



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 02-065/04.co1

Uw brief van
15 maart 2006

Kenmerk
CGM/060328-01

Datum
28 maart 2006

Onderwerp
Advies IG 02-065/04

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag over wijzigingsverzoek IG 02-065/04, getiteld 'Lentiviruses for long term gene expression in the liver' van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen in associatie met ratten. Het doel van het onderzoek is het ontwikkelen van een kunstlever bestaande uit een bioreactor gevuld met getransduceerde humane levercellen. Daarnaast is het doel het *in vivo* bestuderen van de uitrijping van deze cellen. De aanvrager verzoekt om de dierexperimenten te mogen uitvoeren in een D-I in plaats van DM-II ruimte.

Bij handelingen met lentivirale vectoren hebben de risico's die in ogenschouw genomen moeten worden betrekking op: 1) RCL-vorming tijdens de vectorproductie, 2) de aanwezigheid van vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes in het kweekmedium afkomstig van het oorspronkelijke inoculum en 3) mobilisatie van de ingebouwde vector door complementatie met mogelijk aanwezig replicatiecompetent lentivirus.

De COGEM acht de kans op RCL-vorming tijdens vectorproductie verwaarloosbaar klein gezien het gehanteerde productiesysteem. De COGEM is verder van mening dat de gehanteerde kweek- en wasprocedure na transductie van de cellen een enorme reductie van het inoculum bewerkstelligt waardoor de kans op aanwezigheid van vrije lentivirale deeltjes verwaarloosbaar klein is. Daarnaast is de kans op mobilisatie van de ingebouwde vector verwaarloosbaar klein door het gebruik van derde generatie SIN lentivirale vectoren en het hanteren van aanvullende voorschriften.

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij omlaagschaling van de beoogde handelingen, met in acht name van de aanvullende voorschriften, 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 stylized initial 'B' followed by a long horizontal stroke.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. R.C. Zwart

Omlaagschaling van werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen in associatie met ratten

COGEM advies CGM/060328-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van dierexperimenten met ratten in associatie met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. Het doel van het onderzoek is het *in vivo* bestuderen van de uitrijping van levercellen en het ontwikkelen van een kunstlever. Hiertoe heeft de aanvrager een genetisch gemodificeerde (gg) humane levercellijn vervaardigd. Hij verzoekt deze cellijn te gebruiken in de volgende twee experimenten op inperkingsniveau D-I:

- a) Transplantatie-experiment waarbij de gg-cellijn geïnjecteerd wordt in de milt van ratten.
- b) Kunstleverexperiment waarbij ratten in verbinding komen te staan met een kunstlever welke gevuld is met de gg-cellijn. Het plasma van de rat zal door de kunstlever geleid worden, alwaar het gedetoxificeerd wordt door de cellen. Vervolgens wordt het plasma weer teruggeleid naar de rat.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van lentivirussen en behoren tot de familie van de retrovirussen (*Retroviridae*). Als basis van de lentivirale vector wordt in deze studie gebruik gemaakt van het *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1). Het genoom van HIV-1 bevat behalve de structurele genen *gag*, *pol* en *env*, tevens zes genen (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* en *rev*) welke essentieel zijn voor replicatie en virulentie van het virus (1).

Lentivirale vectoren worden vaak gebruikt als effectief genoverdrachtsysteem waarmee een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel mogelijk is. Het voordeel van lentivirale vectoren is dat ze naast delende cellen ook niet-delende cellen kunnen infecteren.

Uit veiligheidsoogpunt is het belangrijk dat tijdens de productie van de vector geen replicatie-compotent lentivirus (RCL) kan ontstaan. De afgelopen jaren zijn daarom verschillende lentivirale vectorsystemen ontwikkeld. Het meest geavanceerde systeem is het derde generatie 'packaging' systeem. In dit systeem zijn de virale genen coderend voor *pol*, *gag*, *rev*, *VSVg*, *env* en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (2). De overige genen zijn niet nodig voor de vectorproductie

en daarom verwijderd. De systemen bevatten hierdoor minder dan 65% van de oorspronkelijke virale sequenties (3).

Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in vier plasmiden met een minimum aan overlappende sequenties, verkleint de kans op RCL-vorming aanzienlijk. Voor de vorming van een replicatiecompetent virus zijn nu namelijk minimaal drie recombinitie gebeurtenissen noodzakelijk. Daarnaast draagt het gebruik van self-inactivating (SIN) vectoren (zoals de gehanteerde lentivirale vector) bij aan een hogere bioveiligheid (3). Bij deze SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties verwijderd uit de 3'LTR. Hierdoor mist de vector na reverse transcriptie een functionele LTR. Dit heeft tot gevolg dat de sequenties van het 'packaging' signaal, dat vereist is voor het inpakken van virusdeeltjes, niet overgeschreven kunnen worden. De kans op mobilisatie van de vector na infectie met een complementierend recombinant virus is daarom uitermate klein (4).

In een eerder uitgebracht advies stelt de COGEM dat de kans op het ontstaan van RCL bij de productie van derde generatie lentivirale vectoren op grond van theoretische en ervaringsoverwegingen verwaarloosbaar klein wordt geacht. De COGEM acht het daarom niet noodzakelijk om het inoculum te testen op afwezigheid van RCL-vorming (5).

De adviesvraag

De aanvrager heeft reeds een vergunning om transductie-experimenten uit te voeren met zoogdiercellen en derde generatie lentivirale vectoren onder ML-II condities (IG 02-065). Tevens is het toegestaan om werkzaamheden met getransduceerde zoogdiercellen in associatie met proefdieren (waaronder ratten) uit te voeren op DM-II. Handelingen met cellen en weefsels afkomstig van deze dieren dienen plaats te vinden op ML-II.

Onder de hierboven genoemde vergunning is een humane levercellijn vervaardigd op ML-II. De cellijn is geïmmortaliseerd door primaire levercellen te transduceren met derde generatie lentivirale vectoren welke het humane telomerase reverse transcriptase gen (*hTERT*) bevatten. Deze getransduceerde cellijn wordt aangeduid als cBAL111. De aanvrager kweekt de cellen inmiddels al langer dan een jaar. De cellijn is negatief bevonden voor HIV RNA en het manteleiwit p24 (gecodeerd door het *gag* gen).

De aanvrager verzoekt om omlaagschaling naar D-I niveau van werkzaamheden met cBAL111 in associatie met proefdieren. Het betreft de volgende handelingen:

Transplantatie-experiment

De aanvrager wil bepalen of geïnjecteerde humane levercellen in de rat (met een verkleinde lever) *in vivo* tot volledige uitrijping kunnen komen. Hiertoe wordt de cellijn cBAL111 over een periode van twee dagen, twee maal getransduceerd met

derde generatie lentivirale vectoren ($moi=10$) welke het gen green fluorescent protein (*GFP*) bevatten (cBAL111-GFP). Nadat de cellen twee maal gewassen zijn, vindt gedurende twee maanden celkweek plaats op ML-II niveau. In deze periode worden de cBAL111-GFP cellen zes maal gepasseerd en is het medium achttien maal ververst. De cellen worden getest op aanwezigheid van HIV RNA en p24 eiwit, waarna de aanvrager de cellen (50×10^6) op D-I niveau wil injecteren in de milt van de rat.

Na afloop van het experiment (maximaal vijf dagen) zullen cellen en weefsels van de rat bestudeerd worden met behulp van fluorescentie microscopie. Bureau GGO stelt voor om deze laatste handelingen op ML-I niveau in te schalen.

Kunstleverexperiment

De aanvrager wil met behulp van een kunstlever de levensduur van ratten met een geïnduceerd leverfalen verlengen. Het doel is om de kunstlever uiteindelijk te gaan gebruiken ter ondersteuning van patiënten met acuut leverfalen. Het centrale onderdeel van de kunstlever vormt een bioreactor gevuld met cellen. Op dit moment zijn dit varkenslevercellen, maar vanwege xenotransplantatie-gerelateerde problemen bij gebruik in de kliniek, wil de aanvrager de humane cellijn cBAL111 gaan gebruiken.

De bioreactor wordt één dag voor het experiment gevuld met cBAL111 cellen (250×10^6 ; negatief voor *GFP*) op ML-II. De cellen hechten zich aan de wand van de bioreactor en op de dag van het experiment wordt het gehele systeem geprimed met donorbloed van een rat. De aanvrager geeft niet aan op welk inperkingsniveau het primen plaatsvindt.

De ratten worden, onder D-I inperking, aangesloten op de bioreactor. Tijdens het experiment wordt het bloed vanuit de halsslagader van de rat in eerste instantie over een kolom gescheiden in bloedplaatjes en plasma. Het plasma wordt hierna door de bioreactor geleid waar het in contact komt met de getransduceerde cBAL111 cellen. De aanvrager verwacht dat de cellen het plasma detoxificeren en voorzien van gunstige leverspecifieke eiwitten. Vervolgens wordt het plasma weer samengevoegd met de bloedplaatjes en teruggeleid naar de rat via de grote halsader. De rat blijft aangesloten op de bioreactor totdat het dier overlijdt. Naar verwachting duurt dit maximaal 22 uur. Na overlijden wordt autopsie gepleegd en worden de organen uitgenomen voor microscopie. Het Bureau GGO stelt voor om handelingen met cellen en weefsels op ML-I in te schalen.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over omlaagschaling van handelingen met derde generatie lentiviraal getransduceerde humane levercellen in associatie met proefdieren. Hierbij hebben de risico's die in ogenschouw genomen moeten worden,

betrekking op de vorming van RCL, op de aanwezigheid van vrije niet-replicerende lentivirale vectordeeltjes en op mobilisatie van de ingebouwde vector.

Bij incidenten, zoals morsen of prikken, zouden laboratoriummedewerkers besmet kunnen raken met vrije lentivirale vectordeeltjes. Medewerkers zullen geen HIV ontwikkelen omdat de genen verantwoordelijk voor replicatie en virulentie van lentivirussen uit de vector verwijderd zijn. Eventueel is het mogelijk dat de virusvector integreert in het DNA waardoor theoretisch tumoren kunnen ontstaan. Derhalve dient bij experimenten met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen, op een lager inperkingsniveau dan ML-II of DM-II, zeker gesteld te worden dat infectieuze vectordeeltjes in het inoculum en in de celkweek afwezig zijn. De wijze waarop hierin wordt voorzien komt in het vervolg van het advies nader aan de orde.

RCL-vorming

Zoals in een eerder uitgebracht advies van de COGEM gesteld is, is het niet noodzakelijk om de virusbatch te testen op afwezigheid van RCL (5). Voor de vorming van RCL zijn minimaal drie recombinatie gebeurtenissen vereist (3). Daarnaast worden in het systeem de zogenaamde accessory genen, welke vereist zijn voor replicatie van lentivirussen, niet gebruikt. Tot op heden is voor zover bekend nog nooit melding gemaakt van RCL-vorming bij de productie van dergelijke lentivirale vectoren (7). Bij de experts van de COGEM is bekend dat in het verleden bij het Salk Institute for Biological Studies in La Jolla (Verenigde Staten) experimenten zijn uitgevoerd om RCL-vorming te bewerkstelligen. Deze experimenten hebben niet geleid tot de vorming van RCL. Naar aanleiding hiervan heeft daarom binnen het desbetreffende instituut omlaagschaling van inperkingsniveau BSL-III (inrichtings- en werkvoorschriften zijn vergelijkbaar met een ML-III laboratorium) naar BSL-II plaatsgevonden voor handelingen met de beschreven lentivirale vectoren (8). Naar de mening van de deskundigen blijkt uit de ongepubliceerde data van de experimenten dat het onmogelijk is om RCLs te verkrijgen. De COGEM is daarom van mening dat de kans op RCL- vorming tijdens de vectorproductie, bij gebruik van derde generatie lentivirale vectoren, verwaarloosbaar klein is.

Reductie vrije lentivirale deeltjes

Na transductie van cellen kunnen vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes, afkomstig uit overgebleven oorspronkelijk inoculum, achterblijven in het kweekmedium. De cellijnen cBAL-111 en cBAL-111-GFP worden na transductie twee maal gewassen, minimaal twee maanden gekweekt, achttien maal ververst en zes maal gepasseerd alvorens dierexperimenten plaatsvinden. Deze kweekprocedure reduceert het aantal vrije lentivirale deeltjes aanzienlijk. De stabiliteit van virale vectoren is onder andere afhankelijk van de temperatuur. Bij 37°C is de halfwaardetijd circa 10 uur (9). Aangezien de getransduceerde humane cellen worden gekweekt bij 37°C, zal de

oorspronkelijke hoeveelheid lentivirale vector na twee maanden met een factor 2^{144} ($=2,2 \times 10^{43}$) afgenomen zijn.

De afname van vrije lentivirale deeltjes wordt versterkt door de cellen tijdens het kweken een aantal malen te wassen. Het verversen van medium wordt tevens aangemerkt als wasstap. Elke wasstap reduceert het aantal aanwezige deeltjes met een factor 20. Dit betekent voor de onderhavige situatie een verdere reductie van 20^{20} ($=1,0 \times 10^{26}$).

Ten slotte worden de cellen een aantal malen gepasseerd door gebruik te maken van een trypsine-oplossing. Van trypsine is bekend dat het HIV-1 inactiveert. Elke behandeling reduceert het aantal aanwezige lentivirale deeltjes met een factor 200. Dit komt neer op een additionele reductie van 200^6 ($=6,4 \times 10^{13}$) (10).

Gezien het bovenstaande zou de totale reductie van lentivirale deeltjes $2^{144} \times 20^{20} \times 200^6 = 1,4 \times 10^{83}$ bedragen. Hoewel in de vergunningaanvraag geen titer van het inoculum wordt vermeld, is de enorme reductie zodanig zijn dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog vrije lentivirale deeltjes na de kweekprocedure aanwezig zijn.

Mobilisatie van de vector

Wanneer vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes door een cel worden opgenomen, verliezen de deeltjes hun membraan en envelopeiwitten. Hierdoor verliezen de deeltjes het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij het openbreken van cellen zullen daarom geen infectieuze replicatiedeficiënte deeltjes vrijkomen.

Indien in het uitzonderlijke geval de cellijnen besmet zijn met replicatiecompetente wild-type lentivirussen zou complementatie kunnen optreden, met eventueel mobilisatie van ingebouwde vectoren als gevolg. Recent onderzoek heeft uitgewezen dat in bijzondere situaties (onder laboratoriumomstandigheden) genomische transcripten kunnen ontstaan afkomstig van de ingebouwde lentivirale vector in getransduceerde hematopoietische cellen. De genomische transcripten kunnen na co-infectie met HIV-1, recombinante replicatiecompetente vectordeeltjes vormen (11). Het is daarom van belang dat de gehanteerde cellen tijdens celkweek handelingen vrij zijn van relevante lentivirussen.

Om de kans op mobilisatie van de vector tijdens handelingen met lentiviraal-getransduceerde animale cellen op ML-II niveau te minimaliseren, heeft Bureau GGO aanvullende voorschriften voorgesteld. De COGEM is van mening dat met het hanteren van deze voorschriften de kans op mobilisatie van de vector geminimaliseerd wordt. Het betreft:

1. het te gebruiken gastheer materiaal dient, naar blijkt uit uitgevoerde testen, vrij te zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen;

2. het is niet toegestaan handelingen met getransduceerde cellen uit te voeren binnen een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met andere virusbevattende kweken in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden;
3. open handelingen moeten in een veiligheidskabinet klasse-II worden uitgevoerd;
4. het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht.

De COGEM wijst erop dat mobilisatie van de ingebouwde vector door recombinatie met wildtype lentivirussen in proefdieren uit te sluiten is. Er zijn namelijk geen lentivirussen bekend die ratten kunnen infecteren.

Conclusie

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat de dierexperimentele handelingen kunnen plaatsvinden op D-I inperkingsniveau. De kans op RCL-vorming, op de aanwezigheid van vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes en op mobilisatie van de ingebouwde vector acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Bovendien minimaliseert de aanvrager eventuele risico's door te testen of de gehanteerde cellen virus- of vectordeeltjes bevatten door de aanwezigheid van HIV RNA en het eiwit p24 te bepalen.

Indien de bioreactor met cBAL111 cellen onverhoopt breekt acht de commissie de risico's verwaarloosbaar klein gezien de afwezigheid van RCL en lentivirale deeltjes.

De aanvrager vult de bioreactor met cBAL111 cellen op ML-II niveau, maar hij geeft niet aan op welk inperkingsniveau het nadien primen van de reactor met donorbloed plaatsvindt. De COGEM is van mening dat deze handeling kan plaatsvinden op D-I niveau. Doordat de aanwezigheid van RCL of lentivirale deeltjes in het kweekmedium nagenoeg uitgesloten is, is het risico op verspreiding verwaarloosbaar klein.

Handelingen met weefsels en cellen afkomstig uit proefdieren na afloop van het transplantatie- en kunstleverexperiment, kunnen naar de mening van de COGEM uitgevoerd worden op ML-I niveau. Ook hierbij geldt dat risico's verwaarloosbaar klein zijn omdat RCL en lentivirale deeltjes afwezig zijn. De COGEM acht het niet noodzakelijk om aanvullende voorschriften op te stellen voor deze werkzaamheden.

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij omlaagschaling van de beoogde werkzaamheden, met in acht neming van de aanvullende voorschriften, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. COGEM advies CGM/051215-01. COGEM (2005). Handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen.
6. Kafri, T. (2004). Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol Biol* **246**, blz. 367-390.
7. Sastry, L., Xu, Y., Johnson, T., Desai, K., Rissing, D., Marsh, J., and Cornetta, K. (2003). Certification assays for HIV-1-based vectors: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol Ther* **8**, blz. 830-9.
8. Spahn, G. Handling of lentiviral vectors derived from human immunodeficiency virus-1. The Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics. La Jolla, V.S.
9. Higashikawa, F. en Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**: 124-131.
10. Tang, S.B. en Levy, J.A. (1991). Inactivation of HIV-1 by trypsin and its use in demonstrating specific virus infection of cells. *J Virol Methods* **33**: 39-46.
11. Logan, A., Haas, D.L., Kafri, R. en Kohn, D.B. (2004). Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol* **78**(16): 8421-8436.