

Advies betreffende: **Terugplaatsing van proefdieren vervaardigd met derde generatie lentivirale vectoren**

Kennisgever:

COGEM kenmerk
CGM/031001-01

BGGO nummer

Datum advies
2 oktober 2003

Inleiding

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden vaak gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem dat stabiele integratie in het genoom mogelijk maakt. Het genoom van lentivirussen bevat, in aanvulling op de *gag*, *pol* en *env* genen, een complexe combinatie van genen die coderen voor een zestal eiwitten. Niet alle functies van deze eiwitten zijn bekend, maar ze zijn essentieel voor het handhaven van de virulentie en interfereren mogelijk met de celcyclus en/of celgroei. Lentivirale vectoren kunnen zowel delende als niet-delende cellen transfecteren. Nadat de lentivirale vector de gastheercel binnengekomen is wordt het virusdeeltje ontmanteld waarna het vector RNA in het cytoplasma wordt omgezet in dubbelstrengs DNA door het reverse transcriptase enzym dat in het virusdeeltje aanwezig is. In de kern van de gastheercel zal het DNA stabiel integreren in het genoom, waarna expressie van het transgen kan plaatsvinden (8).

In het meest geavanceerde 3^e generatie 'packaging' systeem zijn de noodzakelijk virale genen en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (1). Bij de productie van deze vectoren zijn de virale *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* en *nef* genen niet nodig en afwezig. Deze systemen bevatten minder dan 65% van de oorspronkelijke virale sequenties (8; 9). Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem over drie of vier plasmiden die een minimum aan overlappende sequenties bevatten, verkleint de kans op het ontstaan van replicatie-competent retrovirus (RCR) gedurende de vectorproductie. Voor de vorming van RCR zijn nu minimaal twee onafhankelijke homologe recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk. Lentivirale vectoren van het 3^e generatie 'packaging' systeem zijn verder verbeterd door modificaties in vectorontwerp en packaging constructen. Met name het gebruik van 'self-inactivating' (SIN) vectoren heeft bijgedragen aan een hogere bioveiligheid. Bij deze SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties gedeleteerd uit de 3' LTR ('long terminal repeat') van de vector. Hierdoor mist de geïntegreerde vector na reverse transcriptie een functionele LTR, waardoor het 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is voor het inpakken in virusdeeltjes, niet actief kan worden afgelezen. Hierdoor wordt het risico op mobilisatie van de vector uit de

getransduceerde cel na infectie met een complementerend replicatiecompetente vector uitermate klein (5; 8; 9).

Lentivirale vectoren kunnen ook gebruikt worden voor kiembaantransmissie ten behoeve van de productie van transgene dieren (4). De meest gangbare methode is om oöcyten te infecteren met lentivirale vectoren waarna de getransfecteerde oöcyten teruggeplaatst worden in schijnzwangere vrouwtjes, ook wel 'founders' genoemd. Van de nakomelingen die geboren worden (F0) zijn niet alle cellen transgeen. Een tweede generatie (F1) is nodig om volledig transgene dieren te verkrijgen.

Het Bureau GGO heeft de COGEM gevraagd om te adviseren over de bioveiligheid van het gebruik van zogenaamde 3^e generatie lentivirale vectoren voor de productie van transgene muizen en ratten. Hierbij zal alleen het vectorsysteem behandeld worden waarbij aangenomen wordt dat de gekloneerde genen niet schadelijk zijn en geen effect zullen hebben op de replicatie- en verspreidingskarakteristieken van de virale vector. Eén van de vragen van het Bureau GGO is of de redenatie, dat er bij integratie van veilige lentivirale vectoren in het genoom van een proefdier een insertie ontstaat die in principe niet gemobiliseerd kan worden tenzij door de intracellulaire aanwezigheid van het retrovirus *Human immunodeficiency virus* (HIV), voldoende sluitend is. Daarnaast is de COGEM gevraagd of een test van de eerste vijf F1 dieren, afkomstig van met eenzelfde batch lentivirale vector behandelde 'founders', op afwezigheid van de vector voldoende is om de dieren naar een lager inperkingsniveau terug te plaatsen, gegeven het feit dat er bij muizen en ratten geen lentivirussen bekend zijn. Een hieruit volgende vraag is of bij een negatief resultaat hieruit de conclusie getrokken kan worden dat alle F1 (en verdere generaties) dieren afkomstig van 'founders' behandeld met dezelfde batch direct teruggeplaatst kunnen worden.

Voorgaande COGEM adviezen

Met betrekking tot het gebruik van lentivirale vectoren van de 3^e generatie heeft de COGEM in het verleden geadviseerd (CGM/030401-02 en CGM/020823-05) om de productie van deze vectoren in te schalen op C-I niveau. Daarbij zijn de volgende aanvullende voorschriften gesteld:

- tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen,
- alle handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd,
- de doelwitcellen zijn vrij van HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere lentivirussen.

Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd (CGM/020823-05) om handelingen in associatie met muizen en ratten op D-II niveau in te schalen met de volgende aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,

- alle handelingen met dieren worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet klasse II of er dient een mond- en neuskapje en een veiligheidsbril te worden gedragen.

Overwegingen en Advies

Lentivirale vectoren van de 3^e generatie 'packaging' systemen zijn een vertrouwd en veelgebruikt vectorsysteem (1; 6; 9; 10). De kans op het ontstaan van RCR gedurende vectorproductie is volgens de COGEM minimaal als gevolg van het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in vier plasmiden die een minimum aan homologe sequenties bevatten in de virale sequenties (1). Daarbij zijn in de praktijk geen gebeurtenissen bekend waarbij wild type virussen (RCR) gevormd zijn uit lentivirale vectoren (2; 6; 8-10). Bij infectie van cellen met lentivirale vectoren is de theoretische kans op complementatie aanwezig indien andere lentivirussen in de cel aanwezig zijn. Echter, indien gebruikt gemaakt wordt van 'self-inactivating' (SIN) vectoren is het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementsender replicatie-competente vector praktisch uitgesloten (9; 10). Als gevolg van de samenstelling van SIN lentivirale vectoren, zoals de afwezigheid van tenminste 65% van HIV-1 sequenties, het ontbreken van HIV-1 genen voor oppervlakteiwitten en een defect packaging signaal, kunnen immers geen genomische transcripten gevormd worden die zouden kunnen worden ingepakt in virusdeeltjes (8; 9; 10). Mobilisatie van de ingebouwde vector zou wel gefaciliteerd kunnen worden door de aanwezigheid van een wildtype lentivirus. Echter, de aanwezigheid van wildtype lentivirussen in muizen en ratten is tot nog toe niet aangetoond (7). Hierdoor is de kans op complementatie en mobilisatie zeer onwaarschijnlijk. Bovendien blijkt uit experimenten in cellijnen, waarin lentivirale vectoren van de 3^e generatie 'packaging' systemen zijn geïnfecteerd, dat deze vectoren niet kunnen worden gemobiliseerd door een additionele infectie van de cellijn met het retrovirus HIV (1; 8). Op grond van deze argumenten is de COGEM van mening dat de mogelijkheid op complementatie door lentivirussen in muizen en ratten verwaarloosbaar klein is bij het gebruik van SIN lentivirale vectoren van de 3^e generatie.

Bij toediening van de lentivirale vector is de kans aanwezig dat horizontale verspreiding naar andere dieren optreedt van virale partikels die niet opgenomen zijn door cellen in de geïnfecteerde muizen of ratten. Uit wetenschappelijke literatuur blijkt dat de kans op horizontale overdracht uitermate klein is (1; 2; 8; 9). Daarbij is de halfwaardetijd van het viruspartikel bij 37°C minder dan zes uur, waardoor de kans klein is dat het virus gedurende langere tijd extracellulair in het proefdier kan blijven bestaan en infectieus is (3). Gezien het bovenstaande acht de COGEM de kans uiterst gering dat, in het geval van horizontale verspreiding, dit virus replicatie-competent is, waardoor de risico's voor de omgeving verwaarloosbaar zullen zijn (CGM/030401-02).

Gezien het feit dat de COGEM concludeert dat de veiligheid van 3^e generatie lentivirale vectoren voor het gebruik in muizen en ratten voldoende is aangetoond, adviseert de COGEM betreffende het genereren van transgene muizen en ratten dat alle nakomelingen (F1 en verder) van 'founders' direct teruggeplaatst kunnen worden naar D-I niveau. Hierbij hoeft het testen van deze dieren op afwezigheid van de vector niet uitgevoerd te worden, gezien het feit dat de kans verwaarloosbaar is dat lentivirale vectoren aanwezig zullen zijn. Terugplaatsing en het niet testen van de nakomelingen is alleen toegestaan indien aan de volgende voorwaarden voldaan is:

- Van het productiesysteem moet case-by-case worden vastgesteld dat het voldoet aan strikte criteria die gelden voor 'veilige lentivirale systemen' waarbij de vorming van RCR moet kunnen worden uitgesloten. Daarbij dienen de gekloneerde genen geen effect te hebben op de replicatie en verspreidingskarakteristieken van de virale vector.
- Iedere lentivirale batch dient op een valide wijze getest te worden op afwezigheid van RCR.
- De lentivirale vector behoort tot de 3^e generatie 'packaging' systemen.
- De lentivirale vector is 'self-inactivating' (SIN).
- De virale accessoire genen *vif*, *vpr*, *nef*, *vpu*, *tat* en *rev* zijn afwezig in de lentivirale vector.

Met inachtneming van bovengenoemde voorwaarden is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar zijn bij het gebruik van lentivirale vectoren van de 3^e generatie in associatie met muizen en ratten.

Referenties

1. 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.
2. Galimi, F. and Verma, I. M. (2002). Opportunities for the use of lentiviral vectors in human gene therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* **261**, blz. 245-54.
3. Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**, blz. 124-31.
4. Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**, blz. 868-72.
5. 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.

6. Quinonez, R. and Sutton, R. E. (2002). Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* **21**, blz. 937-51.
7. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
8. 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.
9. 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.
10. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**, blz. 871-5.