



Aan de staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

KENMERK 30 oktober 2006
DATUM CGM/061030-01
ONDERWERP Advies handelingen met lentivirale vectoren in konijnen (IG 02-065/06)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag over handelingen met lentivirale vectoren in konijnen van het Academisch Medisch Centrum Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met genetisch gemodificeerde lentivirale vectoren. De aanvrager is voornemens om konijnen te injecteren met derde generatie lentivirale vectoren onder inperkingsniveau DM-II. De aanvrager huisvest muizen en ratten voor vergelijkbare werkzaamheden op eigen initiatief in filtertopkooien. Aangezien dergelijke kooien te klein zijn voor konijnen, verzoekt de aanvrager om deze dieren te mogen huisvesten in standaard kooien.

De risico's die in ogenschouw genomen moeten worden, betreffen de eventuele aanwezigheid van wildtype lentivirussen bij konijnen en de verspreidingswijze van lentivirussen.

De replicatiedeficiënte lentivirale vector zou in aanwezigheid van wildtype lentivirussen eventueel gemobiliseerd kunnen worden met als gevolg verspreiding van de vector inclusief de inserties tot gevolg. Echter door het gebruik van zogenaamde 'self-inactivating vectoren' wordt de kans hierop tot een minimum beperkt. Voor zover bij de COGEM bekend komen er geen lentivirussen voor bij konijnen en kan het *Human immunodeficiency virus type-1* (HIV-1) niet repliceren in konijnencellen. De COGEM acht de kans op mobilisatie van de lentivirale vector daarom verwaarloosbaar klein.

Verder zijn er in de literatuur geen aanwijzingen dat natuurlijke verspreiding van lentivirussen plaatsvindt via aërosolen. De COGEM is daarom van mening dat de kans op verspreiding van de vector bij het gebruik van standaard kooien verwaarloosbaar klein is.

Met inachtneming van de aanvullende voorschriften zoals gesteld door Bureau GGO, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein bij het uitvoeren van de beschreven handelingen onder DM-II niveau.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Handelingen met lentivirale vectoren in konijnen

COGEM advies CGM/061030-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de handelingen met genetisch gemodificeerde lentivirale vectoren. De aanvrager is voornemens om konijnen te injecteren met derde generatie lentivirale vectoren onder inperkingsniveau DM-II. Hij beschikt reeds over een vergunning om de werkzaamheden te verrichten in muizen en ratten. De aanvrager huisvest de dieren op eigen initiatief in filtertopkooien. Aangezien dergelijke kooien te klein zijn voor konijnen, verzoekt de aanvrager om de dieren te mogen huisvesten in standaard kooien.

Lentivirussen

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van lentivirussen, zoals *Human immunodeficiency virus* (HIV), en behoren tot de familie van de retrovirussen (*Retroviridae*). Op basis van hun gastheer kunnen lentivirussen onderverdeeld worden in de volgende vijf groepen: primaten, schapen en geiten, paarden, katten en vee (2).

Lentivirussen kunnen zowel horizontaal als verticaal worden overgedragen. Horizontale transmissie kan optreden bij direct contact via bijvoorbeeld geslachtsgemeenschap, krabben of bijten. Verticale overdracht kan plaatsvinden tijdens de zwangerschap, bij de bevalling of via de moedermelk. Alleen voor het *Equine infectious anemia virus* (EIAV), dat paarden infecteert, zijn er sterke aanwijzingen dat overdracht via vectoren verloopt (met name via dazen) (3).

Lentivirale vectoren worden vaak gebruikt als effectief genoverdrachtsysteem waarmee een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel mogelijk is. Het voordeel van lentivirale vectoren is dat ze naast delende cellen ook niet-delende cellen kunnen infecteren.

Konijnen

De aanvrager hanteert de konijnenstam New Zealand White (geslacht *Oryctolagus cuniculus*). Deze dieren behoren tot de middelgrote konijnen en wegen tussen de twee en vijf kilo (4).

De konijnen worden gefokt onder ‘Specified Pathogen Free’ condities, wat betekent dat de dieren vrij zijn van specifieke micro-organismen. Daarnaast worden ze regelmatig

getest op verschillende micro-organismen waaronder *Myxomatosis* en *Rabbit hemorrhagic disease virus*.

Overweging en advies

De risico's die in ogenschouw genomen moeten worden, betreffen de eventuele aanwezigheid van wildtype lentivirussen bij konijnen en de verspreidingswijze van lentivirussen.

Uit de literatuur blijkt dat lentivirussen een beperkt gastheerbereik hebben. HIV-1 kan zich bijvoorbeeld niet repliceren in konijnencellen (7). Bovendien is de gehanteerde lentivirale vector replicatiedeficiënt doordat een aantal virale genen welke essentieel zijn voor replicatie en virulentie, *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* en *nef*, afwezig zijn. De kans op replicatie van de vector na toediening in konijnen is daarom verwaarloosbaar klein.

Indien echter wildtype lentivirussen aanwezig zouden zijn in konijnen, zou complementatie en mobilisatie van de gehanteerde lentivirale vector mogelijk kunnen zijn. De vector inclusief de inserties zou zich dan kunnen verspreiden. Er zijn echter nog nooit lentivirussen bij konijnen gerapporteerd. Daarnaast maakt de aanvrager gebruik van self-inactivating (SIN) vectoren (zoals de betreffende lentivirale vector), welke bijdragen aan een hogere bioveiligheid (9). Bij deze SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties namelijk verwijderd uit de 3'LTR van de vector. Hierdoor mist de vector na reverse transcriptie een functionele LTR, waardoor het 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is voor het inpakken van virusdeeltjes, niet actief kan worden afgelezen. Het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementerend recombinant virus wordt daardoor uitermate klein (1). Gezien dit alles acht de COGEM de kans op mobilisatie van de lentivirale vector verwaarloosbaar klein.

De COGEM merkt op dat de aanwezigheid van een endogeen retrovirus, *Rabbit endogenous retrovirus H* (RERV-H), is aangetoond in DNA van konijnen (5). Endogene retrovirussen zijn sequenties in het genoom welke homologie vertonen met bekende infectieuze retrovirussen. Dergelijke elementen zijn aanwezig in mens en dier en erven over volgens de wetten van Mendel (3;5). Hoewel er over RERV-H niet veel bekend is, blijkt het op basis van sequentie homologie verwant te zijn aan het geslacht beta-retrovirussen en niet aan lentivirussen. Verder is het endogene virus replicatiedeficiënt (5).

In 1978 is één studie beschreven waarin de aanwezigheid van een virusdeeltje met reverse transcriptase activiteit in primaire konijnencellen gerapporteerd wordt. Het deeltje vertoont een antigene verwantschap met C-type retrovirussen welke behoren tot het geslacht van de gamma-retrovirussen (5;6).

Aangezien de homologie tussen de twee beschreven retrovirussen en lentivirussen zeer beperkt is, acht de COGEM de kans op mobilisatie van de lentivirale vector als gevolg van de aanwezigheid van de retrovirussen verwaarloosbaar klein.

Uit een onderzoek in 1991 blijkt dat HIV-1 aanwezig is in aerosolen welke zijn ontstaan tijdens orthopedische en chirurgische procedures waarbij gebruik gemaakt is van elektrische apparatuur, zoals boren. Er is echter niet aangetoond of medische personeel daadwerkelijk een infectie heeft opgelopen tijdens deze werkzaamheden. In tegenstelling tot deze studie, volgt uit de grote hoeveelheid epidemiologische data naar de overdracht van HIV in verschillende populaties dat overdracht van het virus via aerosolen normaal niet plaatsvindt (8).

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM de extra risico's als gevolg van het huisvesten van konijnen in standaard kooien verwaarloosbaar klein.

Bureau GGO stelt in hun ontwerpbeschikking voor dat handelingen met proefdieren onder DM-II inperkingsniveau moeten worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet klasse-II of dat het dragen van handschoenen, veiligheidsbril en een mond- en neuskapje noodzakelijk is bij het uitvoeren van de handelingen. Aangezien konijnen niet gehanteerd kunnen worden in een dergelijk kabinet, stelt Bureau GGO als aanvullende maatregelen voor het dragen van handschoenen, een veiligheidsbril en van een mond- en neuskapje. De COGEM acht dit afdoende om de medewerker te beschermen.

Hiernaast merkt de COGEM op dat direct contact tussen de konijnen en andere proefdieren vermeden moet worden om eventuele verspreiding van de vector, via bijvoorbeeld krabben, tegen te gaan.

Concluderend acht de COGEM de risico's van de beschreven werkzaamheden bij uitvoering onder DM-II inperkingsniveau, met inachtneming van de door Bureau GGO gestelde aanvullende voorschriften, verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., en Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* **72**, blz. 8150-7
2. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
3. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

4. Zutphen, van L.F.M., Baumans, V. en A.C. Beynen (2001). Handboek proefdierkunde; proefdieren, dierproeven, alternatieven en ethiek. Derde druk. Elsevier Gezondheidszorg, Maarsse.
5. Griffiths, D.J., Voisset, C., Venables, P.J.W. en R.A. Weiss (2002). Novel endogenous retrovirus in rabbits previously reported as human retrovirus 5. *J. Virol* 76(14): 7094-7102.
6. Bedigian, H.G., Fox, R.R. en H. Meier (1978). Induction of type-C RNA virus from cultured rabbit lymphosarcoma cells. *J. Virol.* 27(2): 313-319.
7. Cutiño-Moguel, T. en A. Fassati (2006). A phenotype recessive, post-entry block in rabbit cells that results in aberrant trafficking of HIV-1. *Traffic* 9:978-992.
8. Johnson, G.K. en W.S. Robinson (1991). Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in the vapors of surgical power instruments. *J. Med. Virol.* 33: 47-50.
9. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., en Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, blz. 9873-80.