

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

DATUM 26 juli 2007
KENMERK CGM/070726-01
ONDERWERP Advies translentiviraal vectorsysteem (IG 00-171/02)

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de inschaling van handelingen met een translentiviraal vectorsysteem van Galapagos Genomics B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met een ‘translentiviraal vectorsysteem’. De aanvrager is voornemens om erfelijk materiaal van mens en muis tot expressie te brengen in animale cellen met behulp van de vector. Vervaardiging van het systeem maakt geen deel uit van de aanvraag.

Normaliter dienen handelingen met volvirulente genetisch gemodificeerde lentivirussen plaats te vinden op inperkingsniveau ML-III. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden uit te mogen voeren op het lagere niveau ML-II.

Bij de risicoanalyse is het belangrijk om te beoordelen of bij de productie van de vector volvirulent *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) of een replicatiecompetent lentivirus gevormd kan worden. Een dergelijk virus zou zich mogelijk kunnen verspreiden wanneer laboratoriummedewerkers geïnfecteerd raken met de vector.

De COGEM acht de kans op vorming van volvirulent HIV-1, of een replicatiecompetent virus, verwaarloosbaar klein. Bij de productie van de vector wordt namelijk gebruik gemaakt van een systeem waarbij de virale genen over een aantal plasmiden verspreid liggen. Hierdoor is de kans op vorming van replicatiecompetent virus door recombinatie verwaarloosbaar klein. Daarnaast zijn enkele HIV-1 genen afwezig in het productiesysteem en wordt de zogenaamde gag-pol structuur, die noodzakelijk is voor de vorming van een replicatiecompetent virus, niet gevormd.

Dit alles maakt dat de COGEM van mening is dat de werkzaamheden kunnen plaatsvinden op ML-II niveau met in acht neming van aanvullende voorschriften, zoals het dragen van handschoenen.

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 een translentiviraal vectorsysteem

COGEM advies CGM/070726-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met een ‘translentiviraal vectorsysteem’. De aanvrager is voornemens om animale cellen te infecteren met een lentivirale vector om zodoende erfelijk materiaal van mens en muis tot expressie te brengen.

Normaliter dienen handelingen met volvirulent genetisch gemodificeerde (gg-) lentivirussen plaats te vinden op inperkingsniveau ML-III. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II. Vervaardiging van het systeem maakt geen deel uit van de aanvraag.

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 (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* en *rev*) die essentieel zijn voor replicatie en virulentie van het virus (9).

Uit veiligheidsoogpunt is het van belang dat tijdens de vectorproductie geen replicatiecompetent lentivirus (RCL) kan ontstaan. Teneinde dit te voorkomen, zijn in de loop der jaren diverse vectorsystemen ontwikkeld, de zogenoemde eerste, tweede en derde generatie lentivirale systemen. Bij dergelijke systemen zijn de virale genen die nodig zijn voor de productie van de vector, verdeeld over verschillende plasmiden. Alvorens een replicerend virus zou kunnen ontstaan, is zodoende recombinatie tussen meerdere plasmiden noodzakelijk.

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 (1,5-7).

Om de kans op vorming van RCL verder te beperken zijn derde generatie vectorsystemen ontwikkeld (8). Derde generatie vectorsystemen bestaan naast het zogenaamde

‘packagingconstruct’, de ‘transfervector’ en het ‘envelopcoderende plasmide’ uit een vierde plasmide, waarop het Rev eiwit tot expressie gebracht wordt (1,10). Rev is belangrijk voor de expressie van bepaalde HIV genen (10). Het packagingconstruct bevat de genen coderend voor structurele eiwitten, die noodzakelijk zijn voor het inpakken van de vector. Deze elementen zijn gesplitst van het signaal dat voor het inpakken van het RNA in virusdeeltjes zorgt, het zogenaamde packagingsignaal. Dit signaal bevindt zich evenals het transgen en de *Long Terminal Repeats* (LTR’s) op de transfervector. Het envelopcoderende plasmide brengt het gen coderend voor het envelopeiwit tot expressie. Dit gen is bepalend voor het type gastheercel dat de virusvectordeeltjes kunnen infecteren.

Bij de productie van derde generatie systemen zijn recombinaties tussen minimaal vier plasmiden vereist voordat de vorming van een replicatiecompetent lentivirus kan optreden. Dit betekent dat minimaal drie recombinatie gebeurtenissen vereist zijn. Mede doordat een minimum aan overlappende sequenties gebruikt wordt, is de kans op RCL-vorming minimaal (1).

Derde generatie vectoren kunnen daarnaast ook zelf-inactiverend (SIN) zijn. SIN vectoren minimaliseren eventuele mobilisatie van de vector. Hiertoe zijn de *enhancer* en *promoter* sequenties verwijderd uit de 3’LTR van de vector. De vector mist hierdoor na ‘reverse transcriptie’ een functionele LTR, waardoor het ‘packagingsignaal’ niet actief kan worden overgeschreven. De kans op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementsenderend virus wordt daardoor zeer klein (11;12).

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een zogenaamd SIN translentiviraal vectorsysteem, dat een aanpassing is van eerdere systemen. Hoewel RCL-vorming bij derde generatie lentivirale vectoren voor zover bekend nooit is waargenomen, is dit systeem ontwikkeld om een nog grotere veiligheid te bieden bij gebruik in patiënten. Opgemerkt moet worden dat in dit productiesysteem meer HIV genen aanwezig zijn dan in een derde generatie packaging systeem. De voorkeur van de COGEM gaat uit naar het gebruik van systemen met zo min mogelijk HIV genen.

Voor de productie van een translentivirale vector zijn de HIV genen en het transgen verdeeld over een zestal plasmiden in plaats van over vier zoals bij derde generatie lentivirale vectoren. De genen voor *vpu*, *nef* en *env* zijn hierin niet aanwezig.

De voor de geproduceerde virusdeeltjes van belang zijnde HIV genen, zijn verdeeld over drie constructen. Hierbij zijn de genen *gag* en *pol*, normaliter samen aanwezig op het ‘packagingconstruct’, gesplitst over twee plasmiden. Dit voorkomt het ontstaan van een functionele gag-pol structuur (17). Deze structuur is strikt noodzakelijk voor mobilisatie van de vector, met de vorming van RCL als gevolg (17).

Het vierde plasmide is het ‘envelopcoderende’ plasmide, waartoe codeert voor het voor het glycoproteïne G eiwit van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G). Als gevolg hiervan kan het virusvectordeeltje in principe een groot aantal celtypen infecteren, waardoor de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefseltropisme heeft verkregen (4). Verder bevat de transfervector naast het transgen en het packagingsignaal, ook een 3’ SIN LTR. Ten slotte is een plasmide aanwezig dat betrokken is bij de constitutieve expressie van het transgen.

De productie van de virusbatch vindt plaats door co-transfectie van de zes plasmiden in de humane embryonale niercellijn TLA-HEK293T.

De adviesvraag

De aanvrager wil animale cellen (humane primaire cellen en cellijnen van mens en knaagdier) infecteren met een lentivirale vector waarin cDNA van muis en mens aanwezig is. Hierna zullen verschillende experimenten met de cellen plaatsvinden.

De aanvrager maakt gebruik van SIN vectoren geproduceerd met het translentiviraal vectorsysteem. De vervaardiging van de virusdeeltjes vindt niet plaats bij de aanvrager. Hij geeft verder aan te werken met humane primaire cellen die door de leverancier negatief getest zijn op aanwezigheid van HIV. De aanvrager verzoekt om de beschreven werkzaamheden uit te voeren op ML-II niveau.

Eerder COGEM advies

Lentivirussen worden volgens de Regeling GGO ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Laboratoriumwerkzaamheden met volvirulente gg-lentivirussen worden daarom ingeschaald op inperkingsniveau ML-III (14). Met betrekking tot het gebruik van tweede generatie lentivirale vectoren heeft de COGEM in het verleden geadviseerd (15) om laboratoriumhandelingen, waaronder infecties van zoogdiercellen, in te schalen op ML-II niveau, mits aan de volgende voorwaarden wordt voldaan:

- de te gebruiken transfervector is een self-inactivating (SIN) vector,
- er wordt gebruik gemaakt van een tweede generatie packagingsysteem waarbij de accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu*, en *nef* afwezig zijn.

Om eventuele risico’s tijdens de werkzaamheden te beperken, werden de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd (15):

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd,
- het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel. Bekende lentivirussen zijn HIV-1 en HIV-2 voor mensen en *Simian immunodeficiency virus* (SIV) voor apen.

Verder heeft de COGEM in 2005 geadviseerd dat werkzaamheden met derde generatie lentivirale vectoren op een lager inperkingsniveau dan ML-II kunnen plaatsvinden. De COGEM acht de vorming van RCL tijdens de productie van deze vectoren namelijk verwaarloosbaar klein. Wanneer gewerkt wordt op een lager niveau dan ML-II, dienen een aantal aanvullende voorschriften in acht genomen te worden. Een belangrijk voorschrift betreft de reductiefactor van het aantal vrije lentivirale vectordeeltjes, afkomstig uit het oorspronkelijke inoculum, in het kweekmedium. Daarnaast dient het gastheermateriaal vrij te zijn van relevante lentivirussen met een tropisme voor de gastheercel (16).

Overweging en advies

De aanvrager verzoekt om werkzaamheden met een translentiviraal systeem te mogen uitvoeren op niveau ML-II in plaats van ML-III. Om een uitspraak te doen over een mogelijke omlaagschaling, dienen de risico's van dit systeem in ogenschouw genomen te worden. Een belangrijk risicoaspect is de vorming van volvirulent HIV of RCL bij de productie van de virusbatch. Een dergelijk virus zou zich mogelijk in het milieu kunnen verspreiden. Om de kans op vorming van een volvirulent virus te kunnen inschatten, worden de eigenschappen van het systeem beoordeeld.

Eigenschappen van het translentivirale systeem

Zoals eerder gesteld, zijn niet alle genen van wildtype HIV-1 aanwezig; *vpu*, *nef* en *env* ontbreken. Verder liggen de genen voor de productie van het lentivirus verdeeld over zes plasmiden, en is tevens een frameshift aanwezig in het *vpr* gen. Zodoende is het gen niet functioneel aanwezig. Tevens zijn de op de plasmiden aanwezige genen uiteindelijk afwezig in het geproduceerde gg-virus aangezien deze niet aanwezig zijn op de transfervector, die slechts het transgen, het packagingsignaal en de LTR bevat.

Daarnaast liggen *gag* en *pol* over verschillende plasmiden verdeeld. Dit voorkomt de vorming van een functionele gag-pol structuur in de geproduceerde vector (17). Uit onderzoek blijkt dat een dergelijke structuur niet gevormd wordt (17). Zoals eerder opgemerkt, is deze structuur strikt noodzakelijk voor replicatie en daarmee voor de vorming van RCL (17).

Van de zes plasmiden zijn vijf plasmiden van belang bij een eventuele vorming van een replicatiecompetent virus. Daarom zijn minimaal vier recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk alvorens eventueel RCL gevormd zal worden. Tevens moet de LTR van het SIN construct gerepareerd worden, aangezien het virus anders weer zelfinactiverend is.

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM de kans op de vorming van volvirulent HIV of RCL tijdens productie van het gg-virus verwaarloosbaar klein, mede omdat er weinig homologe sequenties aanwezig zijn in de plasmiden.

Verder is de COGEM van mening dat de kans dat de replicatiedeficiënte lentivirale vectoren door recombinatie, mobilisatie of complementatie tijdens celkweek met een in de cellen aanwezig wildtype lentivirus, replicatiecompetent worden, verwaarloosbaar klein. De aanvrager gebruikt namelijk primaire cellen die door de leverancier getest zijn op afwezigheid van HIV.

De aanvrager is voornemens om cDNA van mens en muis in translentivirale vectoren in te bouwen. Een theoretisch risico is het transcomplementeren van een replicatiedeficiënt virus door cellulair cDNA. Echter, uit de literatuur blijkt dat dit risico verwaarloosbaar klein is (18). De COGEM is daarom van mening dat het insert geen effect heeft op de replicatiekarakteristieken van de translentivirale vector.

Inschaling van de werkzaamheden

Zoals hierboven beschreven, vormt het translentivirale systeem een replicatiedeficiënte vector. De vorming van een volvirulent virus is daarom niet mogelijk. Daarnaast acht de COGEM de kans op RCL-vorming verwaarloosbaar klein. Dit alles maakt dat de COGEM kan instemmen met het uitvoeren van de werkzaamheden op ML-II niveau. Zij is van mening dat aanvullende voorschriften van toepassing zijn om eventuele risico's verder te minimaliseren. Voor de onderhavige werkzaamheden acht zij daarom de voorschriften die gesteld zijn in een voorgaand COGEM advies betreffende handelingen met tweede generatie lentivirale vectoren op ML-II van toepassing (15). Deze maatregelen komen overeen met de door Bureau GGO voorgestelde voorschriften. Het betreft het dragen van handschoenen en het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II. Daarnaast moet het te gebruiken gastheermateriaal vrij zijn van relevante lentivirussen (zoals HIV-1 en HIV-2) met tropisme voor de gastheercel.

Conclusie

De COGEM is van mening dat werkzaamheden met de translentivirale vector kunnen plaatsvinden op ML-II niveau waarbij de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd blijft.

Referenties

1. Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S125-S138
2. Romano, G. (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect* 18: 128-134
3. Verhoeven, E. en Cosset, FL. (2004). Surface-engineering of lentiviral vectors. *J Gene Med Suppl* 1: S83-94
4. Vigna, E. en Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2: 308-316
5. 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
6. Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L. *et al.* (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virology* 65: 532-536
7. 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. *J Clin Invest* 88: 1043-1047
8. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology* 72: 8150-8157
9. Van Regenmortel, M.H.V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
10. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M. *et al.* (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, blz. 8463-71
11. 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. *Hum Gene Ther* 16, blz. 17-25
12. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M. *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, blz. 8150-7
13. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J. *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, blz. 9873-80
14. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004.
15. COGEM (2002). Lentivirussen (CGM/020823-05)
16. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen (CGM/051215-01).
17. Kappes, J.C. en Wu, X. (2002). Safety considerations in vector development. *Somat Cell Mol Genet* 126 (1/6): 147-158.
18. Wu, X., Wakefield, J.K., Liu, H. *et al.* (2000). Developments of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol Ther* 2(1): 47-55.