

Aan de Minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 18 juli 2007
KENMERK CGM/070718-02
ONDERWERP Inschaling handelingen lentiviraal getransduceerde ratten van de tiende generatie

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de inschaling van werkzaamheden van transgene ratten gehuisvest in het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van huisvesting van en handelingen met genetisch gemodificeerde (gg-) ratten. De ratten zijn afkomstig uit Duitsland en gemodificeerd door de injectie in eicellen van zogenaamde tweede generatie SIN lentivirale vectoren met daarin een eGFP gen. De ratten die de aanvrager ontvangen heeft zijn de tiende generatie afstammelingen. De aanvrager wil de huisvesting van en de handelingen met de gg-ratten uitvoeren onder inperkingsniveau D-1.

Een risico bij het werken met lentivirale vectorsystemen is het ontstaan van een replicatiecompetent lentivirus (RCL), waardoor het zich zou kunnen verspreiden wanneer laboratoriummedewerkers geïnfecteerd raken met de vector.

De COGEM acht de kans zeer klein dat tijdens de productie van de vectorbatch een RCL is ontstaan. Er zijn daarnaast geen lentivirussen bekend die ratten kunnen infecteren en RCL's kunnen zich niet repliceren in ratten. De COGEM acht de kans daarom verwaarloosbaar klein dat de tiende generatie ratten door recombinatie, complementatie of mobilisatie een RCL kunnen uitscheiden. De COGEM is derhalve van mening dat de handelingen met en huisvesting van de tiende generatie ratten kan plaatsvinden op D-I 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

Inschaling van handelingen met tweede generatie lentiviraal getransduceerde ratten van de tiende generatie

COGEM advies CGM/070718-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van huisvesting van en handelingen met genetisch gemodificeerde (gg-) ratten. De ratten zijn afkomstig uit Duitsland en gemodificeerd door het injecteren van zogenaamde tweede generatie lentivirale vectoren met daarin een eGFP gen, in eicellen. De ratten die de aanvrager ontvangen heeft zijn van de tiende generatie. In het experiment wordt gebruikt gemaakt van ratten van de elfde generatie.

De aanvrager wil de ratten inzetten om te bestuderen of een falende nier zich kan herstellen en wil de werkzaamheden uitvoeren onder inperkingsniveau D-1.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als genoverdrachtsysteem (1-4). Dit systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel.

Als basis voor de in deze aanvraag beschreven lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1). Het genoom van HIV-1 bevat de genen *gag*, *pol* en *env*, verantwoordelijk voor de structurele en enzymatische componenten van het virus. Daarnaast bevat het genoom zes genen die essentieel zijn voor de virusproductie en replicatie (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* en *rev*) (5).

Uit veiligheidsoogpunt is het van belang dat er tijdens de vectorproductie geen replicatiecompetent lentivirus (RCL) kan ontstaan. Teneinde dit te voorkomen zijn in de loop der jaren daarom 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 recombinaties kan een replicerend virus gevormd worden.

Bij onderhavige tweede generatie lentivirale vectorsysteem wordt gebruik gemaakt van een cel die getransfecteerd is met een drietal plasmiden, de zogenaamde 'transfervector', het 'packagingconstruct' en het 'envelopcoderende plasmide'. Verdeeld over deze plasmiden liggen diverse genen van het lentivirus die nodig zijn om een virusdeeltje te produceren (1,6-8). De delen verantwoordelijk voor het inpakken van het virus zijn hiermee gescheiden van de delen die het virus activeren, waardoor het virus zichzelf niet kan repliceren.

In het 'packagingconstruct' komen het *env* gen (verantwoordelijk voor herkenning van de doelcel) en het *vpu* gen (promoot o.a. het vrijkomen van virusdeeltjes uit de cel) niet tot expressie omdat er een *frameshift* in het construct is aangebracht.

Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in drie plasmiden verkleint de kans op RCL vorming aanzienlijk. Om de kans op vorming van RCL verder te beperken zijn derde generatie vectorsystemen ontwikkeld waarbij gebruik gemaakt wordt van vier afzonderlijke plasmiden (9).

De vector in deze aanvraag is daarnaast ook zelf-inactiverend (SIN). SIN vectoren minimaliseren eventuele mobilisatie van de vector. Hiertoe zijn de *enhancer* en *promoter* 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 'packagingsignaal', noodzakelijk 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 complementierend recombinant virus wordt daardoor uitermate klein (9-10).

Voor de vorming van RCL moet recombinatie tussen de SIN vector en het 'packagingconstruct' plaatsvinden. Tevens moet de frameshift en de LTR van het SIN-construct gerepareerd worden.

In het 'envelopcoderende' plasmide van onderhavige vector is het oorspronkelijke envelopeiwit (*env*), in de lentivirale vector vervangen door het glycoproteïne G eiwit van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G). Als gevolg hiervan kan het virus in principe een groot aantal celtypen infecteren, waardoor de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefseltropisme heeft verkregen (4).

De COGEM is van mening dat het transgen uit deze aanvraag, het *eGFP* gen, niet schadelijk is en geen effect heeft op de replicatie- en verspreidingskarakteristieken van de lentivirale vector.

De voorgenomen werkzaamheden

De COGEM is gevraagd te adviseren over de huisvesting van en handelingen met tiende generatie ratten die genetisch gemodificeerd zijn met het *eGFP* gen door transfectie met tweede generatie SIN lentivirale vectoren. De ratten zijn in Duitsland vervaardigd en worden daar gehouden op zogenaamd S1 niveau. De aanvrager geeft aan dat dit is te vergelijken met het laagste niveau in Nederland (ML-I/ D-I).

De aanvrager heeft het voornemen om de nierslagader van ratten (ontvangerratten) met chronische nierinsufficiëntie in te spuiten met stamcellen (zowel beenmergcellen als endotheelvoorlopercellen) afkomstig uit de lentiviraal getransduceerde ratten (donorratten). Daarna worden bij de ontvangerratten nierfunctie en bloeddruk continu

gevolgd gedurende een periode van 6 tot 12 weken. Aan het einde van deze periode zullen de ontvangerratten worden gedood en zal de nier bestudeerd worden op structurele veranderingen en lokalisatie van de eGFP-cellen. Na fixatie van de weefsels zal het onderzoek uitgevoerd worden in een standaard laboratorium.

De lentivirale virusbatch die gebruikt is om de eicellen van ratten te transduceren is getest op de aanwezigheid van RCL's. De aanvrager is in zijn informatie echter niet eenduidig over de gebruikte test. De COGEM gaat voor de beoordeling uit van het protocol dat door de Duitse onderzoeksgroep wordt genoemd en vermeld staat in de publicatie van Naldini *et al.* (11). HeLa P4 cellen worden met een hoge 'multiplicity of infection (MOI)' getransduceerd met de virusbatch. Na twee tot drie passages wordt het supernatant vervolgens overgezet op verse HeLa P4 cellen en getest op β -gal inductie door middel van X-Gal kleuring.

Eerder COGEM advies

In oktober 2003 heeft de COGEM een advies uitgebracht over de terugplaatsing van transgene muizen en ratten vervaardigd met derde generatie lentivirale vectoren (12). De COGEM heeft destijds geadviseerd dat nakomelingen van *founders* direct kunnen worden teruggeplaatst naar D-I niveau indien aan bepaalde voorwaarden is voldaan.

1. De gebruikte vectorbatch moet vrij zijn van replicatie-competent virus,
2. De vector dient een 'self-inactivating' (SIN) vector van het 3e generatie 'packaging' systeem te zijn waarbij virale accessoire genen afwezig zijn,
3. Het transgen mag niet schadelijk zijn en geen effect hebben op de replicatie- en verspreidingskarakteristieken van de vector.

In 2005 heeft de COGEM een algemeen advies uitgebracht getiteld "Handelingen met door lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen" (13). In dit advies geeft zij aan dat ze het testen op afwezigheid van RCL-vorming in de virusbatch niet noodzakelijk acht voor open of gesloten handelingen buiten inperking of op ML-I inperkingsniveau, in het geval van derde generatie lentivirale SIN-vectoren. Hiermee vervalt het eerste criterium zoals gesteld in het advies van 2003 dat de gebruikte vectorbatch vrij moet zijn van replicatie-competent virus.

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een tweede generatie lentivirale SIN-vector. Er is hier dus geen sprake van een derde generatie SIN-vector zoals omschreven in het COGEM advies van 2003. Theoretisch zou er bij de productie van tweede generatie lentivirale vectoren RCL kunnen ontstaan die zich in het milieu kunnen verspreiden. Bij gebruik van onderhavige lentivirale vector moet, voordat RCL-vorming kan plaatsvinden, recombinatie van de SIN-vector en het 'packaging-construct'

plaatsvinden. Tevens moet de frameshift en de LTR van het SIN-construct gerepareerd worden. Voor zover bekend bij de COGEM is nooit melding gemaakt van RCL-vorming bij gebruik van deze vectoren. Hierbij moet echter opgemerkt worden dat derde generatie lentivirale vectoren inherent veiliger zijn omdat hier meer recombinatiegebeurtenissen vereist zijn voordat een RCL kan ontstaan. De COGEM is daarom van mening dat de vectorbatch van een tweede generatie lentivirale SIN-vector gecontroleerd moet worden op de aanwezigheid van RCL.

Kans op replicatiecompetent lentivirus in virusbatch klein maar niet uit te sluiten

De aanvrager geeft aan dat het testen op aanwezigheid van RCL in de virusbatch plaatsvindt op HeLa P4 cellen. Deze cellen brengen CD4 tot expressie en bevatten een geïntegreerd *LacZ* gen gedreven door een LTR van HIV. In het verleden heeft de COGEM aangegeven dat standaard HeLa cellen niet geschikt zijn om een uitspraak te doen over de afwezigheid van RCL in een lentivirale virusbatch (14). Deze standaard HeLa cellen zijn namelijk niet in staat om wildtype HIV te laten repliceren. Omdat HIV in deze cellen niet kan repliceren is onzeker of eventuele aanwezige lentivirale RCL's wel in deze cellen kunnen repliceren. De onderhavige HeLa P4 cellen zijn echter wel gevoelig voor het wildtype HIV waar de vector op gebaseerd is en zijn daardoor in dit opzicht wel geschikt. Het werkingsmechanisme van de gebruikte assay berust op de expressie van het *tat* gen wat aanwezig is op het 'packagingconstruct' en dus aanwezig is indien een RCL gevormd is. Expressie van het *tat* gen is noodzakelijk voor expressie van de LTR in de HeLa cel. Na expressie van de LTR wordt het *LacZ* gen aangeschakeld, wat weer wordt aangetoond door de X-gal kleuring. Indien geen RCL in de batch aanwezig is, zal het *lacZ* dus niet tot expressie komen en zullen de cellen niet kleuren na een X-gal behandeling.

De aanvrager heeft niet aangegeven wat de gevoeligheid van deze test is en hoeveel virus wordt getest. Omdat het ontstaan van RCL met de in de aanvraag genoemde constructen voor zover bekend bij de COGEM nog nooit is waargenomen, de gebruikte test veel wordt toegepast in laboratoria en de aanvrager aangeeft dat de test negatief is, acht de COGEM de kans klein dat er in de vectorbatch RCL aanwezig is. Echter op basis van de aangeleverde informatie kan de COGEM dit niet geheel uitsluiten.

Aanwezigheid RCL in tiende generatie ratten verwaarloosbaar klein

De lentivirale vector is na controle op RCL ingespoten in oöcyten van ratten. De oöcyten zijn vervolgens bevrucht. Het is vanuit risico-overwegingen van belang te weten of de nakomelingen van de ratten die daarna worden geboren RCL's kunnen bevatten of vrije virusdeeltjes kunnen uitscheiden. Daarnaast is het de vraag of de geïntegreerde vector gemobiliseerd of gecomplementeerd kan worden door wildtype lentivirussen. Indien het

bovenstaande positief beantwoord wordt, is het de vraag of dit ook gesteld kan worden voor de ratten van de tiende generatie.

De COGEM is van mening dat in de tiende generatie ratten geen vrije vectordeeltjes meer aanwezig kunnen zijn. De vectordeeltjes worden namelijk niet van generatie op generatie overgedragen. Daarnaast zijn de vectordeeltjes instabiel bij lichaamstemperatuur en hebben dan een halfwaardetijd van 10 uur. Vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes worden daarom niet meer uitgescheiden in de tiende generatie gg-ratten.

RCL's zouden in de ratten aanwezig kunnen zijn doordat de virusbatch niet vrij was van RCL's waardoor ze tijdens de transductie in de ratten zijn terechtgekomen. Hiernaast moet in overweging genomen worden of het mogelijk is dat de ingespoten replicatiedeficiënte lentivirale vectoren door recombinatie met een in de rat aanwezig wildtype lentivirus, replicatiecompetent kunnen worden. Ook zou in dit geval complementatie of mobilisatie van de gehanteerde lentivirale vector mogelijk kunnen zijn. Er zijn in de literatuur geen lentivirussen bekend die ratten kunnen infecteren en zich daar kunnen repliceren. Ook komen Murine leukemia virussen, die verwant zijn aan HIV, niet voor in ratten (5). Derhalve acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat recombinatie tot een RCL of dat complementatie van de vector optreedt. Hiernaast maakt de aanvrager gebruik van een SIN-vector. Gezien het bovenstaande acht de COGEM het risico op mobilisatie van de vector in de tiende generatie ratten verwaarloosbaar klein.

Omdat de kans verwaarloosbaar klein is dat nog RCL aanwezig is in de ratten, brengt het verbrede weefseltropisme door aanwezigheid van de VSV-G envelop geen extra risico's voor mens of milieu met zich mee. De COGEM acht het niet noodzakelijk dat aanvullende maatregelen opgelegd worden tijdens de handelingen met en huisvesting van de ratten op D-I niveau.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat de tiende generatie gg-ratten gehuisvest kunnen worden op D-I niveau. De kans dat deze dieren lentivirale vectoren uitscheiden en daarmee laboratoriummedewerkers geïnfecteerd kunnen raken, acht de COGEM verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Delenda C (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *Journal of gene medicine* 6: S125-S138
2. Romano G (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News and Perspectives* 18: 128-134

3. Verhoeven E en Cosset FL (2004). Surface-engineering of lentiviral vectors. *Journal of gene medicine* 6: S83-94
4. Vigna E en Naldini L (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *Journal of gene medicine* 2: 308-316
5. Van Regenmortel MHV (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
6. Naldini L, Blomer U, Gally P *et al.* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267
7. Poznansky M, Lever A, Bergeron L *et al.* (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *Journal of virology* 65: 532-536
8. Shimada T, Fujii H, Mitsuya H *et al.* (1991). Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *Journal of clinical investigation* 88: 1043-1047
9. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology* 72: 8150-8157
10. Manilla P, Rebello T, Afable C *et al.* (2005). Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Human gene therapy* 16: 17-25
11. Naldini L, Blömer U, Gage FH *et al.* (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the national academy of science* 93: 11382-1388
12. COGEM (2003). Terugplaatsing van proefdieren vervaardigd met derde generatie lentivirale vectoren. Advies CGM/031001-01
13. COGEM (2005). Handelingen met door lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. Advies CGM/051215-01
14. COGEM (2005). Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen. Advies CGM/050330-01