

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

DATUM 9 februari 2007
KENMERK CGM/070209-01
ONDERWERP Langdurig kweken van lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het langdurig kweken van lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

In 2005 heeft de COGEM een algemeen advies uitgebracht over handelingen met niet-macrofaagachtige zoogdiercellen die getransduceerd zijn met zogenaamde zelf-inactiverende derde generatie lentivirale vectoren. In dit advies heeft zij algemene richtlijnen opgesteld voor handelingen op een lager inperkingsniveau dan ML-II, i.e. ML-I en buiten inperking.

Op dit moment is er een stijging te zien in het aantal vergunningaanvragen betreffende het langdurig kweken van de genoemde cellen op ML-I niveau. In het algemeen advies worden dergelijke handelingen niet expliciet genoemd. Bureau GGO heeft daarop een drietal situaties onderscheiden en de COGEM gevraagd hierover te adviseren met betrekking tot de risico's voor mens en milieu. De situaties betreffen een besmetting van de gehanteerde cellen met wildtype lentivirussen, de vorming van replicatiecompetente lentivirale vectoren (RCL) en een combinatie hiervan.

De COGEM acht de kans op het ontstaan van RCL bij de productie van derde generatie lentivirale vectoren verwaarloosbaar klein op grond van theoretische en ervaringsoverwegingen. Om besmetting van de cellen met wildtype lentivirussen te voorkomen, heeft zij in het eerdere advies aanvullende voorschriften opgesteld. Daarbij zijn de risico's gerelateerd aan zogenaamde mobilisatie en recombinatie aanzienlijk kleiner dan de risico's van de aanwezigheid van replicatiecompetente lentivirussen. Gezien de verwaarloosbaar kleine kans van voorgaande situaties, acht de COGEM ook de risico's van het gelijktijdig optreden van beide situaties verwaarloosbaar klein.

Concluderend, acht de COGEM het eerder uitgebrachte algemene advies van toepassing op zowel kortdurende als langdurige kweekwerkzaamheden.

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, stylized initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

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

Langdurig kweken van lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen

COGEM advies CGM/070209-01

Inleiding

In december 2005 heeft de COGEM een algemeen advies uitgebracht over handelingen met niet-macrofaagachtige zoogdiercellen die getransduceerd zijn met zogenaamde zelf-inactiverende derde generatie lentivirale vectoren ⁽¹⁾. In dit advies heeft de COGEM algemene richtlijnen opgesteld voor handelingen met dergelijke zoogdiercellen op een lager inperkingsniveau dan ML-II te weten ML-I en buiten inperking. Dit naar aanleiding van een groot aantal adviesvragen betreffende experimenten waarbij de meetapparatuur (waaronder FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter), fluorescentiemicroscoop of confocale laserscan) zich niet in een ML-II laboratorium bevond.

Op dit moment is er een stijging te zien in het aantal vergunningaanvragen voor het langdurig kweken c.q. aanhouden van derde generatie lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige cellen op ML-I niveau. In het bovengenoemde advies van de COGEM worden dergelijke handelingen niet expliciet genoemd. Bureau GGO meldt dat dit tot verwarring heeft geleid. Daarom heeft zij hierover een adviesvraag voorgelegd aan de COGEM.

In het onderhavige advies wordt eerst enige achtergrondinformatie gegeven over lentivirussen, gevolgd door een samenvatting van de voorgaande adviezen die de COGEM hierover heeft uitgebracht. Daarna wordt ingegaan op de vragen van Bureau GGO.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als genoverdrachtsysteem ⁽²⁻⁵⁾. Dit systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel. Lentivirale vectoren hebben het voordeel dat ze naast delende cellen ook niet-delende cellen kunnen infecteren ⁽²⁾. Als basis voor lentivirale vectoren kan gebruik worden gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1).

In de loop der jaren zijn diverse vectorsystemen ontwikkeld, de zogenaamde eerste, tweede en derde generatie lentivirale systemen. Bij dergelijke systemen zijn de virale genen nodig voor de productie van de vector, verdeeld over verschillende plasmiden om

te voorkomen dat deze genen door recombinatie verbonden worden. Door dergelijke recombinatie zou theoretisch een replicerend virus gevormd kunnen worden.

Bij eerste en tweede generatie lentivirale vectorsystemen wordt gebruik gemaakt van een cel die getransfecteerd is met een drietal plasmiden. Verdeeld over deze plasmiden liggen diverse genen van het lentivirus die nodig zijn om een virusdeeltje te produceren ^(2; 6-8). De vorming van replicatiecompetent virus door recombinatie tijdens productie van de vector is niet geheel uit te sluiten bij deze productiesystemen. Om de kans hierop verder te beperken zijn derde generatie 'packaging' systemen ontwikkeld ⁽⁹⁾. In dergelijke systemen worden de noodzakelijke genen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden ^(2; 10). Daarom zijn bij de productie van derde generatie systemen minimaal drie recombinante gebeurtenissen vereist voor de vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL). Mede doordat een minimum aan overlappende sequenties gebruikt wordt, is de kans op RCL-vorming zeer klein, en in de praktijk tot nu toe nooit vastgesteld ⁽²⁾.

Daarnaast draagt het gebruik van zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vectoren bij aan een hogere bioveiligheid van derde generatie lentivirale SIN vectoren ^(9, 11). Bij deze vectoren zijn de *enhancer* sequenties verwijderd uit de 3' 'Long Terminal Repeats' (LTR's) van de vector. De vector mist hierdoor na reverse transcriptie een functionele LTR, waardoor het 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is voor het inpakken van virusdeeltjes, niet actief kan worden overgeschreven. De kans op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementerend recombinant virus wordt daardoor uitermate klein ^(9, 12).

Eerder COGEM advies

In het verleden heeft de COGEM met betrekking tot het gebruik van derde generatie lentivirale vectoren geadviseerd om laboratoriumhandelingen, waaronder infectie van zoogdiercellen, in te schalen op ML-II inperkingsniveau ⁽¹³⁾. De COGEM heeft daarna verscheidene adviezen uitgebracht over handelingen met met derde generatie lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen op een lager inperkingsniveau ⁽¹⁴⁻²¹⁾. Het betroffen veelal microscopische handelingen die uitgevoerd werden in een ML-I laboratorium of in een ruimte buiten inperking.

Omdat de COGEM destijds positief geadviseerd heeft over een aantal van deze adviesvragen, achtte zij het wenselijk om algemene richtlijnen op te stellen voor handelingen met lentiviraal getransduceerde cellen op een lager niveau dan ML-II.

De COGEM stelde in haar algemene advies in 2005 dat indien er risico's bestaan bij werkzaamheden met lentivirale vectoren, deze verbonden zijn aan de aanwezigheid van RCL's en vrije lentivirale vectordeeltjes afkomstig uit het oorspronkelijke inoculum. Bij het vrijkomen van deze deeltjes is verspreiding in het milieu mogelijk. De kans op het

ontstaan van RCL bij de productie van derde generatie lentivirale vectoren wordt op grond van theoretische en ervaringsoverwegingen verwaarloosbaar klein geacht. Daarom acht de COGEM het niet noodzakelijk om het inoculum te testen op afwezigheid van RCL-vorming. Verder dienen vrije vectordeeltjes in het kweekmedium door de wijze van kweken en wassen dusdanig gereduceerd te worden dat laboratoriummedewerkers geen risico lopen. Deze reductie wordt bepaald door de halfwaardetijd van het virus, de kweekduur van de cellen na transductie en het aantal wasstappen.

De COGEM concludeerde dat omlaagschaling van het inperkingsniveau mogelijk is voor niet-macrofaagachtige cellen zonder de veiligheid van mens en milieu in gevaar te brengen, mits de opgestelde criteria en de volgende aanvullende voorschriften in acht genomen worden.

- Het te gebruiken gastheermateriaal moet, indien de aard van het gastheermateriaal testen toelaat, vrij zijn van relevante lentivirussen, zoals HIV-1, HIV-2 voor mensen en *Simian immunodeficiency virus* (SIV) voor apen, met tropisme voor de gastheercel;
- Handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of niet-derdegeneratie vectorsystemen mogen niet gelijktijdig met de lentivirale vector in het veiligheidskabinet plaatsvinden;
- Het is niet toegestaan handelingen met de lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatiecompetente lenti- of retrovirussen of niet-derdegeneratie vectorsystemen in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden;
- Het transport van de getransduceerde zoogdiercellen tussen de verschillende laboratoria vindt plaats in een gesloten, breukvaste, lekdichte houder, die voor het vervoer uitwendig wordt ontsmet;
- Tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen;
- De werkoppervlakken en meetopstellingen dienen na de handelingen met de getransduceerde zoogdiercellen gereinigd te worden met adequate detergentia, zoals 70% alcohol of 0.1% SDS, om de betreffende oppervlakten te desinfecteren.

De adviesvraag

Bureau GGO vraagt naar aanleiding van een aantal recente vergunningaanvragen, advies over de risico's voor mens en milieu van het langdurig kweken c.q. aanhouden van derde generatie lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige cellen op ML-I niveau. Deze cellen worden volgens voorschrift gekweekt en gewassen op ML-II inperkingsniveau totdat de cellen vrij zijn van vrije replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes. Vervolgens vindt permanente kweek plaats op ML-I inperkingsniveau.

Bureau GGO vraagt de COGEM om een risico-analyse voor de volgende situaties:

- A. de animale cellen raken besmet met relevante lentivirussen (zogenaamde insleep);
- B. de animale cellen worden, voorafgaand aan de kweek, getransduceerd met een inoculum dat minimaal één RCL bevat;
- C. de animale cellen worden, voorafgaand aan de kweek, getransduceerd met een inoculum dat minimaal één RCL bevat én de kweek raakt besmet met relevante lentivirussen (insleep).

Overweging en advies

De COGEM heeft de drie beschreven situaties bestudeerd en de risico's als volgt beoordeeld.

Situatie A: *animale cellen raken besmet met relevante lentivirussen*

In het algemene advies over lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen, stelt de COGEM dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij moet zijn van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel ⁽¹⁾. Zodoende wordt eventuele mobilisatie van de ingebouwde vector of recombinatie van deze vector tegengegaan (verderop in het advies wordt hierop ingegaan).

Mobilisatie en recombinatie kunnen ook voorkomen worden door insleep van relevante lentivirussen tijdens de kweek uit te sluiten. Daarom heeft de COGEM eerder aanvullende werkvoorschriften opgesteld (1). Handelingen met replicatiecompetente virussen of andere vectorsystemen mogen niet gelijktijdig met de lentivirale vector in het veiligheidskabinet plaatsvinden. Bovendien is het niet toegestaan om handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatiecompetente lenti- of retrovirussen of niet-derdegeneratie vectorsystemen in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden. In deze periode zijn eventueel aanwezige virusdeeltjes geïnactiveerd, middels desinfectie van het werkoppervlak, en verwijderd als gevolg van de heersende luchtstroom in het veiligheidskabinet.

Gezien deze voorschriften is de COGEM van mening dat de kans op insleep van relevante lentivirussen bij kweekwerkzaamheden onder ML-I inperkingsniveau, met inachtneming van de aanvullende voorschriften, verwaarloosbaar klein is. Vanwege deze voorschriften, acht de COGEM de kans op insleep bij langdurige kweekwerkzaamheden niet groter dan bij kortdurende c.q. eindige werkzaamheden.

Indien door onvoorziene omstandigheden toch insleep optreedt, zouden de gehanteerde cellen geïnfecteerd kunnen worden. In theorie kan 1 actief virusdeeltje voldoende zijn om

een cel te infecteren. In de praktijk blijkt echter dat de hoeveelheid virus nodig om een cel te infecteren veel groter is. Dit is namelijk afhankelijk van verschillende factoren, waaronder de gevoeligheid van de gehanteerde cellen voor het virus en de stabiliteit van het virus.

In geval van een infectie met relevante lentivirussen bestaat de kans dat mobilisatie van de ingebouwde vector optreedt ^(22,23). De kans dat een SIN vector, na een co-infectie met bijvoorbeeld HIV-1, gemobiliseerd wordt, is klein, maar niet geheel uitgesloten. Dergelijke gemobiliseerde virusdeeltjes zijn infectieus, maar niet replicatiecompetent en zijn voor een verdere replicatie en verspreiding in elke cel opnieuw afhankelijk van wildtype helpervirussen.

Verder is de COGEM van mening dat recombinatie tussen een ingebouwde vector en een 'ingesleept' lentivirus, leidend tot een replicatiecompetent virus met een transgen, nagenoeg uitgesloten is. De sequentiehomologie tussen de vector en het lentivirus is beperkt en inbouw van sequenties van de vector in het replicatiecompetent virus is daarom zeer onwaarschijnlijk.

Dit leidt ertoe dat de COGEM de risico's voor mens en milieu als gevolg van een eventuele mobilisatie of recombinatie aanzienlijk kleiner acht dan de risico's veroorzaakt door de aanwezigheid van replicatiecompetente lentivirussen.

Situatie B: *tijdens transductie van de animale cellen is minimaal één RCL aanwezig*

Zoals de COGEM in haar algemeen advies heeft vastgesteld, is de kans op vorming van RCL bij de productie van zelf-inactiverende derde generatie lentivirale vectoren verwaarloosbaar klein ⁽¹⁾. Uit literatuur blijkt dat nog nooit is aangetoond dat RCL gevormd (kunnen) worden tijdens de productie van derde generatie lentivirale vectoren. Bij de experts van de COGEM is bekend dat in het verleden bij het Salk Institute for Biological Studies in La Jolla (Verenigde Staten) experimenten zijn uitgevoerd om RCL-vorming te bewerkstelligen. Deze experimenten hebben niet geleid tot de vorming van RCL. Naar aanleiding hiervan heeft daarom binnen het desbetreffende instituut omlaagschaling van inperkingsniveau BSL-III (inrichtings- en werkvoorschriften zijn vergelijkbaar met een ML-III laboratorium) naar BSL-II plaatsgevonden voor handelingen met de beschreven lentivirale vectoren ⁽²⁴⁾. Naar de mening van de deskundigen blijkt uit de ongepubliceerde data van de experimenten dat het onmogelijk is om RCLs te verkrijgen. Daarnaast resulteert een infectie met replicerende lentivirussen in het afsterven van de gastheercel.

De COGEM ziet dan ook geen aanleiding haar eerdere standpunt dat de kans op RCL-vorming verwaarloosbaar klein is, te herzien.

Indien in het theoretische geval het inoculum toch een RCL bevat, dan kan dit deeltje zich, afhankelijk van de gehanteerde gastheercel, vermenigvuldigen tijdens de kweek. Indien een medewerker in contact komt met de RCL, zou dit theoretisch een tumor kunnen veroorzaken. Dit vereist echter een opeenvolging van gebeurtenissen waarvan de kans op zich al zeer klein is. De kans op RCL vorming is verwaarloosbaar klein. Ook de kans op mobilisatie van een SIN vector is zeer klein. Daarnaast is de kans dat een medewerker vervolgens geïnfecteerd raakt zeer klein, gezien de natuurlijke infectieroute van deze virussen. De kans dat integratie van het vectordeeltje dan bovendien in of nabij een oncogen plaatsvindt, waardoor mogelijk een tumor kan ontstaan, is slechts theoretisch.

Overigens komen oncogene transformaties door wildtype lentivirussen naar de mening van de COGEM niet of nauwelijks voor.

Vanwege de verwaarloosbaar kleine kans op RCL-vorming en het hiermee samenhangende theoretische risico voor de laboratoriummedewerker, ziet de COGEM geen verschil in risico's bij kortdurende c.q. eindige kweekwerkzaamheden en langdurige werkzaamheden.

Situatie C: *animale cellen worden getransduceerd in aanwezigheid van minimaal één RCL en raken besmet door insleep van lentivirussen.*

De COGEM acht de kans dat zowel situatie A als B optreden zeer gering, omdat de kans dat beide situaties afzonderlijk optreden al verwaarloosbaar klein is. Daarbij beoordeelt de COGEM de risico's bij langdurende kweekexperimenten als niet groter dan bij kortdurende kweekexperimenten.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat de drie genoemde situaties geen verhoogd risico vormen bij het langdurig kweken van met derde generatie lentivirale vectoren getransduceerde animale cellen onder inperkingsniveau ML-I, mits de aanvullende voorschriften in acht genomen worden. De COGEM acht haar eerdere advies onverkort van toepassing op langdurige kweekwerkzaamheden ⁽¹⁾.

Referenties

1. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen (CMG/051215-01)
2. Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, blz. S125-38
3. Romano, G. (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect* **18**, blz. 128-34
4. Verhoeyen, E. and Cosset, F. L. (2004). Surface-engineering of lentiviral vectors. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, blz. S83-94
5. Vigna, E. and Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* **2**, blz. 308-16
6. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, blz. 263-7
7. Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* **65**, blz. 532-6
8. Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H., and Nienhuis, A. W. (1991). Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *J Clin Invest* **88**, blz. 1043-7
9. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* **72**, blz. 8150-7
10. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, blz. 8463-71
11. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* **72**, blz. 9873-80
12. Manilla, P., Rebello, T., Afable, C., Lu, X., Slepshkin, V., Humeau, L. M., Schonely, K., Ni, Y., Binder, G. K., Levine, B. L., MacGregor, R. R., June, C. H., and Dropulic, B. (2005). Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum Gene Ther* **16**, blz. 17-25
13. COGEM (2002). Lentivirussen (CGM/020823-05)
14. COGEM (2004). Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte (CGM/040209-01)
15. COGEM (2004). Microscopische handelingen met lentivirale vectoren (CGM/041103-01)

16. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen buiten inperking (CGM/050309-01)
17. COGEM (2005). Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen (CGM/050330-01)
18. COGEM (2005). Implementatie van een lentivirus-afgeleid genoverdracht systeem (CGM/050427-01)
19. COGEM (2005). Lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen (CGM/050527-01)
20. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte gebruikmakend van FACS en fluorescentiemicroscoop (CGM/050613-01)
21. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen (CGM/051129-01)
22. Hanawa, H., Persons, D. A., and Nienhuis, A. W. (2005). Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J Virol* **79**, blz. 8410-21
23. Logan, A. C., Haas, D. L., Kafri, T., and Kohn, D. B. (2004). Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol* **78**, blz. 8421-36
24. Spahn, G. Handling of lentiviral vectors derived from human immunodeficiency virus-1. The Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics. La Jolla, V.S.