

Advies betreffende: **Inschaling en gebruik van lentivirale vectorsystemen**

Kennisgever:

COGEM kenmerk  
**CGM/020823-05**

BGGO nummer  
**GGO 94-454/1, GGO 01-154  
en GGO 01-159/3**

Datum advies  
**3 september 2002**

## **Lentivirale vectoren**

### **Inleiding**

Het gebruik van op lentivirale vectoren gebaseerde therapeutische toepassingen zal mogelijk in de nabije toekomst plaatsvinden. Deze vectoren lenen zich bij uitstek voor de ontwikkeling van een veilig en effectief gen overdracht systeem dat stabiele transductie in zowel delende als niet-delende cellen mogelijk maakt. De lentivirale vectoren behoren tot de familie van retrovirussen waar onder meer de primaten lentivirussen HIV-1, HIV-2, SIV (Simian Immune deficiency Virus) en niet-primaten feline en bovine immune deficiency retrovirussen FIV en BIV deel van uitmaken. De pathogeniteitsklasse van deze virussen volgens appendix A van de COGEM richtlijnen<sup>1</sup> is klasse 3 voor HIV-1, HIV-2, en SIV, klasse 2 voor FIV en BIV..

### **Genoomstructuur**

De genoomorganisatie van lentivirussen bevat in aanvulling op de *gag*, *pol* en *env* genen, een complexe combinatie van genen die coderen voor een zestal eiwitten (*vif*, *vpr*, *nef*, *vpu*, *tat* en *rev*), "accessory proteins" genaamd. De exacte functie van deze eiwitten is niet bekend, maar ze zijn essentieel voor het handhaven van de virulentie en interfereren mogelijk met de celcyclus en/of celgroei. De eiwitten *vif*, *vpr* en *nef* worden in het virusdeeltje ingebouwd. *vpu* is betrokken bij de virus-assemblage en de eiwitten *tat* en *rev* zijn betrokken bij de regulatie van de virale genexpressie. Deze laatste twee eiwitten spelen een centrale rol bij de pathogene eigenschappen van HIV-1<sup>2</sup>.

### **Lentivirale packaging systemen**

In de loop der jaren zijn diverse vectorsystemen ontwikkeld, de zogenoemde 1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup> of 3<sup>e</sup> generatie packaging systemen. Het eerste lentivirus vectorsysteem is afgeleid van *nef* en

<sup>1</sup> Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998)

<sup>2</sup> Vigna and Naldini, (2000), The Journal of Gene Medicine 2, blz. 308-316

vpr defectieve stammen van het HIV-1 virus. Het ontwerp van dit systeem is gebaseerd op het scheiden van *in-cis* gelokaliseerde elementen in het HIV-1 genoom van sequenties die coderen voor zogenaamde “trans-acting” eiwitten. Met dit principe werden lentivirale vectoren geproduceerd door transiënt een drietal plasmiden te transflecteren in een geschikte productie cel (1<sup>e</sup> generatie packaging systeem). Eén plasmide dat codeert voor eiwitten die noodzakelijk zijn voor het inpakken van de vector. Dit plasmide bevat geen packaging signaal ( $\psi$ ) en geen LTR's (long terminal repeats), maar brengt wel alle virale eiwitten, met uitzondering van de envelop eiwitten, tot expressie onder controle van een sterke promotor zoals de CMV promotor. Een tweede plasmide brengt het envelop eiwit tot expressie, bijvoorbeeld het G eiwit van VSV (Vesicular Stomatitis Virus), waardoor de vector wordt gepseudotypeerd en het spectrum van doelwitcellen van de vector wordt vergroot. Tenslotte bevat een derde plasmide alle cis-acting elementen die nodig zijn voor packaging, transductie en expressie van het transgen. In het 2<sup>e</sup> generatie packaging systeem zijn alle accessoire genen van het virus gedeleteerd. In de 3<sup>e</sup> generatie packaging systemen wordt het *Rev* eiwit via een afzonderlijk plasmide tot expressie gebracht via een vierde plasmide<sup>3</sup>. In deze 2<sup>e</sup> en 3<sup>e</sup> generatie packaging systemen zijn de zes “accessory proteins”, waaronder het voor virale replicatie essentiële tat eiwit, afwezig<sup>2</sup>.

## Bioveiligheid

Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in drie of vier plasmiden die een minimum aan overlappende sequenties bevatten, verkleint de mogelijkheid op recombinatie gedurende vectorproductie. Daardoor wordt de kans op het ontstaan van replicatie-competent retrovirus (RCR) sterk gereduceerd. Voor de vorming van RCR zijn nu minimaal twee onafhankelijke homologe recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk. Daarnaast is er door modificaties in vectorontwerp en packaging constructen de bioveiligheid van deze vectoren aanzienlijk verbeterd. Met name het gebruik van self-inactivating<sup>4</sup> (SIN) vectoren heeft bijgedragen aan een hogere bioveiligheid. Bij deze SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties gedeleteerd uit de 3' LTR van de vector. Hierdoor mist de geïntegreerde vector na reverse transcriptie een functionele LTR, waardoor het packaging signaal ( $\psi$ ) niet actief kan worden afgelezen. Hierdoor wordt het risico op rescue en mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementierend replicatiecompetente vector uitermate klein<sup>2</sup>.

---

<sup>3</sup> Dull, T. *et al.*, (1998), *Journal of Virology* **72** (11), blz. 8463-8471

<sup>4</sup> Zufferey, R. *et al.*, (1997), *Nature Biotechnology* **15**, blz. 871-875

## **Inschaling en gebruik van lentivirale vectorsystemen**

Voorheen heeft de COGEM op grond van destijds aanwezige kennis besloten om alleen 3<sup>e</sup> generatie packaging systemen met minimaal vier verschillende plasmiden en waarbij gebruik gemaakt wordt van SIN vectoren lager in te schalen dan bijvoorbeeld 1<sup>e</sup> of 2<sup>e</sup> generatie packaging systemen. Op basis van nieuwe inzichten is de COGEM tot een herziening van eerdere inschalingsnormen gekomen. De COGEM acht het noodzakelijk om het hieronder beschreven inschalingsstelsel te handhaven voor het gebruik van een self-inactivating (SIN) vector en een 3<sup>e</sup> generatie packaging systemen waarbij het productiesysteem uit minimaal vier verschillende plasmiden is opgebouwd:

### **1. Productie lentivirale partikels: C-I**

Aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd.

### **2. Infectie van zoogdiercellen met lentivirale partikels: C-I**

Aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
- het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HTLV-1 en –2.

### **3. Handelingen met lentivirale vectoren in associatie met dieren (muizen en ratten): D-II**

Toepassingen:

- Directe injectie van lentivirale vectoren;
- Injectie van met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen;

Aanvullende voorschriften:

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- werkzaamheden met proefdieren dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden of er dient een mond- en neuskapje en een veiligheidsbril te worden gedragen.

Bovenstaande inschaling is gebaseerd op het gebruik van een self-inactivating (SIN) transfer vector en een 3<sup>e</sup> generatie packaging construct, waarbij het productiesysteem uit minimaal vier gescheiden plasmiden is opgebouwd. Het gebruik van eerdere generatie packaging constructen al dan niet combinatie met een self-inactivating transfer vector wordt momenteel ingeschaald op basis van het gebruik van vol-virulent HIV-1 op C-II niveau ingeschaald. Recent is een aantal kennisgevingen ingediend (GGO 94-454/1, 00-159/3, 01-154) waarin gebruik wordt gemaakt van varianten van het lentivirale productiesysteem en de toepassing hiervan in associatie met proefdieren. De COGEM is van mening om het gebruik van lentivirale vectoren in te schalen zoals hierboven is beschreven, mits aan de volgende voorwaarden wordt voldaan:

- de te gebruiken transfer vector is een self-inactivating (SIN) vector

- gebruik gemaakt wordt van een 2<sup>e</sup> generatie packaging systeem waarbij de accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu*, en *nef* afwezig zijn.

Hierbij worden de aanvullende voorschriften behorende bij “Infectie van zoogdiercellen met lentivirale partikels: C-I” aangevuld en komen als volgt te luiden:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
- het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en –2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

Het gebruik van alle lentivirale vectoren in combinatie met apen wordt ingeschaald op D-II in een isolator of ingeschaald op D-II met aanvullende voorschriften die worden gebruikt voor de inschaling van vol-virulent HIV-1 in associatie met apen. Verder is de COGEM van mening dat handelingen met weefsels afkomstig van apen behandeld met alle lentivirale vectoren op C-II niveau ingeschaald worden.

### **Advies GGO 94-454/1**

Het betreft hier een wijziging van de vergunning GGO 94-454, aangevraagd door de Erasmus Universiteit Rotterdam. In deze kennisgeving wordt de proliferatie en differentiatie eigenschappen van genetisch gemarkeerde hemopoietische celpopulaties *in vivo* onderzocht. In de aanvraag worden genetisch gemodificeerde lentivirale partikels geproduceerd en getransduceerd in zoogdiercellen. Daarnaast worden lentivirale partikels gebruikt in combinatie met muizen en rhesusapen. Op grond van de hierboven beschreven inschalingsnormen is de COGEM van mening dat de handelingen als volgt ingeschaald dienen te worden:

- Onderdeel 7. Productie van genetisch gemodificeerde lentivirale partikels. Het betreft hier een 2<sup>e</sup> generatie packaging construct (pCMVΔ8.91) waarbij de accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu*, en *nef* afwezig zijn<sup>5</sup>. Daarnaast behoort de transfer vector pHR’EF-1αGFP tot de self-inactivating (SIN) vectoren<sup>5</sup>. Derhalve adviseert de COGEM inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) met de volgende aanvullende voorschriften:
  - tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
  - open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd.
- Onderdeel 8. Transductie zoogdiercellen met lentivirale partikels. Inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) met aanvullende voorschriften:
  - tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
  - open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;

<sup>5</sup> Zufferey, R. *et al.*, (1997), Nature Biotechnology **15**, blz. 871-875

<sup>6</sup> Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998)

- het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.
- Onderdeel 9. Handelingen met genetisch gemodificeerde micro-organismen in associatie met dieren (muis). Lentivirale partikels worden gebruikt zoals vervaardigd in onderdeel 7. Het betreft hier injectie van met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. De COGEM acht inschaling D-II niveau (artikel 4.1.4.2 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) noodzakelijk met de volgende aanvullende voorschriften:
  - Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
  - werkzaamheden met proefdieren dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden of er dient een mond- en neuskapje en een veiligheidsbril te worden gedragen.
- Onderdeel 10. Handelingen met genetisch gemodificeerde micro-organismen in associatie met dieren (rhesusaap). Lentivirale partikels worden gebruikt zoals vervaardigd in onderdeel 7. Experimenten met apen en lentivirale vectoren dienen volgens de COGEM ingeschaald te worden op D-II niveau in een isolator (artikel 4.1.4.2 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) met aanvullende voorschriften die worden gebruikt voor de inschaling van vol-virulent HIV-1 in associatie met apen.
- Onderdeel 11. Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van de in onderdeel 9 beschreven proefdieren (muis). Aangezien het hier niet op injecties gaat is de COGEM van mening dat inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) voldoende bescherming biedt voor mens en milieu. Hierbij gelden wel de aanvullende voorschriften zoals beschreven voor onderdeel 9.
- Onderdeel 12. Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van de in onderdeel 9 beschreven proefdieren (rhesusaap). De COGEM is van mening dat endogene retrovirale sequenties aanwezig kunnen zijn in apen welke kunnen interfereren met de gebruikte vectoren. Derhalve acht de COGEM inschaling op C-II niveau (artikel 4.1.1.4 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) noodzakelijk.

### **Advies GGO 01-154**

Het betreft onderzoek van de Erasmus Universiteit Rotterdam naar het humaan metapneumovirus (hMPV) met als uiteindelijk doel het ontwikkelen van een levend, geattenuëerd vaccin. De COGEM heeft hierover al eerder een advies uitgebracht (CGM/011212-01 en CGM/010213-1), maar herformuleert een deel van haar advies gezien de hierboven beschreven nieuwe inzichten omtrent inschaling van lentivirale vectoren.

- Onderdeel 5. Productie van gepseudotyperde lentivirale partikels. Lentivirale partikels worden gevormd met een verschillende envelope. In dit lentivirale systeem wordt gebruik gemaakt van het VSV-G, waardoor de verwachting is dat de

envelope van hMPV een beperktere hostrange tot gevolg heeft dan VSV-G. Het lentivirale pCMVΔ8.91 construct is een 2<sup>e</sup> generatie packaging construct, waarbij de accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu*, en *nef* afwezig zijn<sup>7</sup>. Daarnaast behoort de transfer vector pRRL-SIN tot de self-inactivating (SIN) vectoren<sup>7</sup>. Derhalve adviseert de COGEM inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) met de volgende aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd en dat daarmee de aanvullende voorschriften eerder gesteld aan het lentivirale systeem voldoen. Inschaling toen C-I.
- Onderdeel 6. Infectie van zoogdiercellen met gepseudotyperde lentivirale partikels. De COGEM adviseert inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>6</sup>) met aanvullende voorschriften:
  - tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
  - open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
  - het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

### **Advies GGO 00-159/3**

De COGEM heeft reeds eerder advies uitgebracht (CGM/010213-1) over de aanvraag getiteld 'Gentherapie van leukemie met groeifactor-toxine genen', van het Universitair Medisch Centrum Utrecht. Het doel de aanvraag is om CD34<sup>+</sup> hemapoïetische stamcellen die zijn geïsoleerd uit beenmerg of navelstrengbloed, te transduceren met lentivirale vectoren die het EGFP tot expressie brengen. Vervolgens wil de aanvrager deze getransduceerde cellen gaan inspuiten in immuun-gecompromitteerde RAG-2/γ-c dubbel knock-out muizen. Op grond van de hierboven beschreven inschalingsnormen voor lentivirale vectoren geeft de COGEM het volgende advies.

- Onderdeel 8: Productie van lentivirale partikels. Het betreft hier een 3<sup>e</sup> generatie packaging systeem (tenminste vier verschillende vectoren) met een self-inactivating (SIN) transfer vector<sup>8</sup> (pRRLsin). Vorming van replicatie-competente virussen is daarmee zeer onwaarschijnlijk en verspreiding van het virus is voldoende ingeperkt. Derhalve adviseert de COGEM inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>9</sup>). De beschreven pseudotypering, met het VSV G-envelop eiwit, zal leiden tot een verbreding van het gastheertropisme en zorgt voor een extra risico voor de betrokken medewerkers. In deze situatie zijn echter maatregelen ter bescherming van de medewerker dan ook noodzakelijk:
  - tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;

<sup>7</sup> Zufferey, R. *et al.*, (1997), Nature Biotechnology **15**, blz. 871-875

<sup>8</sup> Zufferey, R. *et al.*, (1998), Journal of Virology **72** (12), blz. 9873-9880

<sup>9</sup> Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998)

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd.
- Onderdeel 9: Transductie van zoogdiercellen (humane CD34+ hemapoïetische stamcellen) met lentivirale deeltjes. Inschaling op C-I niveau (artikel 4.1.1.3 van de Regeling GGO<sup>9</sup>) met de volgende aanvullende voorschriften:
  - tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
  - open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
  - het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.
- Onderdeel 11: Handelingen met genetisch gemodificeerde dieren (muizen) in associatie met getransduceerde zoogdiercellen. De muizen krijgen met lentivirale vectoren getransduceerde humane CD34<sup>+</sup> cellen toegediend. Het gebruikte vectorsysteem is sterk biologisch ingeperkt, zowel door de inperking van het productiesysteem als door de toediening in de vorm van een cellulair vaccin. De muizen zijn vrij van virus dat de gebruikte vector kan complementeren. Ook bij deze handelingen dient met name de medewerker beschermt te worden. COGEM acht inschaling op D-II niveau (artikel 4.1.4.2 van de Regeling GGO<sup>9</sup>) noodzakelijk met de volgende aanvullende voorschriften:
  - Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
  - werkzaamheden met proefdieren dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden of er dient een mond- en neuskapje en een veiligheidsbril te worden gedragen.