



Commissie Genetische Modificatie

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

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	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IG 05-020/01.co1	12 mei 2005	CGM/050527-01	27 mei 2005
Onderwerp			
Advies kennisgeving IG 05-020/1			

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van ontwerpbeschikking IG 05-020, getiteld "Lentiviraal gemedieerde transductie van hematopoietische stam/voorlopercellen" van het Erasmus Universitair Medisch Centrum te Rotterdam, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

In navolging op een eerder uitgebracht advies (CGM/050330-01) is de COGEM wederom gevraagd te adviseren over werkzaamheden met beenmergcellen die geïnfecteerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. Deze cellen zullen getransplanteerd worden in bestraalde apen. De aanvrager heeft destijds verzocht de werkzaamheden met de apen te mogen uitvoeren op DM-II niveau. De COGEM heeft toen geadviseerd de werkzaamheden in te schalen op DM-III niveau. Naar aanleiding van dit advies heeft de aanvrager de experimenten aangepast. De aanvrager verzoekt nu wederom om de dierexperimenten op een lager inperkingsniveau dan DM-III, uit te mogen voeren.

Voor aanvang van het experiment wordt het viruspreparaat getest op de aanwezigheid van lentivirussen die zich kunnen vermenigvuldigen (replicatie-competent lentivirus, RCL). De COGEM is van mening dat met de voorgestelde test niet kan worden uitgesloten dat de gebruikte virusbatch RCL bevat. Hiernaast is de COGEM van mening dat niet kan worden uitgesloten dat zich detecteerbare hoeveelheden infectieuze vectordeeltjes in het transplantaat bevinden op het moment dat dit aan de proefdieren wordt toegediend. Hierdoor is de kans aanwezig dat er infectieuze virusdeeltjes in het milieu terecht komen. De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu alleen gewaarborgd is als de voorgenomen dierexperimenten op minimaal DM-III plaatsvinden.

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

Titel: Transplantatie van lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen

COGEM advies: CGM/050527-01

Inleiding

Op 30 maart jl. heeft de COGEM advies (CGM/050330-01) uitgebracht betreffende het dossier IG 05-020, getiteld 'lentiviraal gemedieerde transductie van hematopoietische stam/voorlopercellen'. De COGEM is destijds verzocht te adviseren over de handelingen met resusapen (*Macaca mulatta*) in associatie met lentivirussen.

De aanvrager was voornemens om uit apen geïsoleerde hematopoietische stamcellen te infecteren met derde generatie 'self-inactivating' (SIN) lentivirale vectoren. Middels transfectie met specifieke lentivirale vectoren worden enkel een reporter-gen (GFP) of signaaltransductiegenen in combinatie met een reporter-gen (STAT5a-GFP, STAT5b-GFP) in de stamcellen tot expressie gebracht. Vervolgens worden de stamcellen getransplanteerd in de apen. De aanvrager verzocht om deze dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren. Daarnaast was de aanvrager voornemens handelingen (FACS analyse en fluorescentiemicroscopie) met cellen van de getransplanteerde apen uit te voeren in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking).

De COGEM heeft destijds in het advies gesteld dat niet kan worden uitgesloten dat in de te gebruiken lentivirusbatch, replicatie-competent lentivirus (RCL) aanwezig is. Bovendien is het mogelijk dat in het transplantaat van de getransduceerde stamcellen nog vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn. Hierdoor is niet uitgesloten dat recombinante virussen met andere (virulente) eigenschappen gevormd worden als gevolg van recombinitie tussen de toegediende infectieuze lentivirale vectordeeltjes en de in de aap aanwezige (onbekende) wildtype lentivirussen. De COGEM was derhalve van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gewaarborgd is indien de aangevraagde dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau uitgevoerd worden. Dit gold tevens voor de microscopische analyses van getransduceerde cellen buiten inperking.

De COGEM adviseerde daarom de handelingen met apen in associatie met lentivirale vectoren minimaal op DM-III inperkingsniveau in te schalen. Tevens adviseerde de COGEM om de microscopische analyses van getransduceerde cellen uit te voeren op minimaal ML-II inperkingsniveau.

Nieuwe adviesvraag

De aanvrager heeft naar aanleiding van het hierboven beschreven COGEM advies, het protocol voor het experiment gewijzigd. De wijzigingen betreffen:

- Veranderde methodologie voor het aantonen van de afwezigheid van RCL in de gebruikte lentivirusbatch.
- Opnemen van een test ter bepaling van de eventueel aanwezige virussen in de te gebruiken resusapen.
- Inactivatie van eventuele lentivirale partikels met behulp van een 0,25% trypsine behandeling.
- Fixatie van celpreparaten met behulp van een 4% paraformaldehyde-oplossing ten behoeve van microscopische en FACS experimenten.

Met inachtneming van deze wijzigingen verzoekt de aanvrager wederom de handelingen met apen geassocieerd met lentivirale vectoren uit te voeren op DM-II niveau.

Voor een beschrijving van de uitgebreide proefopzet wordt verwezen naar het vorige COGEM advies dat over deze aanvraag is uitgebracht (CGM/050330-01)

Overwegingen en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van een zelfinactiverende (SIN) derde generatie lentivirale vector. Een risico bij de productie van lentivirale vectoren is het ontstaan van RCL die zich in het milieu kunnen verspreiden. Door gebruik van het derde generatie lentivirale systeem zijn minimaal drie homologe recombinatie gebeurtenissen vereist, voordat RCL kan worden gevormd (1). Voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCL vorming bij gebruik van deze vectoren (2). In onderhavige aanvraag is echter sprake van een verzoek om met lentivirale vectoren getransduceerde hematopoietische stamcellen in apen te transplanteren. Gezien het feit dat lentivirussen goed kunnen repliceren in primate cellen acht de COGEM het in het kader van het voorzorgsprincipe van belang dat de virusbatch voor transductie wordt gecontroleerd op de vorming van RCL.

Test voor aanwezigheid replicatie competent lentivirus

Voordat de lentivirale virusbatch wordt gebruikt in de experimenten zal deze eerst getest worden op de afwezigheid van RCL. In de RCL test wordt gebruik gemaakt van SupT1 cellen omdat wildtype HIV in deze cellen kan repliceren. Bovendien zijn deze cellen goed transduceerbaar door lentivirale vectoren.

Tijdens de RCL test worden SupT1 cellen geïnfecteerd met 6 ml virushoudend supernatant. De getransduceerde cellen worden 2 weken gekweekt en vervolgens wordt het kweksupernatant overgezet op verse cellen. Deze cellen worden vervolgens geanalyseerd voor GFP expressie.

De COGEM acht het protocol voor de RCL test niet toereikend. Indien eventueel aanwezig RCL tijdens een recombinatiegebeurtenis het GFP gen zou verliezen (dit is namelijk niet essentieel voor replicatie) zou de RCL in dit geval niet worden

opgemerkt. De COGEM is derhalve van mening dat de beschreven testmethoden voor het vaststellen van afwezigheid van RCL in de virusbatch niet afdoende is en dat aan de hand van deze test niet geconcludeerd kan worden dat de virusbatch vrij is van RCL. Om dit wel met zekerheid te kunnen vaststellen kan er gebruik gemaakt worden van een 'marker rescue assay' in SupT1 cellen met daarin een geïntegreerd mobiliseerbare lentivirusvector.

Als is vastgesteld dat de virusbatch geen RCL's bevat kan er echter nog steeds contaminatie met andere virussen tijdens het kweken van de cellen optreden. De COGEM adviseert een aanvullend voorschrift op te nemen (onderdeel 2 van het voorstel tot inschaling), waarin gesteld wordt dat handelingen met verschillende 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 binnen een tijdsbestek van 30 minuten nadat handelingen met een andere virusbevattende kweek in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden.

Aanwezigheid vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes

De uit de apen geïsoleerde hematopoietische stamcellen worden minimaal 24 uur blootgesteld aan de lentivirale deeltjes. De getransduceerde cellen worden vervolgens tweemaal gewassen met fysiologische zoutoplossing waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd. Hierna worden de cellen gedurende 5 minuten bij 37°C blootgesteld aan een 0,25% (2500 µg/ml) trypsine oplossing. Vervolgens wordt nog eenmaal gewassen met fysiologische zoutoplossing. In vergelijking met de eerdere aanvraag is een extra wasstap en trypsinebehandeling toegevoegd.

Na de wasstappen zullen de getransduceerde cellen getransplanteerd worden in de apen. Zodra het transplantaat in de dieren is ingespoten is het risico van een eventueel infectieus virus zeer klein geworden omdat de gebruikte vector slechts met zeer lage efficiëntie infectieus is voor apencellen (4). De mate infectie is echter afhankelijk van de hoeveelheid vrije lentivirale deeltjes die nog in het transplantaat aanwezig zijn.

In onderhavig experiment worden de stamcellen slechts 24 uur blootgesteld aan de lentivirale deeltjes. Gezien de halfwaardetijd van het virus (10 uur) is de mate van reductie van de nog aanwezige vrije virale deeltjes hierdoor beperkt. Door de twee wasstappen die hierop volgen vindt een verdere reductie plaats. In het vorige advies (CGM/050330-01) is aangegeven dat na afloop van de wasstappen nog zeer waarschijnlijk infectieuze lentivirale deeltjes in het transplantaat aanwezig zullen zijn. Inactivatie van deze vrije virale deeltjes met bijvoorbeeld trypsine is daarom noodzakelijk. In de aanvraag wordt alleen het minimale aantal cellen genoemd dat aan de apen toegediend zal worden. Het werkelijke aantal toe te dienen cellen is niet bekend. Daardoor kan geen uitspraak worden gedaan over het aantal lentivirale deeltjes dat zal worden toegediend. Derhalve acht de COGEM het noodzakelijk dat

voorafgaand aan het experiment wordt getest of de trypsinebehandeling effectief is en er geen vrije lentivirale deeltjes meer aanwezig zijn in het preparaat.

Transplantatie getransduceerde stamcellen in apen

De aanvrager heeft aangegeven de experimenten met apen te willen uitvoeren onder DM-II inperking. Zoals in het vorige advies vermeld, is de COGEM van mening dat het uitvoeren van de betreffende dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau alleen kan worden toegestaan indien tenminste aan onderstaande voorwaarden voldaan is:

- het te gebruiken gastheer materiaal is aantoonbaar vrij van *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1), HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1) en HTLV-2, *Simian T-cell lymphotropic virus* (STLV), *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere lentivirussen;
- de virusbatch is met een gevalideerde en algemeen geaccepteerde methode gecontroleerd op aanwezigheid van RCL;
- getransduceerde hematopoietische cellen zijn op het moment van transplantatie vrij van infectieuze lentivirale vectordeeltjes;
- apen worden na transplantatie maandelijks getest op aanwezigheid van RCL

Daarbij acht de COGEM het dragen van handschoenen verplicht bij het uitvoeren van de dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau.

De aanvrager heeft aangegeven de apen voorafgaand aan de transplantatie 6 weken in quarantaine te houden en ze gedurende deze periode te testen op verschillende virussen waaronder HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, STLV, en SIV. Hiernaast test zij de virusbatch op aanwezigheid van RCL. De COGEM is van mening dat de voorgestelde methode om de aanwezigheid van eventuele RCL aan te tonen niet volstaat. Omdat de stamcellen in aanwezigheid van de virusdeeltjes slechts 24 uur gekweekt worden en niet bekend is hoeveel lentivirale deeltjes gebruikt zullen worden tijdens het experiment is de COGEM van mening dat, met behulp van het door de aanvrager voorgestelde protocol, niet kan worden vastgesteld of de getransduceerde stamcellen op het moment van transplantatie vrij zijn van infectieuze lentivirale vectordeeltjes.

Derhalve acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu onvoldoende gewaarborgd indien de voorgestelde dierexperimenten onder DM-II condities worden uitgevoerd. De COGEM is van mening dat de door de aanvrager voorgestelde experimenten met lentivirale vectoren in combinatie met apen ingeschaald dienen te worden op DM-III niveau in een isolator of op DM-III niveau met aanvullende voorschriften, zoals die worden gebruikt voor de inschaling van vol-virulent HIV-1 in associatie met apen (CGM/020823-05).

Het uitvoeren van de betreffende dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau kan volgens de COGEM alleen toegestaan worden indien het protocol voor de detectie

van RCL in de gebruikte virusbatch wordt aangepast. Hiernaast dient aangetoond te worden dat het transplantaat vrij is van lentivirale deeltjes voordat het in de apen getransplanteerd wordt.

Analyse van cellen buiten inperking

De aanvrager is voornemens cellen afkomstig van de apen met behulp van FACS analyse en fluorescentiemicroscopie buiten inperking te bestuderen. Het betreft ondermeer getransduceerde hematopoietische cellen vóórdat ze getransplanteerd worden en bloed en beenmergcellen van getransplanteerde apen. Hiertoe worden de cellen gefixeerd in een 4% paraformaldehyde oplossing. De COGEM is van mening dat deze methode adequaat is om celsuspensies te inactiveren. Derhalve acht de COGEM de FACS analyse en fluorescentiemicroscopie buiten inperking gerechtvaardigd.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat niet kan worden uitgesloten dat, in de experimenten te gebruiken virusbatch, RCL's aanwezig zijn en dat in het transplantaat van de getransduceerde hematopoietische cellen nog vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn. Hierdoor is het niet uitgesloten dat infectieuze virusdeeltjes in het milieu zullen vrijkomen. De COGEM is derhalve van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gewaarborgd is indien de dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau uitgevoerd worden. De COGEM adviseert daarom de handelingen met apen in associatie met lentivirale vectoren op minimaal DM-III inperkingsniveau in te schalen.

Signalering

De COGEM uit haar twijfels bij de onderhavige experimenten waarbij apen ingezet worden. In de studie worden resusapen (*Macaca malutta*) getransplanteerd met autoloog beenmerg dat getransduceerd is met een op HIV-1 gebaseerde lentivirale vector. De HIV-1 gebaseerde lentivirale vector zoals in de aanvraag is beschreven, is alleen bij een extreem hoge 'multiplicity of infection' (MOI) in staat de cellen van de resusaap te transduceren (4). Een bepaalde sequentie in de nucleaire capsid van de lentivirusvector maakt het virus gevoelig voor een restrictiefactor (TRIM5a) in apencellen waardoor replicatie zeer sterk geremd wordt (5).

Bij een lage MOI = 1 zoals nu wordt voorgesteld zullen de stamcellen van de aap slechts in zeer geringe mate getransduceerd worden. De COGEM vraagt zich af of het doel van het experiment om te onderzoeken of de getransplanteerde beenmergcellen in de apen overleven en of het transgen tot expressie komt, op deze wijze gerealiseerd kan worden.

Referenties

1. 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. *Journal of Virology* **72**, blz. 9873-80
2. 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
3. Tang S, Levy JA (1991). Inactivation of HIV-1 by trypsin and its use in demonstrating specific virus infection of cells. *Journal of virological methods* **33**: 39-46
4. Kootstra NA, Münk C, Tonnu N, Landau NR, Verma IM (2003). Abrogation of postentry restriction of HIV-1 based lentiviral vector transduction in simian cells. *PNAS* **100**: 1298-1303
5. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiesling M, Autissier P, Sodroski J (2004). The cytoplasmic body component Trim5 α restricts HIV-1 infection in old world monkeys. *Nature* **427**: 848-853