e cellule dendritiche. In seguito al riconoscimento recettoriale, avvengono dei cambiamenti conformazionali nell'envelope del virione che ne permettono la fusione con la membrana cellulare e il rilascio del nucleo-capside all'interno della cellula. Il virus HIV-1 infetta principalmente i linfociti *T-helper* ma anche cellule non linfoidi, come i macrofagi, le cellule dendritiche, le cellule microgliali e varie cellule endoteliali ed epiteliali. Una volta entrato nella cellula, avviene lo scapsidamento nel citoplasma e la trascrittasi inversa trascrive l'RNA virale in DNA a doppio filamento. Dopo la trascrizione inversa, il DNA virale insieme all'IN e a proteine cellulari forma il complesso di pre-integrazione (PIC) che viene attivamente trasportato attraverso la membrana nucleare (Maillot et al., 2013, Ao Z et al., 2010). A questo punto, il DNA virale viene integrato in siti casuali nel genoma della cellula infettata grazie all'azione dell'IN (Marquet et al., 1991). Il promotore della trascrizione del virus è localizzato nella sequenza LTR all'estremità 5' e la trascrizione dei geni virali avviene ad opera dell'enzima cellulare RNA polimerasi II ed è potenziata dall'espressione della proteina virale Tat. In seguito alla trascrizione, gli RNA messaggeri (mRNA), sono esportati nel citoplasma e tradotti nelle proteine necessarie per la formazione del virione infettivo. Una volta che le subunità sono assemblate a livello della superficie interna della membrana cellulare, le particelle virali cominciano a gemmare e ad essere rilasciate all'esterno provocando la morte della cellula.

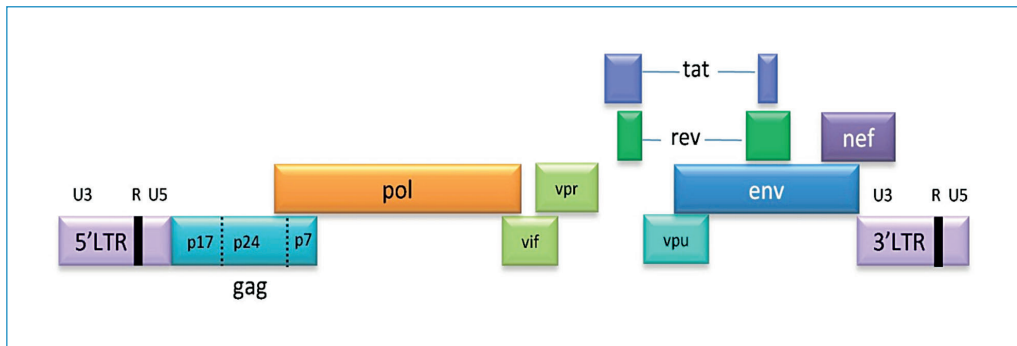
5. Costruzione di vettori lentivirali derivanti da HIV-1 e miglioramento della sicurezza biologica

Proprio per la nota patogenicità di HIV-1, uno sforzo considerevole è stato dedicato al disegno di VL con elevate caratteristiche di sicurezza biologica, considerate le numerose applicazioni di tali vettori. L'uso dei VL, infatti, non è limitato ad applicazioni di terapia cellulare ma si è esteso a ricerche nel campo della funzionalità geni-

ca tramite *knock-down* genetico, basato sull'uso di RNA interferenti in cellule di mammifero.

Come detto precedentemente, oltre ai geni strutturali *gag*, *pol* ed *env*, comuni a tutti i retrovirus, HIV-1 contiene due geni regolatori, *tat* e *rev*, che agendo in *cis* su due sequenze di RNA presenti nel genoma virale (le sequenze TAR e RRE), risultano essenziali per la replicazione virale, e quattro geni accessori, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, che non sono necessari per la replicazione *in vitro* ma sono critici per la replicazione e la patogenesi *in vivo*. Il genoma lentivirale è fiancheggiato da due sequenze nucleotidiche, dette *long terminal repeats* (LTR), che hanno un ruolo fondamentale nella replicazione virale e nella trascrizione dei geni virali (Figura 4).

Figura 4. Rappresentazione schematica del genoma HIV-1



Note: Il genoma virale codifica per le proteine strutturali (*gag*, *pol*, *env*), regolatorie (*rev* e *tat*), e accessorie (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*). I geni sono fiancheggiati dalle LTRs.

Nella costruzione di un vettore lentivirale tutti gli elementi in *cis*, necessari per l'incapsidamento, retrotrascrizione ed integrazione del genoma virale sono mantenuti, mentre il controllo dell'espressione del vettore può essere diretto dal LTR o assegnato ad un promotore esogeno inserito nel vettore; i geni *gag*, *pol* ed *env* sono invece rimossi ed i loro prodotti sono forniti *in trans* attraverso l'uso di più plasmidi o con l'utilizzo di cellule *helper* ingegnerizzate (*packaging cells*) in grado di esprimere le proteine virali necessarie alla formazione della particella virale. Il genoma virale viene suddiviso in tre o quattro differenti plasmidi: un plasmide *packaging*, che fornisce *in trans* i prodotti dei geni di HIV-1 *gag*, *pol* e *rev* necessari alla produzione delle particelle, ma manca di tutte le sequenze *cis*-agenti necessarie alla incapsidazione, retrotrascrizione ed integrazione; un plasmide *envelope*, che fornisce un gene *env* eterologo non derivante da HIV-1 e che serve ad aumentare il tropismo del vettore; un plasmide *transfer*, contenente il materiale genetico che dovrà essere espresso nella cellula bersaglio, tutte le sequenze *cis*-agenti, necessarie per la retrotrascrizione del genoma virale (PBS, *primer binding site*), per la trascrizione del transgene (sequenze LTR del genoma virale o promotore esogeno) per l'integrazione (sequenze terminali dei LTR) e della sequenza di impacchettamento ψ (*psi*), necessaria per la produ-

zione delle particelle lentivirali. Questa sequenza è utilizzata per incapsidare il genoma nel virione e quindi produrre il VL che non avrà la capacità di replicarsi nella cellula ospite, poichè non contiene i geni necessari alla replicazione. Nei vettori di ultima generazione il gene *rev* viene prodotto da un quarto plasmide.

Questo tipo di strategia, che prevede l'impiego di più plasmidi, è necessaria per aumentare la sicurezza del vettore poiché diminuisce il rischio di un eventuale evento di ricombinazione che potrebbe ricostituire un genoma replicazione-competente (Chong et al., 1998). È inoltre possibile modificare lo spettro d'ospite del virus fornendo una proteina dell'*envelope* eterologa nella particella virale, come, ad esempio, la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), il cui recettore è stato recentemente individuato nel recettore delle LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Finkelshtein et al., 2013). Inoltre, la VSV-G rende più stabile la particella lentivirale rispetto all'*envelope* del virus, permettendo di aumentare la quantità di vettore prodotto. Un'ulteriore garanzia di sicurezza è rappresentata dall'utilizzo di vettori di tipo *self-inactivating* (SIN) nei quali nella regione U3 dell'LTR in 3' vengono deleti sia la TATA box sia i siti di legame per i fattori di trascrizione cellulari, mantenendo solamente i circa 30 nucleotidi terminali necessari per l'integrazione nel genoma della cellula bersaglio. Poiché durante la retrotrascrizione l'U3 deleta al 3' fa da stampo per generare l'LTR al 5', il DNA provirale così sintetizzato ha entrambe le LTR inattive e una volta avvenuto il *gene delivery* non è più in grado di affrontare un altro ciclo di replicazione. L'impiego di vettori SIN diminuisce anche il rischio di indurre mutagenesi inserzionale per l'attivazione di proto-oncogeni cellulari che, in seguito all'inserzione, si vengono a trovare a valle dell'LTR in quanto la delezione in U3 rende, appunto, le LTR inattive. Nei vettori SIN la trascrizione del transgene è necessariamente diretta da un promotore esogeno inserito all'interno del vettore.

5.1 Vettori lentivirali di prima generazione

Per minimizzare la probabilità di produrre particelle replicazione competenti (RCLs, *replication competent viruses*), sono state sviluppate diverse generazioni di vettori lentivirali.

I vettori lentivirali di prima generazione sono quei vettori che dividono il sistema in tre differenti plasmidi.

I vettori vengono quindi prodotti a partire da tre elementi separati:

- I) Un costrutto *packaging* (*Packaging plasmid*) esprimenti tutti i geni di HIV-1 *Gag-pol*, *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpr* e *Vpu*. Le sequenze LTR e la sequenza di impacchettamento ψ sono delete e l'ORF di *Env* è bloccata. L'espressione del plasmide è guidata dal promotore del Citomegalovirus CMV, che sostituisce la LTR all'estremità 5'. La LTR al 3' è invece rimpiazzata dal segnale di poliadenilazione del gene dell'insulina. Questo plasmide risulta quindi privo delle sequenze *cis*-agenti richieste per l'impacchettamento (ψ), per la retrotrascrizione (PBS) e per l'integrazione (LTR).
- II) Un costrutto *envelope* (*envelope plasmid*) esprime una glicoproteina eterologa virale, quale la VSV-G, in modo tale da ottenere particelle virali che presentano un recettore di membrana ubiquitario.

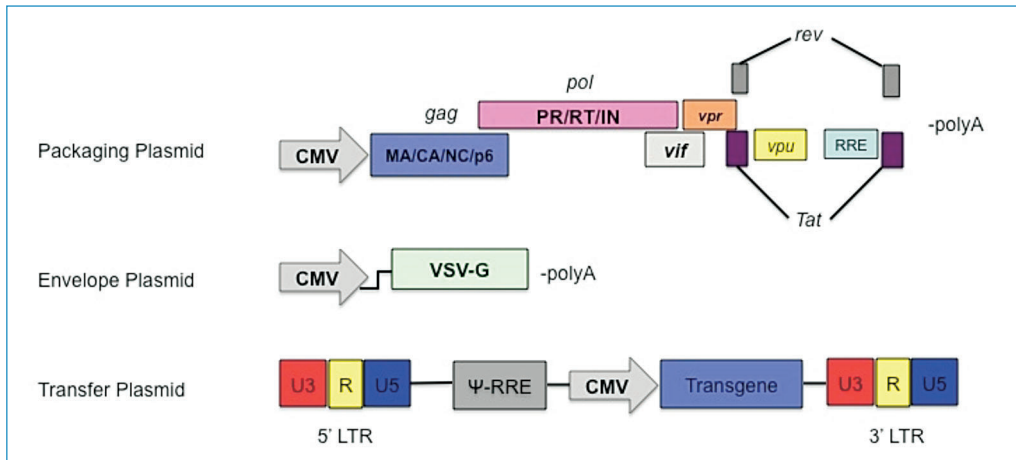
III) Un costrutto di trasferimento (*transfer plasmid*) contenente il transgene e gli elementi *in cis* necessari alla formazione delle particelle (sequenza di impacchettamento ψ), alla trascrizione inversa del genoma virale e alla sua integrazione (LTRs, ψ , RRE), ma non esprime alcuna delle proteine virali di HIV-1. Il transgene d'interesse viene posto sotto controllo di uno specifico promotore interno.

La trascrizione ed il trasporto nel citoplasma degli RNA virali possono quindi verificarsi in presenza di Tat e Rev, che vengono fornite *in trans* dal vettore di impacchettamento alle cellule che producono le particelle virali, e sono dunque assenti nelle cellule trasdotte.

Questo sistema a tre plasmidi permette l'espressione di un gene di interesse, senza che vengano espresse proteine virali nella cellula target.

In termini di sicurezza, questi vettori di prima generazione sono difettivi per la replicazione. La possibilità che si formino virus RCLs è bassa poiché implicherebbe la necessità di due eventi di ricombinazione fra i tre plasmidi. Inoltre l'utilizzo del gene codificante la proteina VSV-G riduce ulteriormente la probabilità di un evento di ricombinazione, in quanto elimina sequenze omologhe fra il costrutto *envelope* ed il costrutto di trasferimento.

Figura 5. Vettori lentivirali di prima generazione



Note: Tutte le proteine virali, tranne Env, sono contenute in un unico plasmide di impacchettamento.

5.2 Vettori lentivirali di seconda generazione

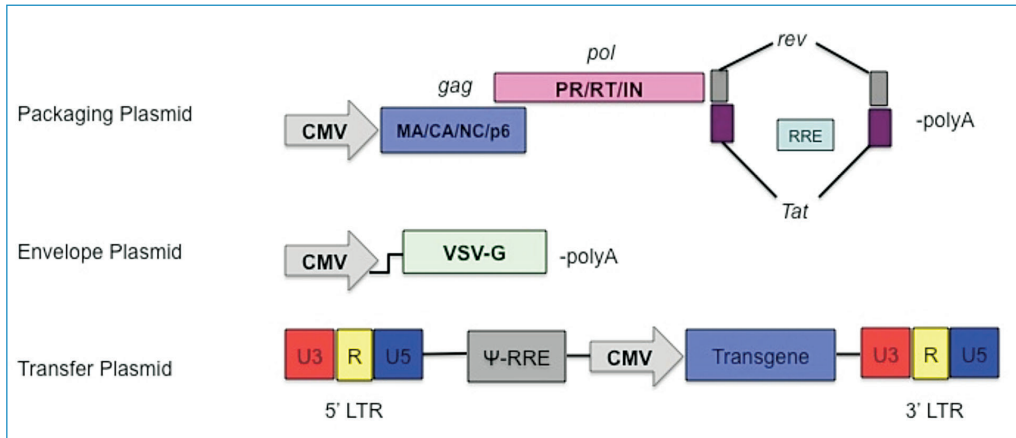
Nonostante la possibilità bassa che si possano formare particelle RCLs a partire dai vettori lentivirali di prima generazione, la probabilità deve comunque essere tenuta in considerazione. Infatti le proteine accessorie di HIV-1 sono essenziali per la propagazione del virus in cellule primarie, ma possono tuttavia essere delete senza che diano gravi effetti alla replicazione virale.

I vettori lentivirali di seconda generazione sono stati ideati in modo tale da contenere solo 4 dei 9 geni di HIV-1: Zufferey e Kim hanno descritto costrutti di impacchettamento privati di *Vif*, *Vpr*, *Vpu* e *Nef* (Zufferey et al., 1997, Kim et al., 1998). I virus così prodotti mantengono la capacità di trasdurre linee cellulari quiescenti e colture primarie differenziate, nonostante la mancanza di proteine accessorie.

La possibilità di eliminare tali geni si spiega nel ruolo che queste proteine hanno all'interno del ciclo infettivo di HIV-1. I linfociti sono, ad esempio, resistenti alla replicazione di virus HIV-1 difettivi di *Vif* (Gillick et al., 2013). Quest'ultimo, infatti, è necessario per l'assemblaggio della particella virale in cellule a fenotipo non permissivo, mentre le cellule 293 in cui vengono prodotti i vettori sono a fenotipo permissivo. *Vpu*, invece, regola negativamente l'espressione del CD4 per impedire l'interazione con Env di HIV-1. I vettori possiedono però una proteina dell'involucro eterologa e le cellule 293 non esprimono il recettore CD4. Come per *Vpu*, l'attività di *Nef* non è necessaria per il funzionamento del sistema. *Nef* influisce anche sulle capacità infettive dei virioni di HIV-1, ma i vettori sono pseudotipizzati con VSV-G e quindi il meccanismo di entrata della particella può fare a meno di *Nef* (Aiken, 1997).

Anche se necessarie al virus HIV-1 per la sua patogenicità, le proteine accessorie sono superflue per la produzione di vettori lentivirali. Dal punto di vista del rischio biologico, anche nel caso in cui si verificano più eventi di ricombinazione, le proprietà del virus parentale non possono comunque ricostituirsi.

Figura 6. Nei vettori lentivirali di seconda generazione tutte le proteine accessorie sono escluse dal vettore di packaging



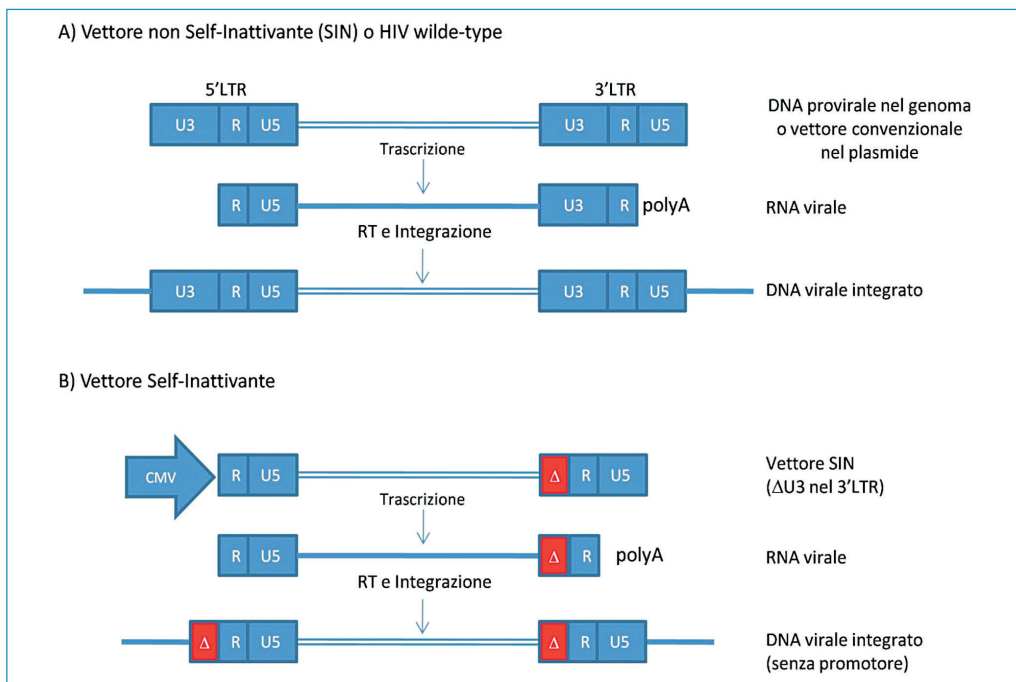
Note: La glicoproteina e il transgene sono forniti da plasmidi differenti.

5.3 Vettori lentivirali di terza generazione e “vettori auto-inattivanti”

Convenzionalmente, i vettori lentivirali di prima e seconda generazione integrano il transgene all'interno del genoma della cellula ospite. In circostanze normali questo evento non dovrebbe avere delle conseguenze. Il vettore di trasferimento mantiene la capa-

cità di trascrivere tutto l'RNA virale dopo l'integrazione nella cellula bersaglio. Esiste però la possibilità che possa essere mobilizzato da un virus, per esempio, in presenza di una co-infezione con virus HIV-1. Potrebbe, inoltre, verificarsi l'attivazione indesiderata di geni cellulari adiacenti al sito di integrazione ad opera della LTR all'estremità 3'. Le LTR, infatti, presentano degli enhancer al loro interno (siti di legame per fattori di trascrizione dell'ospite fra cui Sp1, *specificity protein 1*, e NFkB, *nuclear factor kB*) e regioni promotore per la trascrizione. L'integrazione delle LTRs all'interno del genoma potrebbe, quindi, portare all'attivazione di geni cellulari, fra cui anche oncogeni. Va però rilevato che le LTR lentivirali, a differenza di quelle tipiche dei gamma-retrovirus non contengono sequenze *enhancer/promoter* molto potenti e che la trascrizione è potenziata dall'azione della proteina virale Tat. In assenza di Tat, come avviene dopo l'integrazione del vettore, la trascrizione a partire da queste LTR è moderata. Per superare del tutto i possibili rischi associati alla mobilizzazione del vettore e alla residua attività trascrizionale delle LTR e questi problemi, sono stati sviluppati vettori lentivirali auto inattivanti (SIN) (Figura 7).

Figura 7. Rappresentazione schematica dei vettori HIV e dei provirus integrati



Note: **A)** Vettori Non-SIN o virus HIV *wild-type* contengono LTRs sia alle estremità 3' che 5'. Il DNA integrato contiene un elemento in *cis* (come ad esempio la TATA-box o elementi di legame per fattori di trascrizione cellulari) nell'LTR che potrebbe portare all'attivazione di oncogeni cellulari dopo integrazione. **B)** Nel vettore SIN, la regione al 5' LTR U3 è sostituita da un promotore CMV e la regione U3 al 3' LTR, che contiene l'elemento in *cis*, è parzialmente deleta. Come risultato, il trascritto virale non contiene una sequenza U3 completa, riducendo la probabilità di formazione di virus RCLs.

Un genoma di un vettore standard è fiancheggiato da due LTR, ciascuna contenente tre regioni: la regione U3, che agisce come *enhancer*/promotore; la regione R al 3' LTR che agisce come segnale di poliadenilazione e la regione U5. Gli elementi 5' U3 e il 3' U5 non sono presenti negli mRNA provirali, mentre la regione R si trova ad entrambe le estremità. La duplicazione delle LTR avviene durante la trascrizione inversa, prima dell'integrazione nel genoma della cellula ospite, in modo tale che la regione U3 al 3' LTR venga copiata e trasferita al 5' LTR, quindi tramite la delezione al 3' LTR, che comprende le regioni TATA-box, Sp1, NF-kB e NFAT, si ottiene l'inattivazione trascrizionale dei genomi virali nelle cellule trasdotte.

Queste modificazioni hanno ridotto le probabilità di:

- produzione e propagazione di RCL;
- attivazione inserzionale di oncogeni cellulari dovuta all'attività residua dei promotori/*enhancer* contenuti nelle LTR virali;
- mobilitazione dei vettori integrati da parte di virus *wild-type*;
- interferenza trascrizionale dovuta alle LTR.

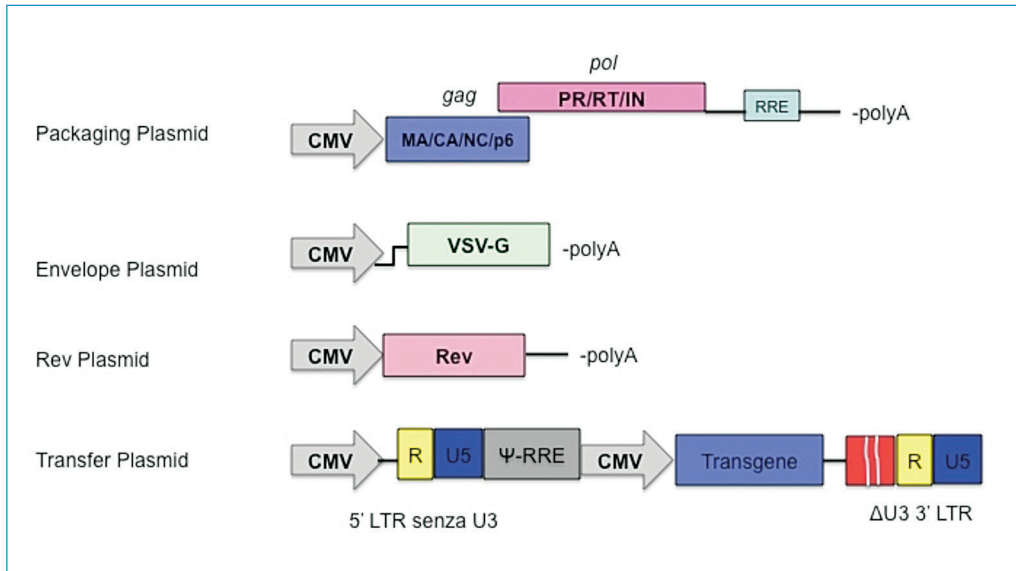
Inoltre, a differenza delle proteine accessorie, le proteine regolatorie Tat e Rev sono indispensabili alla replicazione virale. I vettori lentivirali di terza generazione sono stati ideati in modo tale da essere Tat indipendenti, con la proteina Rev fornita da un plasmide separato (Figura 8).

L'indipendenza da Tat è ottenuta sostituendo la regione promotore U3 al 5' LTR del vettore transfer con regioni di forti promotori virali, quali CMV o RSV (Rous Sarcoma Virus).

I quattro plasmidi sfruttati per produrre i vettori lentivirali di terza generazione sono:

- I) Costrutto *packaging* contenente i geni *gag* e *pol*;
- II) Un plasmide esprime la proteina Rev;
- III) Un plasmide *envelope* esprime la proteina VSV-G;
- IV) Un plasmide di trasferimento contenente il transgene sotto controllo di un promotore eterologo interno e con delezione delle sequenze *enhancer*/promotore della regione U3 della 3' LTR per conferire proprietà autoinattivanti.

La biosicurezza di questi vettori è notevolmente aumentata dal fatto che contengono solo tre dei nove geni di HIV-1, dalla necessità di avere almeno tre eventi di ricombinazione per generare virus RCL e dall'assenza della proteina transattivante Tat.

Figura 8. Vettori lentivirali di terza generazione

Note: La proteina Rev è codificata da un plasmide differente.

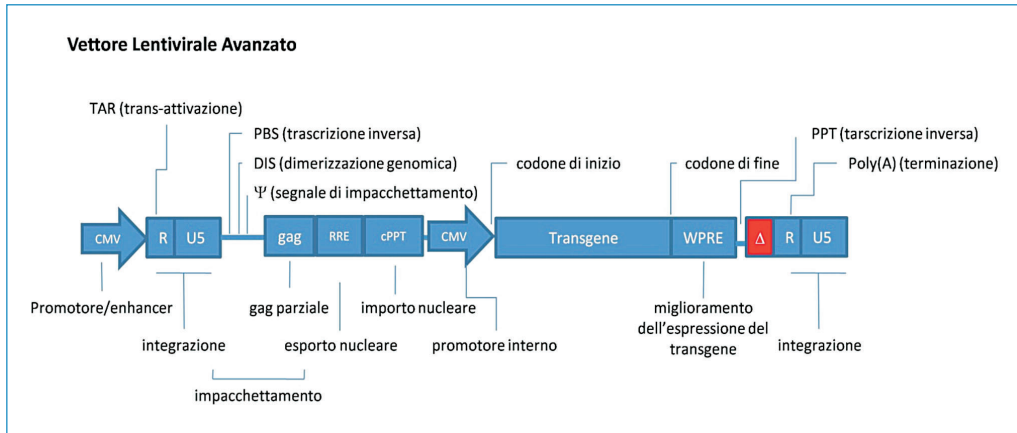
5.4 Ulteriori miglioramenti

Oltre a cercare di minimizzare il rischio biologico derivante dall'utilizzo dei vettori lentivirali, sono state effettuate varie modifiche per ottimizzare l'efficienza del trasferimento genico ed il livello di espressione nelle cellule bersaglio (Figura 9).

Una di queste modifiche riguarda l'inserzione di un elemento di regolazione post-trascrizionale del virus dell'epatite della marmotta nord-americana (*WPRE*, *Woodchuck Hepatitis Virus Post transcriptional Regulatory Element*). *WPRE* aumenta l'espressione degli mRNA che non hanno subito processo di splicing, sia nel compartimento nucleare che citosolico (Escarpe et al., 2003, Zufferey et al., 1999), migliorando l'espressione del transgene nelle cellule target.

L'utilizzo della sequenza *WPRE* potrebbe sollevare problemi riguardo la biosicurezza, in quanto la sequenza genica contiene una forma troncata del gene *WHX*, implicato nel cancro del fegato in animali (Kingsman et al., 2005). La sequenza è stata dunque ulteriormente modificata introducendo una mutazione nell'ORF del gene *X* (Zanta-Boussif et al., 2009).

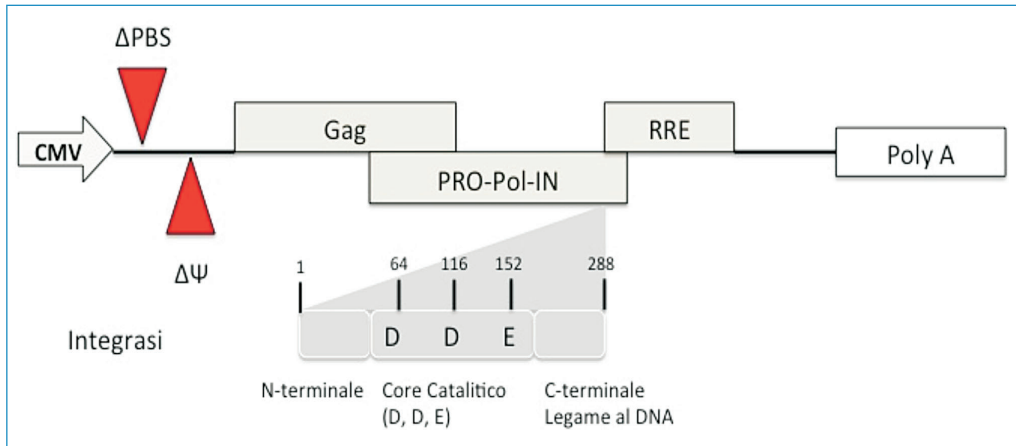
Un secondo miglioramento è avvenuto con l'inserimento nel plasmide di trasferimento del tratto centrale polipurinico (cPPT) derivante dal genoma di HIV-1. Nel gene *pol* esiste questo elemento di 118 nucleotidi che è implicato nel trasporto nucleare del PIC di HIV-1 (Zennou et al., 2000). Quando nei vettori SIN è stata inserita questa sequenza, l'efficienza di trasduzione è notevolmente aumentata, indicando che l'importo nucleare è una fase limitante nella trasduzione (Follenzi et al., 2000).

Figura 9. Vettore lentivirale avanzato

Note: Per aumentare l'espressione del transgene nelle cellule è stato inserito il WPRE, mentre il cPPT, implicato nel trasporto del PIC, aumenta l'efficienza di trasduzione dei vettori SIN.

5.5 Vettori lentivirali Integrasi Difettivi (IDLV)

Il miglioramento della sicurezza resta un punto chiave, nello sviluppo di vettori lentivirali che possano essere utilizzati anche in ambiti diversi da quelli della terapia genica. Lo sviluppo di leucemia in bambini trattati per l'immunodeficienza severa combinata *X-linked* (X-SCID) in seguito a terapia genica mediata da retrovirus (Hacein-Bey-Abina et al., 2003) ha richiesto una valutazione approfondita delle possibili conseguenze, dovute all'integrazione dei transgeni, inizialmente considerate un vantaggio. Anche se le ultime generazioni dei vettori lentivirali riducono notevolmente il rischio di mutagenesi inserzionale, la soluzione migliore potrebbe essere utilizzare vettori integrasi difettivi (IDLV). In questi vettori, il gene dell'integrasi e/o il sito di legame nelle LTRs è modificato, in modo tale da renderlo difettivo e, impedendone l'integrazione, si ridurrebbe il rischio di mutagenesi inserzionale (Figura 10). Il loro sviluppo è avvenuto in seguito all'osservazione che durante il normale ciclo di infezione del virus HIV-1, oltre al DNA virale integrato nel genoma, si ritrovano delle forme di DNA extracromosomali a doppio filamento (E-DNA) (Cara e Reitz, 1997, Sharkey et al., 2001), che si accumulano nelle cellule infettate. Gli E-DNA possono contenere una o due sequenze LTR, generando quindi, circoli 1-LTR, prodotti per ricombinazione omologa tra le due sequenze LTR e circoli con 2-LTR, prodotti per congiunzione testa-coda delle due sequenze LTR (Cara e Reitz, 1997).

Figura 10. Packaging Plasmid nei vettori IDLV

Note: Tutte le sequenze codificanti per proteine non necessarie sono state rimosse. La proteina integrasi (IN) è modificata per evitare l'integrazione del vettore nel genoma cellulare.

Negli ultimi anni, inoltre, è stato dimostrato che gli E-DNA sono trascrizionalmente attivi, suggerendo un loro possibile impiego nella terapia genica (Cara e Klotman, 2006, Philippe et al., 2006). Nei vettori IDLV, l'assenza d'integrazione può essere ottenuta facilmente, introducendo una mutazione nel sito catalitico dell'integrasi, in uno qualsiasi dei seguenti aminoacidi D64, D116 e E152 presenti nel gene codificante la proteina o nel sito di riconoscimento *att* nella regione U3 dell'LTR (Wanisch e Yáñez-Muñoz, 2009). Diversamente dai vettori integranti, gli IDLV sono instabili all'interno delle cellule in divisione, incluse le cellule T, le cellule B e le cellule tumorali (Sharkey et al., 2005). Questo è dovuto alla mancanza di un sito di origine della replicazione, che ne permetta il mantenimento nelle successive divisioni cellulari; di conseguenza, l'espressione è transiente e dura solo per alcuni giorni; l'E-DNA è, infatti, perso quando la cellula si divide. Tuttavia, alcuni studi recenti hanno dimostrato che l'inclusione di un sito eterologo di origine della replicazione nell'E-DNA ne permette il mantenimento in forma episomale anche in cellule in divisione (Vargas et al., 2004). Gli IDLV risultano, però, altamente stabili in cellule non in divisione, quali le cellule presentanti l'antigene (APC), come macrofagi e cellule dendritiche, o in altri tipi cellulari quali neuroni, miociti ed epatociti. Infatti l'utilizzo *in vivo* dei vettori IDLV in modelli animali, ha dimostrato il permanere dell'espressione del transgene in cellule differenziate fino ad un anno dall'inoculazione (Yanez-Munoz et al., 2006, Bayer et al., 2008), rendendo il loro utilizzo vantaggioso a fini vaccinali. È stato, infatti, dimostrato, *in vivo* nel modello murino, che una singola iniezione intramuscolare di IDLV è sufficiente per stimolare una risposta cellulare ed umorale specifica e duratura (Negri et al., 2007, Michelini et al., 2009).

Attualmente, gli IDLV vengono impiegati in diversi studi preclinici per lo sviluppo di terapie vaccinali innovative contro antigeni tumorali e non (Tabella 2).

Tabella 2. Attuale impiego degli IDLV in studi preclinici per scopi vaccinali

Tipi di Impiego	Antigene	Modello Murino	Via di Somministrazione	Challenge	Bibliografia
Malattie Infettive	HIV (Env)	Balb/C	Intramuscolo	No	(Negri, 2007; Negri, 2010; Negri, 2012)
	HIV (Gag)	Balb/C	Sottocute	No	(Hu, 2010)
	Virus West Nile (Env)	C57BL/6	Intraperitoneale	Si	(Coutant ,2008)
	Proteina circumsporozoite del Plasmodium yoelii (Py CSP)	Balb/C	Intraperitoneale Intramuscolo	Si No	(Coutant, 2012)
	HCV (NS3)	Balb/C	Intramuscolo	No	(Deng, 2013)
	HBV (HBsAg)	Balb/C	Intramuscolo	No	(Karwacz, 2009)
Tumori	HPV (E7)	C57BL/6	Intramuscolo	Si	(Grasso, 2013)
	Antigene del Melanoma (hgp100)	C57BL/6	Sottocute	No	(Hu, 2010)
	Ovalbumina(OVA)	C57BL/6	Sottocute	Si	(Karwacz, 2009; Hu, 2009)
Altro	Proteina fluorescente verde (GFP)*	Balb/C	Intramuscolo	No	(Michellini, 2009)

* Vettore basato su SIV

6. Identificazione dei pericoli associati all'utilizzo dei vettori lentivirali

I VL sono considerati virus ricombinanti ed il loro utilizzo o l'uso di cellule trasdotte con essi è regolamentato da norme e Linee Guida specifiche che mirano a: i) proteggere i lavoratori da un eventuale rischio di esposizione nell'ambiente di lavoro (WHO, 2004; Directive 2000/54/EC; OSHA (US)); ii) regolamentare la costruzione, la manipolazione o il rilascio deliberato di organismi o microrganismi geneticamente modificati, o organismi contenenti DNA ricombinante nell'ambiente (Directive 98/81/EC; Directive 2001/18/EC; Food and Drug Administration (FDA); NIH (2006)); e iii) assicurare la sicurezza di prodotti biofarmaceutici e di medicinali rilasciati per utilizzo umano o veterinario, che beneficiano dei VL o di cellule trasdotte con VL per

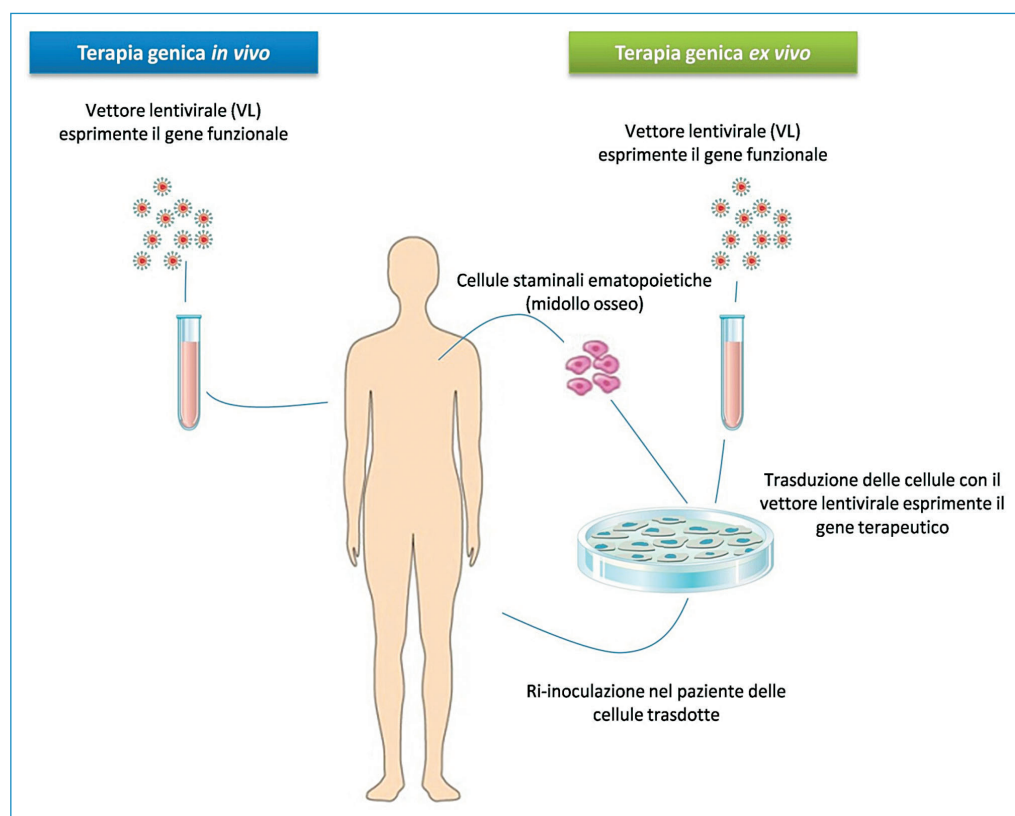
svolgere il loro effetto terapeutico (FDA); European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA); Regulation (EC) No 726/2004).

La maggior parte dei possibili effetti avversi attribuibili ai vettori lentivirali sono in realtà comuni a tutti i vettori retrovirali, in quanto i VL presentano lo stesso ciclo replicativo dei retrovirus, basato sull'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite. Uno dei principali pericoli che deve essere considerato è la potenziale generazione e propagazione di lentivirus replicazione-competenti (RCL) durante la produzione del vettore. Si pensa che la produzione di RCL avvenga per ricombinazione omologa tra sequenze sovrapposte. Tuttavia, fino ad oggi, non si sono avuti eventi di RCL per quanto riguarda il sistema di impacchettamento (*packaging*) dei vettori lentivirali. Questo potrebbe dipendere dal disegno avanzato del vettore, come discusso prima e dal comune utilizzo di vettori autoinattivanti (SIN) che riducono ulteriormente la probabilità di produrre RCL. Un altro evento comune a tutti i retrovirus è l'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite che è associato al rischio di mutagenesi inserzionale e/o alla trans-attivazione di geni adiacenti al sito di integrazione. Contrariamente a quanto si pensava finora, l'integrazione del genoma retrovirale nel genoma della cellula ospite non è un evento del tutto casuale. Studi recenti hanno dimostrato che sia l'integrazione dei γ -retrovirus che dei lentivirus avviene preferenzialmente in prossimità o all'interno, rispettivamente, di geni trascrizionalmente attivi (Han, 2004; Liu, 2006; Schröder, 2002; Vincent, 1990; Wellensiek, 2009; Wu, 2003). In diversi studi, alcuni eventi avversi, fra cui lo sviluppo di tumori, sono avvenuti in seguito all'integrazione del retrovirus nel genoma della cellula ospite. Un esempio è l'attivazione trascrizionale del gene LMO2 (un protooncogene) dovuta all'enhancer presente all'interno delle LTR, dopo integrazione del vettore γ -retrovirale, che ha portato allo sviluppo di leucemia nei cinque pazienti trattati con terapia genica per l'Immunodeficienza Severa Combinata legata al cromosoma X (X-SCID) in due differenti *clinical trials* (Hacein Bey Abina, 2003; Hacein-Bey-Abina, 2008; Howe, 2008).

Studi *in vivo* di genotossicità sul modello murino, hanno evidenziato un minore rischio di oncogenesi da parte dei vettori lentivirali rispetto ai vettori retrovirali di prima generazione (Montini, 2009). Queste differenze sarebbero dovute alla natura auto-inattivante delle LTR e alle diverse preferenze di integrazione. Infatti, i vettori γ -retrovirali tendono ad integrarsi in prossimità dei promotori dei geni espressi e se dotati di LTR intatte hanno elevata propensione ad attivare i geni che si trovano a valle del sito di integrazione. Come conseguenza si nota spesso l'arricchimento e l'espansione *in vivo* di cellule con integrazione di γ -retrovirus vicino a geni a rischio quali proto-oncogeni, geni associati a cancro e geni che controllano la crescita cellulare. I vettori lentivirali propendono invece per integrarsi nel corpo dei geni e grazie anche alle LTR inattivate hanno scarsa tendenza ad attivare i geni vicino all'inserzione. Recentemente, infatti, tramite terapia genica *ex vivo*, (Biffi, 2013; Aiuti, 2013) hanno dato nuove speranze ai bambini affetti da leucodistrofia metacromatica (MLD) e dalla sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS), entrambe dovute ad un difetto genico che ha come risultante la mancata funzione di proteine essenziali nei primi

anni di vita. In questi casi, dopo l'espianto del midollo osseo dal paziente le cellule staminali ematopoietiche sono state trasdotte con VL esprimenti il gene funzionale e re-impiantate nel paziente (Figura 11). In entrambi i trial clinici iniziati nel 2010, l'analisi dei siti di inserzione del VL nelle cellule ematopoietiche non ha evidenziato arricchimento o accumulo di integrazioni in geni a rischio e non sono stati documentati eventi avversi.

Figura 11. Rappresentazione schematica di terapia genica



Se tale caratteristica è a sostegno della maggiore sicurezza biologica dei VL rispetto ad altri vettori virali, tuttavia la loro propensione ad integrarsi nel corpo di geni trascrizionalmente attivi può comunque causare genotossicità in termini di perdita di eterozigosi o di inattivazione di geni soppressori del tumore (Bokhoven, 2009). Studi *in vitro* suggeriscono, inoltre, che la presenza di elementi promotore-*enhancer* con forte attività trascrizionale all'interno del vettore può comunque portare all'attivazione a distanza di proto-oncogeni vicino al sito di integrazione e quindi rappresentare un meccanismo potenziale trasformante legato all'integrazione dei VL (Modlich *et al*, 2009; Modlich e Baum, 2009).

Un altro evento indesiderato, da tenere in considerazione nell'uso dei VL, è la possibile mobilitazione del vettore e la sua diffusione a cellule o tessuti precedentemente non trasdotti. La mobilitazione può avvenire in vettori che mantengono intatte le loro LTR quando le proteine necessarie per l'impacchettamento vengono fornite *in trans* da un altro lentivirus infettante, similmente a quello che avviene durante l'infezione con HIV-1 o con altri lentivirus *wild-type*.

7. Valutazione del rischio nelle attività di laboratorio che prevedono l'uso di vettori lentivirali

Oltre alla identificazione dei pericoli intrinseci al VL, la valutazione del rischio deve considerare le condizioni di manipolazione dei vettori stessi. Le procedure di laboratorio più tipiche comprendono: (1) la manipolazione di culture cellulari trasdotte da VL, (2) la manipolazione di sospensioni di VL, (3) la sperimentazione *in vivo* che coinvolge animali da laboratorio inoculati con sospensioni di VL o cellule trasdotte da VL e (4) la preparazione del vettore stesso.

Il rischio di esposizione deve essere identificato per ogni procedura facendo particolare attenzione alla potenziale contaminazione accidentale dell'ospite durante esperimenti *in vivo* o alla presenza di sequenze retrovirali endogene potenzialmente presenti in culture cellulari non stabilizzate.

8. Manipolazione di culture cellulari trasdotte da VL

Le cellule animali hanno una limitata capacità di sopravvivenza se non sono mantenute in condizioni di coltura adeguate. Di conseguenza, il principale pericolo connesso con la manipolazione *in vitro* delle cellule trasdotte è la possibile inoculazione accidentale dell'operatore di laboratorio. L'integrazione del VL nel genoma cellulare, che è associata al rischio di mutagenesi inserzionale o la transattivazione di geni adiacenti, nonché all'espressione stabile di transgeni pericolosi, può potenzialmente conferire un'aumentata capacità di sopravvivenza alla cellula trasdotta con il rischio di formazione di tumori od altri effetti nocivi. Tuttavia, l'impatto reale di questi putativi effetti nocivi di cellule infettate con VL, accidentalmente inoculate in un organismo ospite, è difficile da prevedere. La differenza tra il complesso di istocompatibilità della cellula inoculata e dell'ospite risulta l'ostacolo maggiore alla sopravvivenza ed all'espansione della cellula inoculata accidentalmente, dato che esse saranno continuamente sotto la pressione selettiva del sistema immunitario dell'ospite, qualora quest'ultimo non sia immunocompromesso. Questa è anche la ragione per cui la derivazione di culture cellulari derivanti dall'operatore di laboratorio dovrebbe essere assolutamente proibita.

9. Manipolazione di sospensioni di VL

La manipolazione di sospensioni di VL, in particolare preparazioni ad alto titolo, aumenta la probabilità di esposizione accidentale dell'operatore ed è quindi da considerare un'attività ad alto rischio. Il maggior pericolo espositivo consiste nella inoculazione accidentale dell'operatore, ad esempio tramite puntura con ago, dal momento che in questo caso il VL può potenzialmente integrarsi nel genoma dell'ospite. Questo potrebbe produrre un rischio, non solo associato alla mutagenesi inserzionale o all'attivazione o inattivazione di geni ma potrebbe condurre all'espressione permanente del transgene con potenziali effetti dannosi a seconda della natura dello stesso. Nel caso di esposizione accidentale a dosi limitate di VL di ultima generazione il rischio di mutagenesi inserzionale è basso, in quanto tale rischio è proporzionale alla dose totale di integrazioni somministrata e va commisurato agli esiti finora positivi dal punto di vista della sicurezza di sperimentazioni cliniche in cui vengono somministrate alte dosi di vettore o cellule trasdotte. Maggior considerazione andrà invece al rischio legato all'eventuale espressione del transgene nelle cellule dell'operatore. Benché non sia possibile scendere nel dettaglio di tutti i possibili rischi derivanti dai transgeni potenzialmente pericolosi usati nei vari laboratori, questo è un elemento che deve essere attentamente valutato. Alcune classi specifiche di geni, quali oncogeni, geni codificanti per citochine o geni legati a virulenza, hanno una intrinseca associazione con un elevato rischio. Di recente i VL sono stati usati estensivamente per introdurre, sia in animali che in cellule, cassette con brevi RNA a forcina (*small hairpin* RNA, shRNA) per diminuire l'espressione di geni specifici. Anche in questo caso il rischio si considera particolarmente elevato se l'shRNA è disegnato per diminuire l'espressione di geni soppressori di tumore. Quindi, data la grande varietà di transgeni o shRNA usati nei laboratori, la valutazione del rischio deve essere necessariamente effettuata caso per caso.

10. Studi *in vivo*

In seguito ad infezione accidentale o intenzionale dell'ospite, nel caso di esperimenti su animali da laboratorio, esiste il rischio di ricombinazione tra eventuali virus selvatici presenti nell'ospite e sequenze presenti nel vettore, con possibili effetti indesiderati. Ad esempio, un recente studio ha mostrato che, in un modello ovino *in vivo*, il trattamento con un vettore retrovirale derivato dal retrovirus MLV, pseudotipizzato con una proteina derivata dal virus della leucemia dei gibboni (GaLV), ricombinava con il virus della leucemia bovina dando luogo ad un retrovirus in grado di infettare ovini e bovini (Van den Broeke, 2003).

L'uso di VL derivati dall'HIV in topi elimina il rischio potenziale della propagazione di RCL, eventualmente prodottisi in seguito a ricombinazione all'interno della cellula d'impacchettamento, dato che i roditori non sono permissivi per l'infezione da HIV. Inoltre, alcuni studi indicano che la presenza accidentale di retrovirus di tipo gamma

nell'ospite difficilmente ha effetti nocivi. In cellule in cultura non si sono osservati fenomeni di trans-impackettamento tra retrovirus di tipo gamma e lentivirus (Naldini, 1996) e, persino in topi transgenici portatori del genoma pro-virale di HIV integrato in ogni cellula del loro corpo, l'analisi per *Southern blot* non ha rilevato la presenza di sequenze provirali libere (Milman, 1990). Uno studio ha valutato la generazione potenziale di lentivirus competenti per la replicazione (RCL) in un contesto sperimentale di xeno-trapianto. Il rischio di potenziali effetti nocivi è stato valutato in 149 topi immunodeficienti trapiantati con cellule staminali ematopoietiche e cellule progenitrici umane (Bauer, 2008). Questo studio ha dimostrato l'assenza di effetti nocivi nonché l'assenza dell'antigene p24 di HIV nel siero degli animali in un periodo di tempo di vari mesi dopo l'inoculazione. Tuttavia, nonostante questi risultati rassicuranti, questo studio sottolinea il fatto che per trarre delle conclusioni definitive è necessario un periodo di osservazione più lungo rispetto a quello di questo limitato studio su modello murino.

Un'attenzione particolare deve essere dedicata a quegli studi che coinvolgono specie permissive per l'infezione da lentivirus dato che in questo caso sussiste un rischio maggiore di mobilitazione o complementazione del VL che, a sua volta, aumenta il rischio di formazione di RCL. Un'altra questione da affrontare è la possibile mobilitazione del vettore in pazienti che, dopo il trattamento di terapia genica con un VL, contraggono l'infezione da HIV.

Sotto questo punto di vista, i vettori lentivirali integrasi difettivi (IDLV), data la loro struttura, risulterebbero più sicuri rispetto ai vettori integrazione competenti (VL) perché meno suscettibili alla eventuale generazione di RCL e alla mobilitazione. Infatti, per la replicazione, il virus HIV ha bisogno che l'enzima Integrasi sia funzionale, di conseguenza gli IDLV non sono in grado di supportare la replicazione innescata da HIV nell'eventualità che un evento di ricombinazione generi RCL. Inoltre, nonostante l'uso di tecniche molto sensibili, nessun evento di formazione di RCL è mai stato riportato neanche per gli VL (Escarpe, 2003; Sastry, 2003; Sastry, 2009). Anche la mobilitazione tramite incapsidazione di trascritti competenti dovuti a super-infezione con virus *wild-type* è altamente improbabile, perché gli E-DNA sono instabili e vengono persi in cellule in divisione, quali i linfociti T. Questo rende gli IDLV significativamente più sicuri rispetto ai vettori lentivirali integranti.

11. Sequenze retrovirali endogene

Un'altra considerazione deve esser fatta a riguardo della potenziale interazione del vettore lentivirale con le sequenze retrovirali endogene (ERV) presenti nella cellula di impackettamento in cui il vettore è prodotto e nella cellula bersaglio della trasduzione con il vettore. Le ERV sono i residui di antiche infezioni della linea germinale con retrovirus esogeni che si sono integrati nel genoma. Alcune di queste sequenze probabilmente si sono spostate e propagate nel genoma dell'ospite per retro-trasposizione. È riconosciuto che alcune ERV sono in grado di interagire con la controparte

esogena, inclusi vettori retrovirali, per mezzo di vari meccanismi, inclusa la transattivazione e la ricombinazione (Chong, 1998; Rasmussen, 1997; Naldini, 1996). È stato dimostrato che delle proteine fornite *in trans* da un'infezione retrovirale possono promuovere la mobilizzazione di retrovirus endogeni di per sé inattivi (Siapati, 2007) o anche che il co-impacchettamento di ERVs può dare luogo al trasferimento indesiderato delle loro sequenze alle cellule bersaglio e alla potenziale ricombinazione con vettori retrovirali o con il genoma cellulare (Mikkelsen, 2000). Le sequenze ERVs costituiscono ben l'8% del genoma umano (Stoye, 2001).

Studi *in vitro* hanno indagato l'incorporazione di ERVs nelle particelle del virus della leucemia murina (MLV) e suggeriscono che il riconoscimento e l'impacchettamento di ERV da parte del meccanismo di assemblaggio di MLV è piuttosto inefficiente (Patience, 1998). Da uno studio recente si evince inoltre che sistemi derivati da LV co-impacchettano le sequenze ERV con una efficienza ancora minore rispetto ai sistemi basati su MLV (Zeilfelder, 2007). Gli autori spiegano questa bassa efficienza con il fatto che non sono presenti ERV affini a sequenze lentivirale mentre le sequenze affini a MLV sono molto numerose. Nonostante questo, alcune sequenze ERV sono riconosciute dalla proteina Rev di HIV in cellule permissive dopo infezione con HIV-1, il che promuove l'esporto dal nucleo dei trascritti ERV in queste cellule (Yang, 1999). Inoltre si possono rilevare degli RNA derivanti da ERV nel plasma di pazienti infetti da HIV-1, dato che è a sostegno dell'ipotesi che esiste ancora una significativa capacità di codifica di proteine e una attività da parte di questi retrovirus endogeni (Dewannieux, 2006; Lee, 2007). La proporzione di ERVs impacchettate in HIV rispetto al rilascio dell'RNA per HIV non è ancora chiara ed è generalmente riconosciuto che diverse forme di stress cellulare possono indurre l'espressione aspecifica di ERVs. Tutti questi dati quindi inducono a pensare di indagare ulteriormente la possibilità che le ERVs possano essere una sorgente di sequenze lentivirali funzionali capaci di ricombinarsi con vettori LV derivati da HIV.

Dalle prime applicazioni cliniche, nelle quali i bersagli di VL sono stati i linfociti T per il trattamento dell'infezione da HIV (mediante espressione di shRNAs anti HIV) o cellule cancerose, il campo della terapia genica tramite VL si è recentemente espanso con sperimentazioni che hanno come bersaglio le cellule ematopoietiche staminali autologhe CD34 per il trattamento di disordini della demielinazione, incluse le emoglobinopatie adenoleucodistrofie legate al cromosoma X o difetti delle cellule staminali come l'anemia falciforme, la talassemia o la sindrome di Wiskott-Aldrich. Il risultato di queste sperimentazioni cliniche a lungo termine fornirà sicuramente indicazioni riguardo l'efficacia e la sicurezza dei VL.

In sintesi, la valutazione dei rischi connessi all'utilizzo di vettori lentivirali deve analizzare i seguenti pericoli:

- la formazione di lentivirus competenti per la replicazione (RCL);
- eventuali effetti dovuti alla natura del transgene;
- la mutagenesi inserzionale;
- la mobilizzazione del vettore.

Gli eventuali rischi dipendono dalla natura del vettore e da quella del transgene codificato.

Per quanto riguarda la formazione di RCL, essa dipenderà dal numero di eventi ricombinatori necessari e dal numero di geni essenziali per la replicazione che sono stati rimossi dal vettore/sistema di *packaging*. I vettori di nuova generazione consentono di considerare trascurabile tale rischio, che però dovrà essere preso in considerazione nel caso fossero ancora in uso sistemi di prima o seconda generazione. Infatti il rischio di produzione di RCL si è notevolmente ridotto grazie allo sviluppo di sistemi di produzione virale più sicuri. I metodi di rilevazione di RCL messi a punto di recente, estremamente sensibili, basati su PCR e culture cellulari, hanno confermato l'assenza di RCL nei grandi lotti di produzione destinati agli studi clinici (Sastry, 2003; Escarpe, 2003).

Relativamente alla natura del transgene va considerato che questo può essere un oncogene o potenzialmente tale, o avere altre caratteristiche potenzialmente nocive (ad es. generazione di risposta autoimmunitaria). In questo caso, la valutazione del rischio dovrà concentrarsi sugli eventi che possono portare il MOGM a contatto con l'operatore, siano essi eventi incidentali che di routine.

Una corretta gestione dei versamenti accidentali, la limitazione dell'uso di aghi e materiale tagliente, il controllo dell'aerosol generato in operazioni quali centrifugazione, sonicazione, ecc., la pulizia ed il controllo della contaminazione di strumenti e superfici di lavoro, sono tutti fattori che contribuiscono alla minimizzazione di tale rischio.

I lentivirus si integrano nel cromosoma ospite per cui possono dare origine a fenomeni di mutagenesi inserzionale, attivando o disattivando geni dell'organismo ospite.

Il recente utilizzo di sistemi di *packaging* che codificano per una proteina eterologa per il capsido (ad es VSV-G), fa sì che il MOGM abbia un elevato tropismo e quindi possa trasdurre cellule di diversi tessuti, aumentando il potenziale rischio. Anche in questo caso si deve operare nel senso del contenimento e della formazione del personale, focalizzandosi sui punti descritti al precedente paragrafo.

Una informazione da tenere presente, è non solo il titolo che si ritrova nel surnatante (valutazione necessaria ai fini dell'esposizione ad aerosol sia in operazioni di laboratorio, sia su larga scala, sia per versamento accidentale), ma anche la quantità di vettore presente nei diversi scenari incidentali e che può entrare in contatto con l'operatore, con personale di servizio e con l'ambiente esterno (ad esempio la quantità di virus nel volume morto dell'ago nel caso di autoinoculazione accidentale).

Discorso a parte merita la valutazione in funzione dell'utilizzo di specie animali da laboratorio trattata nel successivo capitolo.

In ultima istanza, la valutazione di tali rischi deve portare all'assegnazione del livello di contenimento biologico più adeguato alle varie fasi del progetto. Come buona regola pratica, il livello di contenimento più alto stabilito, darà anche la classe di impiego del MOGM, da riportare nella notifica di impiego confinato.

In generale, un livello di contenimento (BSL) pari a 2 (D.Lgs. 81/2008 e s.m.i.), eventualmente rinforzato con l'utilizzo di prassi operative e Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) propri del BSL 3, atti a prevenire e minimizzare l'esposizione delle

mucose ad aerosol, è sufficiente in laboratorio ed anche in operazioni su scala industriale (volumi di coltura superiori a 10 litri). Tuttavia, deve comunque essere completata una valutazione del rischio per ogni MOGM che tenga conto di diversi fattori e che ad ogni esperimento o famiglia di esperimenti sia in grado di associare il più corretto livello di contenimento. In Tabella 3 sono riassunte schematicamente le valutazioni sulla biosicurezza dei VL ed i potenziali livelli di rischio.

Tabella 3. Schema riassuntivo per la valutazione della biosicurezza dei vettori lentivirali ed i corrispondenti livelli di rischio

Valutazione della biosicurezza e livelli di rischio		
Valutazione della Biosicurezza	Elevato	Basso
		
Disegno del vettore	Vettore e funzioni di <i>packaging</i> separate su due vettori	Vettore e funzioni di <i>packaging</i> separate in plasmidi multipli
	Espressione di geni virali	Delezione di geni virali
Transgene	Oncogene	Non-oncogene
Produzione del vettore	Elevate quantità	Quantità di laboratorio
Animale Ospite	Ospite permissivo	Ospite non-permissivo
	Animali inoculati con cellule umane	
Manipolazione Animale	Somministrazione del vettore (es. uso di siringhe o materiale tagliente durante l'inoculo)	Stabulazione e allevamento (senza uso di aghi, ecc.)

12. Valutazione del rischio connesso all'utilizzo di vettori lentivirali nella sperimentazione in animali

La sperimentazione animale, in corso di studi preclinici, è un momento fondamentale finalizzato alla verifica funzionale dei sistemi vettore oltre che dei protocolli clinici da applicare all'uomo. Una corretta valutazione del rischio connessa all'utilizzo dei vettori lentivirali nell'animale si rende necessaria, nell'interesse della sicurezza degli operatori e dell'ambiente. La sperimentazione sull'animale deve essere condotta tenendo in considerazione la valutazione del rischio relativa al costrutto con cui si vuole trasdurre ed alla proteina che si vuole esprimere. Qualsiasi manipolazione sull'animale deve avvenire in locali conformi alla classe di contenimento appropriata al tipo di costrutto. Tali locali devono essere inclusi nella notifica di impianto, ma è necessario che nella notifica di impiego la valutazione del rischio consideri i rischi connessi alla stabula-

zione dell'animale una volta trattato. Deve essere tenuto presente che il livello di contenimento biologico (*Biosafety Level* – BSL) vale fino all'inoculazione dell'animale. Successivamente, deve essere preso in considerazione il livello di contenimento biologico animale (*Animal Biosafety Level* – ABSL).

Alcune specie animali da laboratorio (ad es. topi) non supportano la replicazione di HIV-1 e quindi successivamente all'inoculazione il livello di contenimento può essere diminuito da 2 a 1, tenendo presente l'eventuale rilascio del vettore nei fluidi corporei raccolti nella segatura della lettiera. Inoltre l'utilizzo di VL di terza generazione introduce maggiore sicurezza contro la produzione di RCL (Dull et al., 1998) e l'amplificazione di eventuali RCL nei roditori è perciò altamente improbabile. Questo rappresenta un notevole vantaggio per tutti quegli studi di terapia genica o di immunizzazione dove si presenta la necessità di effettuare analisi più sofisticate quali ad esempio la Imaging a Risonanza Magnetica (MRI) per seguire *in vivo*, in maniera non invasiva, l'effetto di un gene in protocolli terapeutici. Karlen e Zuffery (2007), hanno effettuato studi su roditori per determinare il tempo di decadenza delle particelle virali inoculate in roditori, stabilendo che dopo 72 ore i roditori inoculati con alte dosi di VL, 10^7 unità trasducenti (TU) intravena, possono essere declassificati a livello di contenimento 1 (BLS1), mentre il tempo si riduce a 24 ore negli animali inoculati direttamente nel cervello. Al contrario, animali che supportano la replicazione (sia di HIV che dell'eventuale lentivirus di origine animale utilizzato) o a cui sono state impiantate cellule umane, richiedono un livello di contenimento superiore (BLS2) a causa del potenziale di generazione di RCL. Il controllo dei ricambi d'aria nelle stanze di stabulazione; il mantenimento di pressioni differenziali tra le stanze di stabulazione e le zone circostanti; flussi ben definiti di materiale e personale da zone pulite a zone sporche; l'utilizzo di gabbie filtrate e di sistemi di captazione dell'aria per le operazioni di cambio segatura; e infine la formazione del personale e il corretto utilizzo di DPI e norme di igiene personali sono elementi fondamentali a contenere e controllare il rischio.

13. Misure di prevenzione nell'utilizzo di vettori lentivirali: Linee Guida internazionali

Il controllo del rischio connesso all'utilizzo di vettori lentivirali viene effettuato attraverso la definizione e l'adozione di adeguate misure di prevenzione quali:

- adeguati livelli di contenimento dei locali adibiti alle lavorazioni;
- adeguate attrezzature di lavoro;
- adeguate norme di comportamento in laboratorio;
- adeguate misure di protezione collettive e/o individuali per la eliminazione o la riduzione del rischio di contaminazione.

Risulta inoltre di fondamentale importanza la professionalità, l'addestramento, l'esperienza ed il buon senso dell'operatore. Infatti va sottolineato che è il fattore errore umano spesso causa di incidenti occupazionali, qualunque contesto lavorativo si

analizzi, e che nello specifico è riconducibile ad una prassi disattenta di laboratorio e all'uso errato delle apparecchiature. Questi ultimi aspetti sono spesso connessi alla ripetitività delle operazioni che gli addetti ai laboratori, specie quelli che utilizzano tecniche molecolari, devono compiere, e più in generale all'assuefazione al lavoro che riduce la percezione del rischio (Pettauer, 1995).

A livello internazionale esistono diverse linee guida in tema di misure di prevenzione ed adozione di specifiche procedure di lavoro quando si manipolano vettori lentivirali derivanti da HIV-1 (Center for Disease Control, 2009; National Institutes of Health, 2006.; Cornell University, 2008; Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2007; University of Pittsburgh, 2008; Dartmouth College, 2011; Committee on Microbiological Safety (COMS) of the Harvard Medical School, 2010) e tutte concordano nel considerare come potenziali pericoli quelli della possibile produzione di lentivirus competenti per la replicazione (RCL) ed il potenziale di oncogenesi.

Sia il livello di contenimento BSL2 o il livello BSL2 con precauzioni extra (BSL2+) sono considerati appropriati per le operazioni che utilizzano vettori lentivirali che presentano multipli profili di sicurezza e che vedono segregati vettore e funzioni packaging su quattro o più plasmidi (vettori di terza generazione e auto-inattivanti). Il livello di contenimento BSL2+ include una particolare attenzione ai taglienti (e ove possibile prevede l'uso di aghi di sicurezza) e l'utilizzo dei dispositivi di protezione specifici per prevenire l'esposizione delle mucose del lavoratore. Nello specifico le extra precauzioni consistono nell'utilizzo del doppio guanto, della visiera, della maschera facciale, soprattutto per le operazioni che vengono eseguite fuori dalla cappa di biosicurezza. Nella maggior parte delle linee guida, questi livelli di contenimento sono considerati adeguati anche quando si effettuano operazioni con grandi volumi (> 10 L) di vettori lentivirali da HIV.

Relativamente ai test per valutare l'assenza di RCL viene riportata in letteratura l'esperienza del *National Gene Vector Laboratory* (NGVL) che in un test di produzione di oltre 60 litri di vettori lentivirali da HIV-1 e successivo screening del supernatante e delle cellule, utilizzando diversi metodi, non ha osservato presenza di RCL (dati non pubblicati), nonchè la costante mancanza di RCL in tutti i lotti di VL prodotti su larga scala per le sperimentazioni cliniche accennate sopra (Biffi, 2013; Aiuti, 2013). Questo suggerisce che la frequenza di comparsa di RCL nella produzione di vettori lentivirali risulta molto bassa e, considerato che, comunque, non può essere considerata in via teorica inesistente, si suggerisce di continuare ad investigare su tale evenienza, al fine di implementare le conoscenze a tale riguardo.

La Tabella 4 riassume le più recenti raccomandazioni e Linee Guida riguardanti specificamente il contenimento nell'uso dei VL. Sono indicati i requisiti minimi di contenimento per VL nei quali la natura del transgene inserito non pone rischi ulteriori e per i quali la produzione avviene su scala di laboratorio.

La Tabella 5 riassume schematicamente le differenze tra una facility BSL2 e BSL3 secondo le Linee Guida NIH.

La Tabella 6 riporta le norme comportamentali da osservare durante la manipolazione di VL in una *facility* BSL-2

Tabella 4. Raccomandazioni e Linee Guida di sicurezza biologica per la manipolazione dei vettori lentivirali

Tipo di manipolazione	Livello di contenimento	Misure e condizioni aggiuntive	Bibliografia
<i>In vitro</i>			
Manipolazione di cellule trasdotte con vettori SIN di terza generazione	BSL 2		(NIH (RAC), 2006)
Attività di ricerca che prevede l'uso di sistemi con funzioni di impacchettamento del vettore disposti su più di due plasmidi	BSL 2		(NIH (RAC), 2006)
Manipolazione/produzione di vettori SIN privi delle proteine regolatorie Vpr, Vpu, Vif e Nef con volumi e manipolazioni di cellule trasdotte con questo tipo di vettori	BSL 2	Guanti, DPI*	(CGM/051215-01, 2005; NIH (RAC), 2006)
Manipolazione di cellule trasdotte con vettori non-SIN o vettori non privati delle proteine Vpr, Vpu, Vif e Nef	BSL 2 potenziato		(NIH (RAC), 2006)
Attività di ricerca che prevede l'uso di sistemi con funzioni di impacchettamento del vettore disposti su due plasmidi con volumi maggiori di 10lt	BSL 2 potenziato	Attenzione a strumenti taglienti (uso di aghi di sicurezza), DPI*	(NIH, 2006)
<i>In vivo</i>			
Stabulazione di animali inoculati con LV con vettori derivanti da sistemi di impacchettamento con più di 2 plasmidi, 1-7 giorni dopo l'inoculo.	BSL 1	Gli animali non devono essere permissivi per la replicazione lentivirale. Dopo l'inoculo il sito deve essere pulito e la lettiera cambiata.	(NIH (RAC), 2006; CGM/051215-01, 2005)
Inoculazione di animali inoculati con i) vettori SIN privi delle proteine regolatorie Vpr, Vpu, Vif e Nef o ii) cellule trasdotte con questo vettore	BSL 2	Deve essere usata una cappa biologica a livello di contenimento II	(NIH, 2006; CGM/051215-01, 2005)
Trapianto in primati di cellule trasdotte con vettori lenti virali SIN di "terza generazione"	BSL 2	Le condizioni dell'inoculo devono essere tali da minimizzare la presenza di particelle di vettore libere	(CGM/060710-01, 2006)
Inoculazione di animali con vettori che possono infettare cellule umane (per es. vettori pseudotipizzati con la proteina Env VSV-G)	BSL 2	Deve essere usata una cappa biologica a livello di contenimento II	(CMS/HMD, 2010)
Stabulazione di animali trapiantati con cellule permissive per la replicazione lentivirale umana o animali, trasdotte con vettori SIN	BSL 2 potenziato	Attenzione agli strumenti taglienti (usare aghi di sicurezza), DPI ^a	(NIH, 2006)

Note:

DPI: dispositivi di protezione individuale.

a: adatto a ridurre una potenziale esposizione delle mucose.

Tabella 5. Riassunto schematico comparativo tra *facility* BSL-2 e BSL-3

BSL-2	BSL-3 (Include la lista indicata per il BSL2, eccetto dove indicato specificatamente)
Procedure standard	
Accesso ristretto Decontaminare la superficie di lavoro Decontaminare i rifiuti Non pipettare a bocca Vietato consumare cibi e bevande, ecc. Lavare le mani dopo la manipolazione di microrganismi e prima di uscire dal laboratorio Ridurre al minimo aerosol e spruzzi Gli esperimenti a minor rischio biologico devono essere condotti in aree strettamente demarcate	Tutti gli esperimenti sono condotti a livello BSL3 Non sono ammesse persone al di sotto dei 16 anni
Procedure speciali	
Specificare regole di ammissione Segnali di pericolo biologico Contenimento di insetti e roditori Indumenti protettivi da rimuovere prima di uscire dal laboratorio Vietato l'ingresso degli animali non coinvolti nella sperimentazione Evitare la contaminazione della pelle tramite guanti Evitare l'uso di oggetti taglienti Comunicare agli organi di controllo eventuali fuoriuscite ed esposizioni Se necessario effettuare controlli sanitari Manuale e di biosicurezza consultabile	Raccolta e conservazione del siero di baseline Mascherina chirurgica o respiratori indossati nelle stanze con animali Animali ospitati in sistemi di contenimento parziali (o DPI completi con doccia per il personale) Linee per il vuoto protette con filtri HEPA e trappole con disinfettante liquido
Equipaggiamenti di contenimento	
Cappa biologica di classe II (BSC II) utilizzata per le procedure con produzione di aerosol o concentrazione di larghi volumi	Tutti i lavori vengono condotti in BSC II. Le BSC devono essere certificate annualmente

Continua

Segue Tabella

Attrezzature di laboratorio	
I laboratori devono poter essere puliti facilmente; banconi con superfici impermeabili e mobili solido e robusto	
Lavandino per lavare le mani	
Zanzariera alle finestre	
Autoclave	
	Doppia porta di ingresso
	Superfici resistenti all'acqua e sigillate per evitare infiltrazioni
	Finestre chiuse e sigillate
	Porte con chiusura di sicurezza
	Autoclave con accesso nel laboratorio
	Non è consentito il flusso d'aria ricircolante

Tabella 6. Norme comportamentali da osservare durante la manipolazione di VL in una *facility* BSL-2

Se vengono eseguite manipolazioni “aperte” Il laboratorio deve avere almeno una cappa di sicurezza biologica. Questa deve essere installata all'interno dell'area di lavoro in modo tale da non disturbare l'equilibrio del flusso d'aria. Deve essere localizzata lontana dalle finestre, dalla porte, dagli approvvigionamenti per la stanza, dalle bocche dell'aria condizionata e dalle zone di passaggio. Deve essere controllata e certificata al momento dell'installazione, dopo ogni spostamento e almeno una volta all'anno.

Dei guanti monouso devono essere sempre a disposizione del personale e devono essere indossati quando è previsto un contatto diretto o si preveda la possibilità di un contatto con la pelle non intatta.

Mascherina, occhiali di protezione o schermi protettivi per il viso devono essere indossati durante dei procedimenti che possono dar luogo a schizzi o aerosol se effettuati al di fuori di cappa di sicurezza biologica.

Bisognerebbe evitare l'uso di aghi o altri strumenti appuntiti. Se tali strumenti dovessero essere necessari, dovrebbero essere manipolati adeguatamente, in modo da ridurre il rischio di puntura accidentale.

Tutte le manipolazioni che possono potenzialmente produrre aerosol o comunque pericolose, devono essere condotte all'interno di una cappa di sicurezza biologica di tipo II.

La manipolazione simultanea di virus competenti per la replicazione o altri sistemi di vettori nella stessa cappa di sicurezza biologica di tipo II è proibita.

L'uso di cappe a flusso laminare orizzontale è proibito per la manipolazione di patogeni e/o organismi o microrganismi geneticamente modificati che comportano rischio per l'operatore.

Le superfici di lavoro devono essere pulite e decontaminate con i disinfettanti più appropriati dopo aver finito il lavoro o dopo ogni contaminazione con materiale biologico. I disinfettanti appropriati per inattivare VL sulle superfici includono 1% ipoclorito di sodio, 2% glutaraldeide alcalina o 70% etanolo.

Le direttive per l'uso dei disinfettanti devono essere a disposizione del personale. A seconda dello scopo, le istruzioni devono precisare il tipo di disinfettante da usare ed il tempo di applicazione.

Le istruzioni sul comportamento da tenere in caso di incidente devono essere esposte in maniera ben visibile all'interno del laboratorio. Si deve inoltre redigere una procedura di trattamento di profilassi di post-esposizione che deve essere messo in atto immediatamente dopo la prescrizione da parte del medico del lavoro.

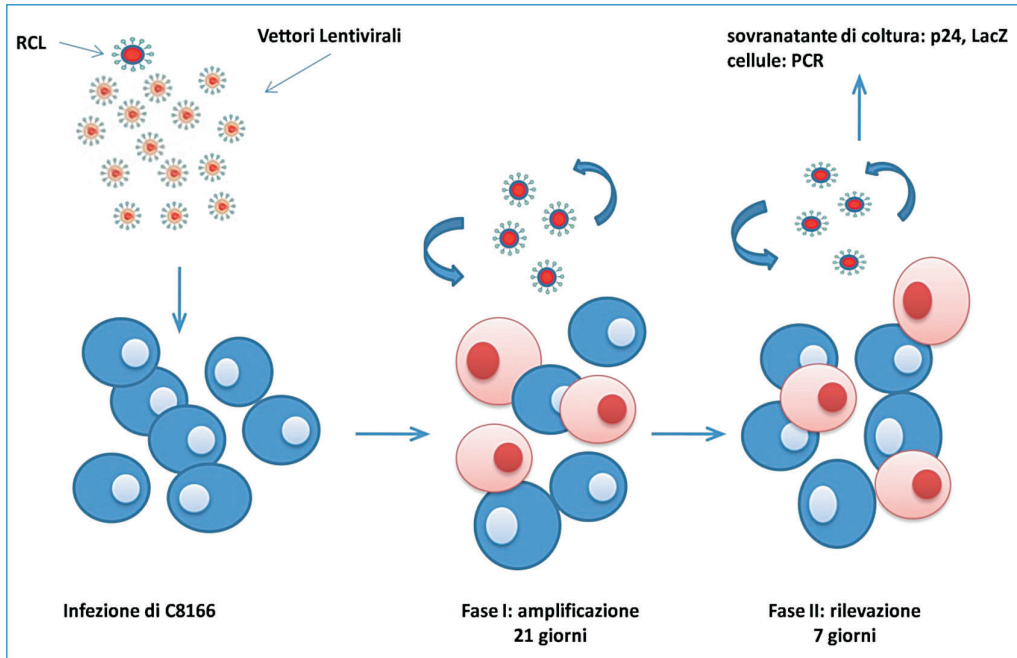
Il trasporto di VL o di cellule trasdotte da VL all'interno della struttura deve avvenire all'interno di un doppio contenitore. Il primo, sigillato in modo da impedire eventuali perdite, deve essere inserito in un secondo contenitore che, in un normale trasporto, sia infrangibile.

Il trasporto di VL o cellule trasdotte da VL all'esterno della struttura deve avvenire all'interno di un triplo contenitore che sia conforme ai requisiti correnti dei regolamenti UN riguardanti il trasporto di merci pericolose.

14. Test per la valutazione della presenza di vettori lentivirali competenti per la replicazione (RCL)

La valutazione della eventuale formazione di RCL avviene tramite test biologici, che prevedono l'uso di co-culture tra le cellule produttrici il vettore o il sovranatante da esse prodotto, con una linea cellulare permissiva. I test devono essere protratti per un minimo di cinque passaggi cellulari, al fine di garantire l'amplificazione di ogni potenziale RCL eventualmente presente. Per quanto riguarda i VL basati su HIV-1, in genere, come linea permissiva, viene utilizzata la linea cellulare T non aderente C8166, perché altamente suscettibile all'infezione. Le cellule C8166, vengono, quindi trasdotte con il vettore da testare e dopo 3 settimane di coltura (fase I: amplificazione), viene raccolto il sovrinatante ed utilizzato per trasdurre le cellule MAGI, una linea cellulare CD4+ che esprime il gene LacZ sotto il controllo dell'elemento responsivo al Tat nelle LTR (fase II: rilevazione) per ulteriori 7 giorni. Alla fine di questa fase il sovrinatante viene analizzato tramite test ELISA per la presenza dell'antigene p24 e per la produzione di LacZ, mentre le cellule vengono analizzate per la presenza di retrovirus tramite reazione di PCR con dei *primers* che cadono all'interno della sequenza di impacchettamento e nella regione del gene gag (psi-gag PCR) (Sastry, 2005; Cornetta, 2011). La fase di amplificazione della durata di 3 settimane permette appunto di amplificare la concentrazione dei virus che altrimenti risulterebbero al di sotto del limite di rilevazione del test. La seconda fase invece è necessaria per: i) escludere la presenza di RCL a crescita lenta; ii) escludere falsi positivi dovuti alla rara possibilità di ricombinazioni tra vettore e plasmide di impacchettamento (questo evento non genera RCL).

Figura 12. Test RCL



Note: La linea cellulare permissiva C8166 viene infettata con il campione di LV da testare. Dopo 21 giorni di coltura (fase I: amplificazione), il sovrinatante viene raccolto ed utilizzato per infettare la linea cellulare MAGI (fase II: rilevazione). In seguito, dopo 7 giorni, il terreno di coltura viene analizzato per la presenza dell'antigene p24 e della proteina LacZ, mentre le cellule vengono analizzate per la presenza di retrovirus tramite PCR.

15. Test per la valutazione della mobilizzazione dei vettori lentivirali

Per la valutazione della eventuale mobilizzazione di VL può essere utilizzato un test *in vitro* che utilizza un marker di rilevazione, *Marker Rescue Assay* (MRA). Questo test consiste nell'utilizzare la linea cellulare 293 stabilmente trasdotta con una copia integrata di vettore lentivirale esprime il gene NeoR, che conferisce la resistenza all'antibiotico Neomicina (Evans, 2000; Hanawa, 2005). Le cellule vengono infettate con le preparazioni di VL da testare per la mobilizzazione e il sovrinatante viene raccolto dopo 24 e 72 ore per essere titolato per il trasferimento del marcatore NeoR su cellule HeLa e 293. Il numero delle colonie positive indicherà il numero di vettore il cui genoma è stato ripristinato e mobilizzato. Nel caso di vettori IDLV il test può essere effettuato su macrofagi (cellule non in divisione) per 14 giorni (Gillim-Ross, 2005) ed i sovrinatanti raccolti ogni 2 giorni e testati su cellule MAGI per la espressione del gene LacZ e PCR.

16. Valutazione dell'esposizione professionale a vettori lentivirali

Nello specifico della esposizione professionale a vettori lentivirali, non risultano sperimentati o allo studio piani di monitoraggio biologico dei lavoratori per la valutazione di tale rischio professionale. A tale proposito occorre sottolineare che, a fini preventivi, il monitoraggio biologico, mediante la ricerca di *marker* specifici, consentirebbe di definire i livelli di esposizione prima che si manifestino eventuali effetti avversi sulla salute.

Risultano altresì attivati in alcuni laboratori biotecnologici piani di controllo della contaminazione delle superfici di lavoro dei laboratori dove si manipolano i vettori mediante analisi di PCR (con cadenza trimestrale) con i primers specifici per il DNA del MOGM, per accertare l'assenza di contaminazione (Pietrangeli, 2004).

Malgrado a tutt'oggi non siano riportate in letteratura notizie di incidenti e conseguenti effetti sulla salute durante la manipolazione di vettori virali da parte di personale specializzato negli impianti autorizzati, tuttavia la messa a punto di metodi per la verifica di una eventuale contaminazione del lavoratore può rivelarsi utile ai fini di confermare l'efficacia delle misure di contenimento adottate ed a dare indicazioni per l'attivazione di piani specifici di sorveglianza sanitaria, qualora necessari. Infatti, le metodiche già utilizzate per testare la formazione di RCL e la mobilitazione nei pazienti sottoposti a terapia genica potrebbero essere ugualmente applicate per monitorare gli operatori del settore nel caso di accidentale contaminazione con i VL. Eventualmente è, inoltre, possibile tramite *A/u*-PCR misurare il numero di copie provirali di VL integrato per cellula. La *A/u*-PCR consiste in una prima corsa di amplificazione con un primer specifico per il genoma del VL, ad esempio una sequenza interna all'LTR o al Gag e una coppia di primers complementari alle sequenze cromosomali ripetute *A/u*, presenti nel genoma umano circa ogni 5000 bp (Butler, 2001). Nella successiva amplificazione, il DNA della prima PCR viene questa volta amplificato utilizzando una coppia di primers complementari ad una sequenza interna all'LTR o al Gag. La *A/u*-PCR viene impiegata anche per quantificare il DNA integrato di HIV-1 nei pazienti perchè molto precisa e sensibile, con un limite di rilevazione di 6 provirus per 50.000 cellule equivalenti (Brussel, 2005).

17. Procedure operative standard in seguito ad esposizione accidentale ai vettori lentivirali

Nel caso di una eventuale esposizione accidentale al VL la procedura da adottare deve tenere in considerazione la via di trasmissione, le procedure di primo soccorso e il trattamento dell'area contaminata. Devono altresì essere avviate le procedure di notifica per gli incidenti sul lavoro secondo la normativa vigente. Il periodo di incubazione per l'osservazione di eventuali effetti dovuti all'esposizione può variare da qualche mese ad anni. Nel caso di esposizione ad alto rischio si raccomanda la stessa profilassi adottata per le esposizioni ad HIV replicazione competente.

Vie di trasmissione

Esposizione ad Alto Rischio

Puntura sulla pelle o iniezione

Ingestione

**Contatto con le mucose
(occhi, naso, bocca)**

Contatto con ferite sulla pelle

Esposizione a Basso Rischio

Morso da un animale inoculato di recente

**Contatto percutaneo con fluidi corporei provenienti
da un animale inoculato di recente**

Esposizione ad Aereosol

Primo soccorso:

- Contatto sulla pelle:** lavare immediatamente la parte esposta con acqua e sapone. L'utilizzo di soluzioni antisettiche irritanti deve essere evitato.
- Ferita della pelle:** lavare immediatamente e accuratamente la ferita con acqua e sapone e tamponare per asciugare.
- Contatto con occhi, naso o bocca:** sciacquare immediatamente la parte con acqua corrente per almeno 10 minuti.
- Contaminazione degli indumenti:** togliere gli indumenti che possono essere stati contaminati o contaminati e metterli all'interno di due sacchetti di plastica per autoclave.

Decontaminazione dell'area:

Nel caso di sversamento accidentale del VL nell'ambiente di lavoro, l'area deve essere decontaminata tramite disinfettanti. Possono essere utilizzati disinfettanti ospedalieri o una soluzione all'1% di ipoclorito di sodio (per un contatto di almeno 10 minuti) o etanolo. L'inattivazione fisica di piccoli volumi di siero può essere fatta a 56°C per 30 minuti.

18. Conclusioni

Le caratteristiche proprie dei VL e gli sforzi compiuti dalla comunità scientifica per garantirne efficienza e sicurezza hanno fatto sì che diventassero strumenti sempre più di uso comune in numerosi laboratori biotecnologici. Essi trovano, infatti, applicazione *in vitro* per la trasduzione di cellule eucariotiche e la produzione di proteine ricombinanti, *in vivo*, in modelli animali, per lo sviluppo pre-clinico e clinico di vettori impiegati nella terapia genica, e come nuovi *delivery system* per la produzione di vaccini di ultima generazione. L'uso dei VL, inoltre, non è limitato ad applicazioni di terapia cellulare ma si è esteso a ricerche nel campo della funzionalità genica trami-

te *knock-down* genetico, basato sull'uso di RNA interferenti in cellule di mammifero. Nonostante la sua ben nota patogenicità, i vettori derivati da HIV-1 offrono soluzioni uniche per protocolli di terapia genica, perché sono in grado di codificare per geni di grandi dimensioni, trasducono efficacemente sia cellule in divisione sia cellule differenziate e quiescenti, mantengono a lungo l'espressione del gene trasdotto nel genoma della cellula ospite, non presentano immunità pre-esistente anti-vettore, inducono una bassa risposta immunitaria dell'ospite e mostrano una bassa potenzialità genotossica dovuta a mutagenesi inserzionale. Proprio per la nota patogenicità di HIV-1, uno sforzo considerevole è stato dedicato al disegno di VL con elevate caratteristiche di sicurezza biologica: al fine di minimizzare la probabilità di produrre particelle replicazione competenti (RCLs), sono state sviluppate diverse generazioni di VL: di prima, seconda, terza generazione, self inattivanti ed integrasi difettivi (IDLV).

Nel documento vengono trattati gli aspetti di biosicurezza in relazione alla valutazione e gestione dei pericoli connessi con l'utilizzo dei diversi VL in base a quanto previsto da norme e linee guida internazionali ed, a livello nazionale, in base ai disposti del Titolo X del D.Lgs. 81/2008 e del D.Lgs. 206/2001. La valutazione del rischio deve considerare le condizioni di manipolazione dei vettori stessi: le procedure di laboratorio più tipiche comprendono: (1) la manipolazione di colture cellulari trasdotte da VL, (2) la manipolazione di sospensioni di VL, (3) la sperimentazione *in vivo* che coinvolge animali da laboratorio inoculati con sospensioni di VL o cellule trasdotte da VL e (4) la preparazione del vettore stesso. Il rischio di esposizione deve essere identificato e valutato per ogni procedura facendo particolare attenzione alla potenziale contaminazione dell'operatore. Tale valutazione deve portare all'assegnazione del livello di contenimento più adeguato alle varie fasi del progetto. Dal momento che la sperimentazione animale, in corso di studi preclinici, è un momento fondamentale finalizzato alla verifica funzionale dei sistemi vettore oltre che dei protocolli clinici da applicare all'uomo, una corretta valutazione del rischio in tale fase operativa si rende necessaria non solo nell'interesse della sicurezza degli operatori, ma anche dell'ambiente.

Le diverse Linee Guida internazionali in tema di misure di prevenzione ed adozione di specifiche procedure di lavoro quando si manipolano VL derivanti da HIV-1, concordano nel considerare come potenziali pericoli quelli della possibile produzione di lentivirus competenti per la replicazione (RCL) ed il potenziale di oncogenesi. A fini preventivi, sia il livello di contenimento BSL2 o il livello BSL2 con precauzioni extra (BSL2+) sono considerati appropriati per le operazioni che utilizzano VL che presentano multipli profili di sicurezza e che vedono segregati vettore e funzioni *packaging* su quattro o più plasmidi (vettori di terza generazione e self-inattivanti). Sebbene a tutt'oggi non siano riportate in letteratura notizie di incidenti e conseguenti effetti sulla salute durante la manipolazione di VL da parte di personale specializzato negli impianti autorizzati, tuttavia la messa a punto di metodi per la verifica di un'eventuale contaminazione del lavoratore può rivelarsi utile ai fini di confermare l'efficacia delle misure di contenimento adottate ed a dare indicazioni per l'attivazione di piani

specifici di sorveglianza sanitaria specifica, qualora necessari. A tale scopo nel documento vengono illustrate le metodiche utilizzate per testare la formazione di RCL e la mobilitazione dei vettori lentivirali nei pazienti sottoposti a terapia genica e che potrebbero essere ugualmente applicate per monitorare gli operatori del settore nel caso di contaminazione accidentale con i VL. Vengono infine indicate le procedure operative standard in seguito ad esposizione accidentale ai VL.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. Luigi Naldini, Direttore dell'Istituto S. Raffaele Telethon per la Terapia Genica (HSR-TIGET); Direttore della Divisione di Medicina Rigenerativa, Cellule Staminali e Terapia Genica dell'Istituto S. Raffaele; Professore di Biologia Tissutale, Terapia Genica e Cellulare dell'Università "Vita-Salute" S. Raffaele di Milano per i preziosi suggerimenti e la revisione del testo.

Si ringraziano, inoltre, la dott.ssa Marina Franco dell'Istituto Superiore di Sanità per l'assistenza editoriale e la dott.ssa Paola Levantesi del Ministero della Salute per il supporto tecnico fornito.

Bibliografia

ACGM (2000). Compendium of Guidance from UK Health and Safety Commission's Advisory Committee on Genetic Modification. Health & Safety Executive, London, 2000. Available at: <http://www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/acgm/acgmcomp/>.

Ao Z, Danappa Jayappa K, Wang B, Zheng Y, Kung S, Rassart E, Depping R, Kohler M., Cohern EA, Yao X. Importin 3 Interacts with HIV-1 Integrase and Contributes to HIV-1 Nuclear Import and Replication. *J Virol* 2010; 84(17): 8650-63.

Aiken C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin. *A. J. Virol.* 1997; 71: 5871-5877.

Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A, Giannelli S, Castiello MC, Bosticardo M, Evangelio C, Assanelli A, Casiraghi M, Di Nunzio S, Callegaro L, Benati C, Rizzardi P, Pellin D, Di Serio C, Schmidt M, Von Kalle C, Gardner J, Mehta N, Neduva V, Dow DJ, Galy A, Miniero R, Finocchi A, Metin A, Banerjee PP, Orange JS, Galimberti S, Valsecchi MG, Biffi A, Montini E, Villa A, Ciceri F, Roncarolo MG, Naldini L. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, 2013 Aug 23;341(6148).DOI: 10.1126/science.1233151.

Bayer M, Kantor B, Cockrell A, Ma H, Zeithaml B, Li X, McCown T, Kafri T. A large U3 deletion causes increased in vivo expression from a non integrating lentiviral vector. *Mol Ther.* 2008; 16:1968–1976.

Bauer G, Dao MA, Case SS, et al. In vivo biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors. *Mol Ther* 2008; 16(7): 1308-15.

Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, Benedicenti F, Vallanti G, Biasco L, Leo S, Kabbara N, Zanetti G, Rizzo WB, Mehta NA, Cicalese MP, Casiraghi M, Boelens JJ, Del Carro U, Dow DJ, Schmidt M, Assanelli A, Neduva V, Di Serio C, Stupka E, Gardner J, von Kalle C, Bordignon C, Ciceri F, Rovelli A, Roncarolo MG, Aiuti A, Sessa M, Naldini L. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*, 2013; 23;341(6148):1233158.

Bobisse S, Rondina M, Merlo A, Tisato V, Mandruzzato S, Amendola M, Naldini L, Willemsen R A, Debets R, Zanovello P and Rosato A. Reprogramming Tlymphocytes

for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell receptor gene transfer with lentiviral vectors. *Cancer Res.* 2009; 69, 9385–9394.

Bokhoven M, Stephen SL, Knight S, et al. Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors. *J Virol* 2009; 83(1):283-94.

Brussel A, Delelis O, Sonigo P. Alu-LTR Real-Time Nested PCR Assay for Quantifying Integrated HIV-1 DNA. *Human Retrovirus Protocols: Virology and Molecular Biology. Methods in Molecular Biology*, 2005; 304, 139-154.

Butler SL, Hansen MS, Bushman FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med.* 2001; 7: 631–634.

Cara A, Klotman ME. Retroviral E-DNA: persistence and gene expression in non dividing immune cells. *J Leukoc Biol.* 2006, 80: 1013-7.

Cara A, Reitz MS Jr. New insight on the role of extrachromosomal retroviral DNA. *Leukemia* 1997; 11,1395-1399.

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009; Nov 6;326(5954):818-23.

Center for Disease Control. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition, CDC, 2009.

Chong H, Starkey W, Vile RG. A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences. *J Virol* 1998; 72(4): 2663-70.

Commissie Genetische Modificatie (NL), 2005, CGM/051215-01: advieshandelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen (in Dutch). Available at: <http://www.cogem.net/index.cfm/nl/publicaties/publicatie/handelingen-met-lentivirale-vectoren-getransduceerde-zoogdiercellen>.

Commissie Genetische Modificatie (NL), 2005, CGM/050309-01 (in Dutch) Available at: <http://cogem.net/index.cfm/nl/publicaties/publicatie/handelingen-met-lentivirale-getransduceerde-zoogdiercellen-in-een-ruimte-zonder-inperking>.

Commissie Genetische Modificatie (NL), 2006, CGM/060710-01 :Advieshandelingen met lentiviraalgetransduceerdecellen in apen (IG 05-020/03) (in Dutch) Available at: <http://www.cogem.net/main-adviesdetail-home.aspx?pageid=13&loc=2&version=&mode=&id=332>.

Commissie Genetische Modificatie (NL), 2006, CGM/061030-01: Advieshandelingen met lentiviralevectoren in konijnen (in Dutch). Available at: <http://www.cogem.net/index.cfm/nl/publicaties/publicatie/handelingen-met-lentivirale-vectoren-in-konijnen>.

Committee on Microbiological Safety (COMS) of the Harvard Medical School (2010): Policy on Recommended Containment Levels for use of Retroviral Vectors in Laboratory Rats, Laboratory Mice and Laboratory Rabbits.

Coutant F, Frenkiel MP, Despres P, Charneau P. Protective antiviral immunity conferred by a non integrative lentiviral vector-based vaccine. PLoS One. 2008;3(12):e3973.

Coutant F, Sanchez David RY, Félix T, Boulay A, Caleechurn L, Souque P, Thouvenot C, Bourgouin C, Beignon AS, Charneau P. A non integrative lentiviral vector-based vaccine provides long-term sterile protection against malaria. PLoS One 2012;7(11):e48644.

Cornell University. Cornell University Institutional Biosafety Committee Guidance on the Use of Lentiviral-Based Vectors. Cornell University 2008.

Cornetta K, Yao J, Jasti A, Koop S, Douglas M, Hsu D, Couture LA, Hawkins T, and Duffy L. Replication-competent Lentivirus Analysis of Clinical Grade Vector Products Mol Ther. 2011; 19(3): 557–566.

Dai B, Yang L, Yang H, Hu B, Baltimore D and Wang P. HIV-1 Gag-specific immunity induced by a lentivector-based vaccine directed to dendritic cells. Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A. 2009; 106, 20382–20387

Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M, Desrosiers RC. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. Science 1985; Jun 7;228(4704):1201-4.

Dartmouth College. Environmental Health and Safety Version 1, 2011.

Decreto Legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. G.U. n.101 del 30 aprile 2008.

Decreto Legislativo 3 agosto 2009, n. 106. Disposizioni integrative e correttive del

Decreto Legislativo 9 aprile 2008, n.81, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. G.U. n.180 del 5 agosto 2009 – S.O. n.142.

Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206. Attuazione della direttiva 98/81/CE che modifica la direttiva 90/219/CE, concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati. G.U. n.126 del 1 giugno 2001 – S.O. n.133

Decreto 25 settembre 2001. Recepimento della decisione della Commissione 2000/608/CE del 27 settembre 2000, sulle note orientative per la valutazione del rischio di cui all'allegato III della direttiva 90/219/CEE sull'impiego confinato di microorganismi geneticamente modificati. G.U.n. 264 del 13 novembre 2001.

Deng Y, Guan J, Wen B, Zhu N, Chen H, Song J, Yang Y, Wang Y, Tan W. Induction of broadly neutralising HCV antibodies in mice by integration-deficient lentiviral vector-based pseudotyped particles. PLoS One. 2013 Apr 23;8(4):e62684.

Direttiva 98/81/CE del Consiglio del 26 ottobre 1998 che modifica la direttiva 90/219/CEE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati. GUCE L 330/13.

Direttiva 2009/41/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati. GUCE L 125/75.

Dewannieux M, Harper F, Richaud A. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. Genome Res 2006; 16(12): 1548-56.

Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. OJ L 262, 17/10/2000 P. 0021-45.

Directive 98/81/EC of 26 October 1998 amending Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified microorganisms. OJ L 330, 05/12/1998 P. 0013-31.

Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 21 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing. Council Directive 90/220/EEC. OJ L 106, 17/04/2001, P. 0001-39.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol 1998; 72: 8463–71.

Escarpe P, Zayek N, Chin P, Borellini F, Zufferey R, Veres G and Kiermen V.

Development of a sensitive assay for detection of replication competent recombinant lentivirus in large scale HIV-based preparations. *Mol. Ther* 2003; 8:332-341.

Esslinger C, Chapatte L, Finke D, Miconnet I, Guillaume P, Levy F and MacDonald HR. In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8+ T cell responses. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 1673–1681.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Available at: <http://www.emea.eu.int>.

Evans JT, Garcia JV. Lentivirus Vector Mobilization and Spread by Human Immunodeficiency Virus. *Human Gene Therapy* 2000; 11:2331–2339.

Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family serve as the cellular receptor for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013; 110: 7306-11.

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

Food and Drug Administration (FDA). Center for Biologics Evaluation and research. Available at <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/default.htm>

Gillick K, Pollpeter D, Phalora P, Kim E-Y, Wolinsky SM, Malim M. Suppression of HIV-1 infection by APOBEC3 proteins in primary human CD4+ T cells is associated with inhibition of processive reverse transcription as well as excessive cytidine deamination. *J Virol* 2013; 87: 1508-1517.

Gillim-Ross L, Cara A, Klotman ME. HIV-1 extrachromosomal 2-LTR circular DNA is long-lived in human macrophages. *Viral Immunol.* 2005;18(1):190-6.

Grasso F, Negri DR, Mochi S, Rossi A, Cesolini A, Giovannelli A, Chiantore MV, Leone P, Giorgi C, Cara A. Successful therapeutic vaccination with integrase defective lentiviral vector expressing non oncogenic human papillomavirus E7 protein. *Int J Cancer* 2013 Jan 15;132(2):335-44.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy SCID-X1. *Science*, 2003; 302: 415-9.

Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse

event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003; 348:255–256.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008; 118(9): 3132-42.

Han Y, Lassen K, Monie D. Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol* 2004; 78(12): 6122-33.

Hanawa H, Persons DA and Nienhuis AW. Mobilization and Mechanism of Transcription of Integrated Self-Inactivating Lentiviral Vectors. *J. Virol.* July 2005 vol. 79 no. 13 8410-8421.

Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008; 118(9): 3143-50.

Hu B, Dai B, Wang P. Vaccines delivered by integration-deficient lentiviral vectors targeting dendritic cells induces strong antigen-specific immunity. *Vaccine.* 2010 Sep 24;28(41):6675-83.

Hu B, Yang H, Dai B, Tai A, Wang P. Non integrating lentiviral vectors can effectively deliver ovalbumin antigen for induction of antitumor immunity. *Hum Gene Ther.* 2009 Dec;20(12):1652-64.

Iglesias MC, Mollier K, Beignon AS, Souque P, Adotevi O, Lemonnier F and Charneau P. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. *Mol. Ther.*, 2007; 15, 1203–1210.

Karlen S and Zuffery R. Declassification of rodents exposed to third-generation HIV-based vectors into class 1 animals. *Applied Biosafety.* 2007 12(2):93-99.

Karwacz K, Mukherjee S, Apolonia L, Blundell MP, Bouma G, Escors D, Collins MK, Thrasher AJ. Non integrating lentivector vaccines stimulate prolonged T-cell and antibody responses and are effective in tumor therapy. *J Virol.* 2009 Apr;83(7):3094-103.

Kim VN, Mitrophanous K, Kingsman A J. Minimal requirement for a lentivirus based on human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1998; 72: 811-816.

Kingsman SM, Mitrophanous K and Olsen J C. Potential oncogene activity of the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPPE). *Gene Ther.* 2005; 12, 3-4.

Lee YN, Bieniasz PD. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoSPathog* 2007; 3(1): 119-130l.

Lemiale F, Asefa B, Ye D, Chen C, Korokhov N and Humeau L. AnHIV-based lentiviral vector as HIV vaccine candidate: immunogenic characterization. *Vaccine* 2010; 28, 1952–1961.

Liu H, Dow EC, Arora R, et al. Integration of human immunodeficiency virus type 1 in untreated infection occurs preferentially within genes. *J Virol* 2006; 80(15): 7765-8.

Maillot B, Lévy N, Eiler S, Crucifix C, Granger F, Richert L, Didier P, Godet J, Pradeau-Aubret K, Emiliani S, Nazabal A, Lesbats P, Parissi V, Mely Y, Moras D, Schultz P, Ruff M. Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *Plos One*, 2013 Apr 11;8(4):e60734.

Marquet R, Baudin F, Gabus C, Darlix JL, Mougél M, Ehresmann B. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acid Res.*1991; 19: 2349-57.

Michellini Z, Negri DR, Baroncelli S, Spada M, Leone P, Bona R, Klotman ME, Cara A. Development and use of SIV-based Integrase defective lentiviral vector for immunization. *Vaccine*. 2009 Jul 23;27(34):4622-9.

Milman G. HIV research in the SCID mouse: biosafety considerations. *Science* 1990; 250(4984): 1152.

Mikkelsen JG, Pedersen FS. Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *J Biomed Sci* 2000; 7(2): 77-99.

Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, Maetzig T, Knoess S, Brugman MH, Schambach A, Charrier S, Galy A, Thrasher AJ, Bueren J, Baum C. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *MolTher*. 2009 Nov;17(11):1919-28.

Modlich U, Baum C. Preventing and exploiting the oncogenic potential of integrating gene vectors. *J Clin Invest* 2009; 119(4):755-8.

Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, Bartholomae C, SergiSergi L, Benedicenti F, Ambrosi A, Di Serio C, Doglioni C, von Kalle C, Naldini L. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*. 2006; 24:687–696.

Montini E, Cesana D, Schmidt M. The genotoxic potential of retroviral vectors is

strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest* 2009; 119: 964-75.

Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259): 263-7.

NIH (2006) Recombinant DNA advisory Committee (RAC) Guidance document. Biosafety Considerations for research with lentiviral vectors. Available at: http://oba.od.nih.gov/rdna/nih_guidelines_oba.html.

Negri DR. Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector. *Mol Ther.* 2007; 15:1716–1723.

Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, Spada M, Vendetti S, Bona R, Leone P, Klotman ME, Cara A. Non integrating Lentiviral Vector-Based Vaccine Efficiently Induces Functional and Persistent CD8+ T Cell Responses in Mice. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:534501.

Negri DR, Rossi A, Blasi M, Michelini Z, Leone P, Chiantore MV, Baroncelli S, Perretta G, Cimarelli A, Klotman ME, Cara A. Simian immunodeficiency virus-Vpx for improving integrase defective lentiviral vector-based vaccines. *Retrovirology* 2012; Aug 22;9:69.

OSHA (US). Occupational Safety and health Administration. Available at: <http://www.osha.gov/>.

Palmowski MJ, Lopes L, Ikeda Y, Salio M, Cerundolo V and Collins M. K. Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response. *J. Immunol.* 2004; 172, 1582–1587.

Patience C, Takeuchi Y, Cosset FL, Weiss RA. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J Virol* 1998; 72(4): 2671-6.

Pauwels K, Gijssbers R, Toelen J, Schambach A, Willard-Gallo K, Verheust C, Debyser Z, Herman P. State of the art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther.* 2009; 9:459-474.

Pettauer D, Kappeli O, Van den Eede G. Safety analysis of contained low-hazard biotechnology applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 49:649-654.

Philippe S, Sarkis C, Barkats M, Mammeri H, Ladroue C, Petit C, Mallet J, Serguera C. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained trans-

gene expression in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:17684–17689.

Pietrangeli B, Venanzetti F. (2004). Aspetti di sicurezza connessi con l'utilizzo di vettori virali in biotecnologia. *Prevenzione Oggi* 2004; 1 :153-160.

Rasmussen HB. Interactions between exogenous and endogenous retroviruses. *J Biomed Sci* 1997; 4(1):1– 8.

Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorization and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing an European Medicines Agency. *OJ L* 136, 30.04.2004, p.1.

Sastry L, Xu Y, Johnson T, et al. Certification assays for HIV-1- based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *MolTher* 2003; 8: 830-9.

Sastry L, Xu Y, Duffy L, Koop S, Jasti A, Roehl H, Jolly D, Cornetta K. Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection. *Hum Gene Ther*. 2005 Oct;16(10):1227-36.

Sastry L, Cornetta K. Detection of replication competent retrovirus and lentivirus. *Methods Mol Biol*. 2009;506:243-63.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002; 110: 521-9.

Sewell D.L. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin.Microbiol. Rev.*1995; 8 (3):389-405.

Sharkey M, Triques K, Kuritzkes DR, Stevenson M. In vivo evidence for instability of episomal human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *J Virol*. 2005; 79:5203–5210.

Siapati EK, Biger BW, Kashofer K, Themis M, Trasher AJ, Bonnet D. Murine leukemia following irradiation conditioning for transplantation of lentivirally-modified hematopoietic stem cells. *Eur J Hematol* 2007; 78(4), 303-13.

Stoye JP. Endogenous retroviruses: still active after all these years? *CurrBiol* 2001; 11(22): R914-R916.

University of Pittsburgh, 2008. Standard Operating Procedures Lentivirus and Lentivirus Vector Usage.

Van den Broeke A, Burny A. Retroviral vector biosafety: lessons from sheep. *J Biomed Biotechnol* 2003; 1(2003): 9-12.

Vargas J, Jr, Gusella G. L, Najfeld V, Klotman M E, Cara A. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum.Gene Ther.* 2004; 15:361-372.

Vincent KA, York-Higgins D, Quiroga M, Brown PO. Host sequences flanking the HIV provirus. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(20): 6045-7.

Wanisch K, Yáñez-Muñoz RJ. Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther.* 2009 Aug;17(8):1316-32.

Wellensiek BP, Ramakrishnan R, Sundaravaradan V, Mehta R, Harris DT, Ahmad N. Differential HIV-1 integration targets more actively transcribed host genes in neonatal than adult blood mononuclear cells. *Virology* 2009; 385(1): 28-38.

WHO. Laboratory Biosafety Manual, 2004, 3rd ed. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/.

Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; 13: 1749-51.

Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, MacNeil A, Howe SJ, Schmidt M, Smith AJ, Buch P, MacLaren RE, Anderson PN, Barker SE, Duran Y, Bartholomae C, von Kalle C, Heckenlively JR, Kinnon C, Ali RR, Thrasher AJ. Effective gene therapy with non integrating lentiviral vectors. *Nat Med.* 2006; 12:348–353.

Yang J, Bogerd HP, Peng S, et al. An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *ProcNatl Acad Sci USA* 1999; 96: 13404-8.

Van den Broeke A, Burny A. Retroviral vector biosafety: lessons from sheep. *J Biomed Biotechnol* 2003; 1: 9-12.

Zanta-Boussif M A, Charrier S, Brice-Ouzet A, Martin S, Opolon P, Thrasher A J, Hope T J, and Galy A. Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: application to the gene therapy of WAS. *Gene Ther.* 2009; 16: 605-619.

Zeilfelder U, Frank O, Sparacio S. The potential of retroviral vectors to cotransfer human endogenous retroviruses (HERVs) from human packaging cell lines. *Gene* 2007; 390 (1-2): 175-9.

Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montaigner L, Charneau P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173-185.

Zufferey R, Nagy D, Mandel r J, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotech.* 1997; 15, 871-875.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 1999; 73, 2886-2892.

