

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

Datum: 2 mei 2006
Kenmerk: CGM/060502-05
Onderwerp: Advies IG 05-020

Geachte heer van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende de aanvraag: “Lentiviraal gemedieerde transductie van hematopoietische stam/voorlopercellen” van het Erasmus Universitair Medisch Centrum te Rotterdam, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over dossier IG 05-020. Het doel van het onderzoek is om na te gaan of transgene beenmergcellen in apen overleven en om de ontwikkeling van deze transgene stamcellen te volgen. Om de beenmergcellen te kunnen volgen zijn ze voorzien van een marker middels genetische modificatie. De aanvrager is hiertoe voornemens om uit apen geïsoleerde hematopoietische stamcellen te infecteren met behulp van derde generatie replicatiedeficiënte lentivirale vectoren.

In het verleden heeft de COGEM tweemaal over deze aanvraag negatief geadviseerd. Destijds kon niet worden uitgesloten dat zich detecteerbare hoeveelheden vrije infectieuze replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes in het transplantaat bevinden op het moment dat dit aan de proefdieren werd toegediend. Naar aanleiding van de adviezen heeft de aanvrager de testen aangepast welke om advies aan de COGEM zijn voorgelegd.

De door de aanvrager voorgestelde testen voor het detecteren van de vrije infectieuze replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes (p24 ELISA en HIV-gag PCR) zijn volgens de COGEM echter ongeschikt, aangezien hiermee alleen replicatiecompetente lentivirussen aangetoond kunnen worden. Wel acht de COGEM de Amplicor monitor test geschikt voor de detectie van replicatiecompetente lentivirussen in de apen na transplantatie van de getransduceerde stamcellen.

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. R. C. Zwart

Beoordeling detectiemethoden voor replicatiecompetente lentivirale vectoren en vrije lentivirusdeeltjes

COGEM advies CGM/060502-05

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over het dossier IG 05-020, getiteld 'lentiviraal gemedieerde transductie van hematopoietische stam/voorlopercellen'. De aanvrager levert gegevens aan van aangepaste testen voor de detectie van lentivirusdeeltjes.

Op 30 maart en 27 mei 2005 heeft de COGEM ook over dit dossier geadviseerd (CGM/050330-01 en CGM/050527-01) (1; 2). De aanvrager was voornemens om uit resusapen (*Macaca mulatta*) geïsoleerde hematopoietische stamcellen te infecteren met derde generatie 'self-inactivating' (SIN) lentivirale vectoren. Middels transfectie met specifieke lentivirale vectoren zouden een reporter-gen (GFP) of signaaltransductiegenen in combinatie met een reporter-gen (STAT5a-GFP, STAT5b-GFP) in de stamcellen tot expressie gebracht worden. Vervolgens zouden de stamcellen in de apen getransplanteerd worden. De aanvrager verzocht om deze dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren. Daarnaast was de aanvrager voornemens handelingen (FACS analyse en fluorescentiemicroscoop) 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 beide adviezen gesteld dat de door de aanvragers opgestelde wetenschappelijke onderbouwing onvoldoende was om uit te kunnen sluiten dat in het transplantaat van de getransduceerde stamcellen nog vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig waren. (1; 2). Na transplantatie van de getransduceerde stamcellen is de kans aanwezig dat recombinatie optreedt tussen de toegediende infectieuze lentivirale vectordeeltjes en de in de aap aanwezige (onbekende) wildtype lentivirussen, waardoor recombinante virussen met andere (virulente) eigenschappen gevormd worden. De COGEM was daarom 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 (1; 2).

Adviesvraag

De aanvrager heeft naar aanleiding van de COGEM adviezen CGM/050330-01 en CGM/050527-01 aangepaste testen voorgesteld om de eventuele aanwezigheid van replicatiecompetente virussen in de virusbatch en de aanwezigheid van vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes in het transplantaat aan te tonen. Daarnaast levert de aanvrager gegevens over een test om de aanwezigheid van mogelijke recombinante replicatiecompetente lentivirussen in apen aan te tonen na transplantatie.

In de test voor het bepalen van replicatiecompetente lentivirussen (RCL) in de virusbatch zal gebruik gemaakt worden van C8166T cellen. Deze cellen zullen geïncubeerd worden met 5% van de virusbatch, waarbij de titer van de virusbatch 10^9 transfectie units (TU) per milliliter bevat. Indien in de virusbatch RCL's aanwezig zijn dan zullen deze zich kunnen vermeerderen in C8166T cellen. Als positieve controle van de test wordt gebruik gemaakt van een replicatiecompetent virus. De aanvrager geeft aan dat de test uitgevoerd wordt door een commercieel bedrijf, GenoSafe. Na meerdere dagen kweken wordt het medium van de cellen verzameld waarin mogelijke RCL's zich bevinden. De aanwezigheid van lentivirale virusdeeltjes wordt bepaald middels een p24 ELISA. De detectielimiet is volgens de aanvrager 1 TCID₅₀ per $5,1 \cdot 10^7$ TU. De TCID₅₀ betekent 'tissue culture infecting dose' en bepaalt de concentratie van een virus die bij de helft van de cellen in een cultuur infectie veroorzaakt.

De verwijdering van aanwezige vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes vindt plaats door de cellen te incuberen met trypsine. De bepaling van de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes wordt volgens de aanvrager uitgevoerd middels een p24 ELISA. De detectielimiet is hierbij 1 TCID₅₀ in 10^6 getransduceerde cellen. Tevens geeft de aanvrager aan dat vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes in het transplantaat gemeten kunnen worden aan de hand van het aantonen van HIV-gag RNA.

De aanwezigheid van recombinante replicatiecompetente lentivirussen in het proefdier na transplantatie van de getransduceerde stamcellen wordt bepaald middels de Amplicor monitor test van het commercieel bedrijf Roche. Dit is een PCR test waarmee HIV-gag RNA aangetoond kan worden in beenmerg en bloed. De detectielimiet van deze assay is 50-400 kopieën HIV-gag RNA per milliliter bloedplasma.

De COGEM is verzocht om de geschiktheid van de voorgelegde testen te beoordelen in het kader van de werkzaamheden beschreven in dossier IG 05-020.

Overwegingen en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van een zelfinactiverende (SIN) derde generatie lentivirale vector. Een mogelijk risico bij de productie van virale vectoren is het ontstaan van replicatiecompetente virussen die zich in het milieu kunnen verspreiden. Door gebruik van het derde generatie lentivirale systeem zijn minimaal drie homologe recombinitie gebeurtenissen vereist, voordat RCL kan worden gevormd (5; 9). Voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCL vorming bij gebruik van deze vectoren (8). De COGEM heeft in 2005 een werkgroep

ingesteld om de problematiek rond de vorming van RCL's bij de productie van lentivirale vectoren te onderzoeken. Eind van dat jaar heeft de COGEM een generiek advies (CGM/051215-01) uitgebracht, waarin ingegaan wordt op de afwezigheid van de noodzaak voor het testen op RCL. De COGEM heeft geconcludeerd dat de kans op de vorming van RCL bij derde generatie lentivirale productiesystemen verwaarloosbaar klein is en heeft daarom geadviseerd dat het testen op de aanwezigheid van RCL in de virusbatch achterwege kan blijven (3). De COGEM acht het daarom ook niet langer noodzakelijk dat de te gebruiken virusbatch gecontroleerd wordt op de aanwezigheid van RCL's.

Test voor aanwezigheid replicatiecompetent lentivirus

De COGEM is gevraagd te adviseren over de geschiktheid van de voorgestelde test om RCL's te detecteren. De virusbatch zal volgens de aanvragers getest worden op aanwezigheid van RCL middels een amplificatietest op C8166T cellen. In de RCL test wordt gebruik gemaakt van C8166T cellen, omdat wildtype HIV in deze cellen kan repliceren. Bovendien zijn deze cellen goed transduceerbaar door lentivirale vectoren (6). De COGEM is van mening dat de C8166T cellen geschikt zijn voor de replicatie van eventueel aanwezige RCL's in de virusbatch.

Replicatiecompetente virusdeeltjes (RCL's) worden gedetecteerd aan de hand van de aanwezigheid van het p24 eiwit in het medium. Het p24 eiwit wordt gecodeerd door het virale HIV-*gag* gen en is onderdeel van de mantel van het virus. Eventueel aanwezige RCL's in de virusbatch zullen na een aantal dagen kweken vermeerderd worden, waardoor de hoeveelheid p24 eiwit in de celweek sterk zal toenemen. Detectie van het p24 eiwit vindt plaats met een immunologische assay (ELISA). De COGEM is van mening dat deze internationaal geaccepteerde test geschikt is voor de detectie van RCL's.

Aanwezigheid vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes

De geïsoleerde hematopoïetische stamcellen zullen worden blootgesteld aan de lentivirale deeltjes. De aanvrager geeft aan dat de getransduceerde cellen een aantal keren gewassen worden met onder andere trypsine om vrije infectieuze virusdeeltjes te verwijderen. Om aan te tonen dat het transplantaat vrij is van detecteerbare hoeveelheden vrije infectieuze virusdeeltjes, stelt de aanvrager een p24 ELISA voor.

De detectielimiet van de p24 ELISA die hierbij genoemd wordt, is 1 TCID₅₀ in 10⁶ getransduceerde cellen. De gevoeligheid van de ELISA assay wordt echter uitgedrukt in het aantal virusdeeltjes (TCID₅₀). Met deze door de aanvrager verstrekte gegevens is het voor de COGEM niet inzichtelijk wat de werkelijke gevoeligheid van de gebruikte assay is. Daarnaast geeft de TCID₅₀ alleen informatie over actief groeiend virus, oftewel replicatiecompetent virus. Gezien de productiewijze van de virusbatch, zullen de stamcellen alleen geïnfecteerd worden met replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes. De COGEM is van mening dat de beschreven p24 ELISA onvoldoende is om aan te tonen dat het transplantaat vrij is van detecteerbare hoeveelheden vrije infectieuze lentivirale virusdeeltjes.

Tevens geeft de aanvrager aan dat vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes in het transplantaat ook gemeten kunnen worden aan de hand van het aantonen van HIV-gag RNA. Echter, de HIV-gag sequentie is niet aanwezig in de virale vector. Bij de productie van derde generatie lentivirale vectoren zijn de essentiële virale HIV genen over meerdere plasmiden verdeeld (4; 5; 7). Alleen het plasmide dat uiteindelijk in het te vormen virusdeeltje terecht komt bevat het transgen en alle virale elementen die nodig zijn voor transductie en expressie van het transgen. Tevens bevat dit plasmide een signaalsequentie ('packaging' signaal) dat essentieel is voor het inpakken van het plasmide in het virusdeeltje. De overige plasmiden bevatten de virale genen, zoals het HIV-gag gen, die nodig zijn om een virusdeeltje te produceren. Deze plasmiden bevatten echter geen 'packaging' signaal en worden bij de totstandkoming van het virusdeeltje daardoor niet ingepakt. Dit betekent dat de geproduceerde replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes alleen het gag eiwit hebben, maar niet het HIV-gag gen. Dit gen is alleen aanwezig in de productiecellijn.

Door het detecteren van HIV-gag RNA in het transplantaat zouden daarom alleen replicatiecompetente lentivirussen gedetecteerd kunnen worden die het HIV-gag gen dragen, maar geen vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes. De COGEM is daarom van mening dat de beschreven methode onvoldoende is om vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aan te tonen. De COGEM wijst erop dat zij in een eerder algemeen advies een methodiek heeft beschreven die gebruikt kan worden om een inschatting te kunnen maken van de reductie van het aantal vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes in getransduceerde zoogdiercellen (3).

Test op aanwezigheid RCL in proefdier na transplantatie

De aanvrager geeft aan dat de proefdieren na transplantatie van de getransduceerde stamcellen getest zullen worden op de aanwezigheid van recombinante replicatiecompetente lentivirussen. Met de voorgestelde commerciële Amplicor monitor test kan middels een PCR assay HIV-gag RNA aangetoond worden. De COGEM is van mening dat deze test adequaat en gevoelig genoeg is om eventueel aanwezige HIV RCL's in het bloed van het proefdier te detecteren.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat de beschreven testen voor het aantonen van RCL's in de virusbatch en in de apen na transplantatie van de getransduceerde stamcellen geschikt zijn. De door de aanvrager voorgestelde testen voor het detecteren van vrije infectieuze replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes zijn volgens de COGEM ongeschikt.

Referenties

1. COGEM advies CGM/050330-01, Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen.
2. COGEM advies CGM/050527-01, Lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen.
3. COGEM advies CGM/051215-01, Handelingen met door lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen.
4. Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6** Suppl 1, blz. S125-38.
5. 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.
6. Escarpe, P., Zayek, N., Chin, P., Borellini, F., Zufferey, R., Veres, G., and Kiermer, V. (2003). Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol Ther* **8**, blz. 332-41.
7. 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.
8. 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.
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.