



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Cogem
postbus 578
3720 AN Bilthoven

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

Uw kenmerk
IG 98-083/12.co1

Uw brief van
30 juni 2005

Kenmerk
CGM/050714-01

Datum
14 juli 2005

Onderwerp
Advies kennisgeving IG 98-083/12

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking IG 98-083/12, getiteld 'Ontwikkeling van humane therapeutica', van N.V. Organon, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met animale cellen die geïnfecteerd zijn met een genetisch gemodificeerde lentivirale vector die afgeleid is van het katten AIDS virus (*Feline immunodeficiency virus*, FIV). Het doel van de aanvrager is om genen betrokken bij reproductie, genetische ziekten, bloedstolling en atherosclerose tot expressie te brengen met het oog op het ontwikkelen van humane therapeutica. De productie van de recombinante FIV virusdeeltjes en de infectie van de animale cellen, worden voorgesteld om plaats te vinden in een ML-II laboratorium.

De COGEM is van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is, dat met het gebruikte FIV productiesysteem, virussen ontstaan die zich kunnen vermenigvuldigen (RCL). De homologie tussen FIV en het verwante humane of apen immunodeficiëntie virus (HIV en SIV) is gering. Daarom acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat in de cellijnen recombinitie optreedt tussen FIV en andere lentivirussen, waardoor recombinante virussen ontstaan. De cellijnen kunnen tijdens de infectie-experimenten gecontamineerd worden met andere lentivirussen waardoor een zeer kleine kans bestaat dat het FIV genoom ingepakt wordt in de virusmantel van bijvoorbeeld HIV of SIV. De COGEM adviseert een aanvullend voorschrift op te nemen waarbij gelijktijdige werkzaamheden met lentivirussen voorkomen wordt. Met inachtneming van de geadviseerde voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu, met het uitvoeren van de experimenten op ML-II inperkingsniveau, verwaarloosbaar klein zijn.

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

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

Titel: Handelingen met animale cellen geïnfecteerd met genetisch gemodificeerde feline lentivirale vectoren

COGEM advies: CGM/050714-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van handelingen met animale cellen geïnfecteerd met het op *Feline immunodeficiency virus* (FIV) gebaseerde lentivirale vectoren in een ML-II ruimte. Het doel van de aanvrager is om genen betrokken bij reproductie, genetische ziekten, bloedstolling, atherosclerose en neurotransmissie tot expressie te brengen met het oog op het ontwikkelen van humane therapeutica.

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als genoverdrachtsysteem (9). 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 (3; 11). Als basis voor de lentivirale vector wordt in de onderhavige aanvraag gebruik gemaakt van het genoom van het katten immunodeficiëntie virus (FIV).

FIV veroorzaakt immunodeficiëntie bij katachtigen. Voor zover bekend kunnen mensen of andere diersoorten niet geïnfecteerd worden door FIV. Bij blootstelling van verscheidene humane, honden- of kattencellen aan FIV, was het virus namelijk alleen in staat om feline cellen te infecteren (5; 12). FIV-infecties vinden plaats in het beenmerg, lymfeklieren, thymus en milt, waarbij hoofdzakelijk de T-lymfocyten worden geïnfecteerd (8). Na een lange periode waarin geen symptomen waar te nemen zijn, ontstaan door het niet functioneren van het immuunsysteem, infecties van opportunistische pathogenen die uiteindelijk tot de dood leiden. Infectie met FIV vindt doorgaans plaats via vecht- en bijtwonden. Ook vindt overdracht via seksueel contact en in beperkte mate via speeksel plaats (2; 6).

Het FIV virus (pathogeniteitsklasse 2) is verwant aan het humane en apen aidsvirus (HIV en SIV), maar de genoomorganisatie van FIV is eenvoudiger (11). Het genoom van FIV bevat naast de structurele genen *gag*, *pol* en *env*, slechts drie niet-structurele genen (*rev*, *vif*, *orf2*) in plaats van de zes genen (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* en *rev*) die bij HIV en SIV voorkomen. Deze niet-structurele genen zijn essentieel voor replicatie en virulentie van het virus (3; 9; 11).

Om er voor zorg te dragen dat de feline lentivirale vector zich niet zoals het FIV kan repliceren worden de benodigde virale genen en het transgen verdeeld over drie afzonderlijke plasmiden (7; 9). Voor de vorming van replicatie-competent lentivirus

(RCL) zijn hierdoor meerdere recombinatie gebeurtenissen vereist. Mede doordat een minimum aan overlappende sequenties gebruikt wordt, is de kans op RCL-vorming hierdoor aanzienlijk verkleind. Daarnaast draagt het gebruik van zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vectoren (zoals de betreffende lentivirale vector) bij aan een hogere bioveiligheid (9). Bij SIN vectoren is de U3 regio van de 3' Long Terminal Repeat (LTR) van de virale vector gedeleteerd. Daarnaast zijn de *pol*, *vif*, *orf2* en *rev* genen in de FIV vector niet nodig en verwijderd. Hierdoor wordt het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementerend recombinant virus uitermate klein (7; 9).

De adviesvraag

De COGEM is verzocht een advies uit te brengen over handelingen met FIV getransduceerde animale cellen. In de betreffende lentivirale vector zijn sequenties gekloneerd die coderen voor eiwitten betrokken bij reproductie, genetische ziekten, bloedstolling, atherosclerose, interactie endotheelcellen/T-cellen, neurotransmissie en cAMP respons. In de FIV vector is het *env* gen vervangen door het gen dat codeert voor het glycoproteïne G van het vesicular stomatitis virus (VSV-G). Het VSV-G eiwit werkt co-receptor onafhankelijk. Door de aanwezigheid van het VSV-G kan het virus in principe dus iedere cel infecteren. Hierdoor heeft de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefseltropisme verkregen (4). De productie van de gepseudotyperde lentivirale virusdeeltjes, de infectie van animale cellen en handelingen met deze cellen worden voorgesteld om plaats te vinden in een ML-II ruimte.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder over handelingen met op HIV gebaseerde lentivirale vectoren geadviseerd (CGM/020823-05). HIV is een pathogeniteitsklasse 3 virus. In het betreffende advies worden aanvullende voorwaarden gesteld voor het uitvoeren van transductie-experimenten met zoogdiercellen en lentivirale vectoren van de derde generatie onder ML-II condities. Eén van de voorwaarden luidt dat de doelwitcellen vrij zijn van de lentivirussen HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus type 1* (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) andere non-humane lentivirussen.

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van een zelfinactiverende (SIN) FIV lentivirale vector. Een risico bij de productie van dit soort vectoren is het ontstaan van RCL die zich in het milieu kunnen verspreiden. Door gebruik te maken van een lentiviraal systeem, waarbij de genen over drie plasmiden verdeeld zijn met zo min mogelijk sequentieoverlap tussen de plasmiden, wordt dit risico sterk beperkt. Er zijn namelijk minimaal twee homologe recombinatie gebeurtenissen vereist, voordat RCL

kan worden gevormd. Voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCL vorming bij gebruik van deze FIV vectoren (9). De kans dat met deze zelfinactiverende FIV lentivirale vectoren RCL gevormd worden, is volgens de COGEM verwaarloosbaar klein.

Recombinatie

De genomorganisatie van FIV is eenvoudiger dan die van andere lentivirussen zoals HIV en SIV (9; 11). De homologie tussen het *rev* gen van FIV en andere lentivirussen is 41-45% (10). Ofschoon deze waarde mogelijk niet representatief is voor het gehele genoom is duidelijk dat de homologie gering is. Op grond van deze geringe homologie is het aannemelijk dat de overeenkomsten tussen de verschillende genproducten van FIV en andere lentivirussen ook gering is en functionele uitwisseling van genproducten niet of niet-efficiënt zal optreden (9; 10). Bovendien ontbreken in FIV enkele niet-structurele genen die wel voorkomen, en essentieel zijn, in andere lentivirussen (9; 11).

De gebruikte animale cellen (HEK 293T, Jurkat.E6.1 en THP-1) zijn veelgebruikte laboratoriumcellijnen en zijn geen primaire cellen uit mensen of dieren. De aanwezigheid van wildtype lentivirussen in de te gebruiken cellijnen is volgens de COGEM onwaarschijnlijk. Gezien het gegeven dat de cellijnen niet afkomstig zijn uit katachtigen (*Felidae*) is wildtype FIV niet in staat om deze cellijnen te infecteren (5; 12).

Op grond van bovengenoemde overwegingen is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat in de cellijnen recombinatie op kan treden tussen FIV en andere lentivirussen zoals HIV, HTLV en SIV. Derhalve acht de COGEM het aanvullende voorschrift "het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2 en andere non-humane lentivirussen" niet noodzakelijk voor de beschreven werkzaamheden met gepseudotypeerd FIV in animale cellijnen.

'Transpackaging'

Tijdens het kweken van de cellen en gedurende de infectie-experimenten bestaat er een kleine kans dat er contaminatie optreedt met andere lentivirussen. Het FIV RNA genoom kan vervolgens ingepakt worden in virusdeeltjes van HIV of SIV ('transpackaging'). Hierdoor kunnen bijvoorbeeld HIV virusdeeltjes ontstaan met het genoom van de FIV vector. Hoewel het onwaarschijnlijk is dat met een zelfinactiverende FIV vector er genomisch FIV RNA geproduceerd wordt in getranduceerde cellen, blijkt uit de literatuur dat 'transpackaging' van het FIV genoom door HIV of SIV en vice versa wel mogelijk is (1). Om het risico op 'transpackaging' verwaarloosbaar klein te maken adviseert de COGEM om een aanvullend voorschrift op te nemen waarin gesteld wordt dat handelingen met verschillende lentivirale viruskweken niet gelijktijdig in het veiligheidskabinet mogen plaatsvinden. Om de kans op contaminatie verder te minimaliseren is het tevens niet toegestaan de

handelingen met de getransduceerde cellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met een andere lentivirus-bevattende kweek 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.

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn indien de handelingen met de FIV getransduceerde cellijnen plaatsvinden op ML-II niveau met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd
- handelingen met verschillende lentivirale viruskweken mogen niet gelijktijdig in het veiligheidskabinet plaatsvinden en het is niet toegestaan handelingen met de getransduceerde cellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met een andere lentivirus-bevattende kweek in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden.

Referenties

1. Browning, M. T., Schmidt, R. D., Lew, K. A., and Rizvi, T. A. (2001). Primate and feline lentivirus vector RNA packaging and propagation by heterologous lentivirus virions. *J Virol* **75**, blz. 5129-40
2. Hartmann, K. (1998). Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet J* **155**, blz. 123-37
3. Johnston, J. C., Gasmi, M., Lim, L. E., Elder, J. H., Yee, J. K., Jolly, D. J., Campbell, K. P., Davidson, B. L., and Sauter, S. L. (1999). Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J Virol* **73**, blz. 4991-5000
4. Kafri, T. (2004). Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol Biol* **246**, blz. 367-90
5. Klimatcheva, E., Rosenblatt, J. D., and Planelles, V. (1999). Lentiviral vectors and gene therapy. *Front Biosci* **4**, blz. D481-96
6. Pedersen, N. C., Yamamoto, J. K., Ishida, T., and Hansen, H. (1989). Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* **21**, blz. 111-29

7. Poeschla, E. M., Wong-Staal, F., and Looney, D. J. (1998). Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* **4**, blz. 354-7
8. Rogers, A. B., Mathiason, C. K., and Hoover, E. A. (2002). Immunohistochemical localization of feline immunodeficiency virus using native species antibodies. *Am J Pathol* **161**, blz. 1143-51.
9. Saenz, D. T. and Poeschla, E. M. (2004). FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, blz. S95-104
10. Talbott, R. L., Sparger, E. E., Lovelace, K. M., Fitch, W. M., Pedersen, N. C., Luciw, P. A., and Elder, J. H. (1989). Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, blz. 5743-7
11. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
12. Yamamoto, J. K., Sparger, E., Ho, E. W., Andersen, P. R., O'Connor, T. P., Mandell, C. P., Lowenstine, L., Munn, R., and Pedersen, N. C. (1988). Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am J Vet Res* **49**, blz. 1246-58