



De minister van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 31 maart 2009
KENMERK CGM/090331-03
ADVIES Generiek advies: "handelingen met lentivirale vectoren"

Geachte mevrouw Cramer,

Hierbij bied ik u het generieke advies getiteld 'Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren' aan. Dit generieke advies biedt een overzicht over de inschaling die de COGEM adviseert voor de verschillende werkzaamheden met lentivirale vectoren.

Samenvatting:

Binnen het biomedisch en genetisch onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van virale vectoren die zijn afgeleid van lentivirussen. Dit wordt veroorzaakt door de capaciteit van deze virussen om zowel delende als niet-delende cellen te infecteren en hierin hun genoom stabiel te laten integreren. De laatste jaren is veel onderzoek verricht om efficiëntere en veiligere lentivirale vectorsystemen te ontwikkelen.

Volgens de Regeling GGO worden de laboratoriumwerkzaamheden met deze vectoren op basis van de indeling van lentivirussen in pathogeniteitsklasse 3 ingeschaald op ML-III of DM-III inperkingsniveau. Door de ontwikkeling van verbeterde productiesystemen, veiligere lentivirale vectoren en de toenemende kennis over en ervaring met dit type vectoren heeft de COGEM in de loop van de tijd verschillende malen geadviseerd de werkzaamheden met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met de zogenaamde tweede of derde generatie van productiesystemen omlaag te schalen.

Om een overzicht te geven over de inschaling en aanvullende voorschriften die de COGEM adviseert voor de verschillende werkzaamheden met lentivirale vectoren heeft zij bijgaand generiek advies opgesteld. Onder navolging van de in dit advies aangegeven inschaling en gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's van de verschillende werkzaamheden met lentivirale vectoren voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren

COGEM advies CGM/090331-03

Commissie Genetische Modificatie (COGEM)

De COGEM heeft tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van genetisch gemodificeerde organismen en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten van genetische modificatie (Wet milieubeheer §2.3).

Inhoudsopgave

Samenvatting	5
1. Introductie.....	11
1.1. Lentivirus.....	12
1.2. Lentivirale productiesystemen.....	14
2. Risico's en risicobeheersing	19
2.1. Het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus.....	19
2.2. De aanwezigheid van vrije vectordeeltjes	20
2.3. Complementatie en mobilisatie van de vector.....	21
2.4. Geïnternaliseerde virusdeeltjes.....	22
3. In vitro gebruik van lentivirale vectoren	23
3.1. Algemeen.....	23
3.2. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de eerste generatie	23
3.3. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de tweede of derde generatie	24
3.3.1. De productie van lentivirale vectoren.....	24
3.3.2. Transductie van zoogdiercellen met lentivirale vectoren	25
3.3.3. Kweek en analyse van getransduceerde zoogdiercellen.....	27
3.4. Handelingen met lentiviralevectoren geproduceerd met het Lenti-X of translentiviraal packagingsysteem.....	30
3.4.1. De productie van lentivirale vectoren.....	30
3.4.2. Transductie van zoogdiercellen met lentivirale SIN en niet-SIN vectoren	30
3.4.3. Kweek en analyse van getransduceerde zoogdiercellen.....	31
4. In vivo gebruik van lentivirale vectoren	33
4.1. Algemeen.....	33
4.2. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de eerste generatie	34
4.3. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de tweede of derde generatie	34
4.3.1. Transductie van dieren met lentivirale vectoren.....	34
4.3.2. Langdurige fok van lentiviraal getransduceerde dieren.....	36
4.3.3. Handelingen met cellen of weefsels afkomstig uit getransduceerde dieren	37
4.4. Handelingen met vectoren geproduceerd met het Lenti-X of het translentiviraal packagingsysteem.....	39
5. Conclusie	41
Referenties.....	43

Samenvatting

Binnen het biomedisch en genetisch onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van virale vectoren die zijn afgeleid van lentivirussen. Dit wordt veroorzaakt door de capaciteit van deze virussen om zowel delende als niet-delende cellen te infecteren en hierin hun genoom stabiel te laten integreren. De laatste jaren is veel onderzoek verricht om efficiëntere en veiligere lentivirale vectorsystemen te ontwikkelen.

Volgens de Regeling GGO worden de laboratoriumwerkzaamheden met deze vectoren op basis van de indeling van lentivirussen in pathogeniteitsklasse 3 ingeschaald op ML-III of DM-III inperkingsniveau. Door de ontwikkeling van verbeterde productiesystemen, veiligere lentivirale vectoren en de toenemende kennis over en ervaring met dit type vectoren heeft de COGEM in de loop van de tijd verschillende malen geadviseerd de werkzaamheden met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met de zogenaamde tweede of derde generatie van productiesystemen omlaag te schalen.

Om een overzicht te geven over de inschaling en aanvullende voorschriften die de COGEM adviseert voor de verschillende werkzaamheden met lentivirale vectoren heeft zij bijgaand generiek advies opgesteld. Aangezien de tot op heden afgegeven COGEM adviezen niet alle werkzaamheden met de verschillende lentivirale vectoren omvatten, heeft de COGEM ter voorkoming van lacunes in dit generieke advies tevens enkele niet eerder uitgebrachte inschalingsadviezen opgenomen. De belangrijkste richtlijnen voor de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren staan hieronder samengevat in respectievelijk tabel 1 en tabel 2. Tevens heeft de COGEM voor deze werkzaamheden een zogenaamde beslisboom ontwikkeld, die als handleiding kan dienen om op de juiste inschaling uit te komen. De beslisbomen voor de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden staan weergegeven in respectievelijk figuur 1 en figuur 2.

Voor een mogelijke omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren acht de COGEM het noodzakelijk dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van lentivirussen, die de gastheercellen kunnen infecteren. Als de toegepaste lentivirale vector bovendien een zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vector is en geproduceerd is met het productiesysteem van de tweede of derde generatie adviseert de COGEM de vectorproductie omlaag te schalen naar ML-II inperkingsniveau.

De infectie van zoogdiercellen met lentivirale vectoren adviseert de COGEM ook op ML-II niveau in te schalen indien de gebruikte vector een niet-SIN vector is. Daarvoor moet wel aangetoond zijn dat de virusbatch vrij is van replicatiecompetent lentivirus (RCL).

De kweek en analyse van getransduceerde cellen kan voor lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het productiesysteem van de tweede of derde generatie op ML-I niveau ingeschaald worden, als er op theoretische gronden vanuit gegaan kan worden dat er geen infectieuze virusdeeltjes meer in de kweek aanwezig zijn. Voor deze inschaling geldt ook de voorwaarde dat in geval van een niet-SIN vector de virusbatch geen RCL dient te bevatten.

De recent ontwikkelde translentivirale of Lenti-X productiesystemen zijn volgens de COGEM qua veiligheid goed te vergelijken met het productiesysteem van de derde generatie. Voor *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren die zijn geproduceerd met de translentivirale of Lenti-X productiesystemen wordt daarom dezelfde inschaling gehanteerd als voor de lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het productiesysteem van de derde generatie. In tabel 1 staat een overzicht over de geadviseerde inschaling en aanvullende voorschriften voor de verschillende *in vitro* werkzaamheden.

Voor omlaagschaling van de *in vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren acht de COGEM het essentieel dat de dieren geen lentivirussen bevatten. Onder deze voorwaarde adviseert de COGEM de werkzaamheden met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het productiesysteem van de tweede generatie op inperkingsniveau DM-II in te schalen. De nakomelingen van getransduceerde dieren kunnen verder omlaag geschaald worden naar D-I niveau.

Voor *in vivo* werkzaamheden met een lentivirale SIN vector, die geproduceerd is met het productiesysteem van de derde generatie, het translentiviraal of het Lenti-X productiesysteem is de COGEM van mening dat de zogenaamde *in vivo* transductie op DM-II ingeschaald dient te worden. Onder de voorwaarde dat er geen infectieus virus meer aanwezig is, adviseert de COGEM de overige werkzaamheden verder omlaag te schalen naar D-I niveau. Een gedetailleerd overzicht over de inschaling en aanvullende voorschriften bij de verschillende *in vivo* werkzaamheden wordt weergegeven in tabel 2.

Tabel 1: Inschaling van in vitro werkzaamheden met lentivirale vectoren^a

Vector Handeling	2 ^e generatie productiesysteem met niet-SIN vector		2 ^e generatie productiesysteem met SIN vector		3 ^e generatie productiesysteem met SIN vector		Lenti-X of translentiviraal productiesysteem	
	Inschaling	Extra voorwaarden/voorschriften	Inschaling	Extra voorwaarden/voorschriften	Inschaling	Extra voorwaarden/voorschriften	Inschaling	Extra voorwaarden/voorschriften
Vector productie	ML-III	N.v.t.	ML-II	-Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij	ML-II	-Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij	ML-II	-Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij
Transductie van zoog- diercellen	ML-II	-Virusbatch RCL vrij ^b -Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij -Insleep preventie ^c	ML-II	-Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij -Insleep preventie ^c	ML-II	-Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij ^d -Insleep preventie ^c	ML-II	-Handschoenen dragen -Handelingen in VKK-II -Cellen lentivirus vrij -Insleep preventie ^c
Kweek en analyse van getransduceer- de cellen	ML-I	-Virusbatch RCL vrij ^b -Handschoenen dragen -Cellen lentivirus vrij -Insleep preventie ^c -Werkoppervlak ontsmetten -Voor gesloten handeling: $R_r \geq 1$ -Voor open handeling: $R_r \geq 100$	ML-I	-Handschoenen dragen -Cellen lentivirus vrij -Insleep preventie ^c -Werkoppervlak ontsmetten -Voor gesloten handeling: $R_r \geq 1$ -Voor open handeling: $R_r \geq 100$	ML-I/ geen inperking	-Handschoenen dragen -Cellen lentivirus vrij ^c -Insleep preventie ^c -Werkoppervlak ontsmetten -Voor gesloten handeling: $R_r \geq 1$ -Voor open handeling: $R_r \geq 100$	ML-I	-Handschoenen dragen -Cellen lentivirus vrij -Insleep preventie ^c -Werkoppervlak ontsmetten -Voor gesloten handeling: $R_r \geq 1$ -Voor open handeling: $R_r \geq 100$

^a Alle *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren geproduceerd met 1^e generatie productiesysteem worden ingeschaald op ML-III

^b RCL-test op virusbatch dient uitgevoerd te worden op ML-III niveau

^c Ter voorkoming van contaminatie van de cellen met lentivirus gedurende de werkzaamheden

^d Voor primaire humane cellen is de test op lentivirus niet noodzakelijk

^e Voor primaire humane cellen is de test op lentivirus niet noodzakelijk, tenzij het een open handeling buiten inperking betreft

R_r: reductieratio

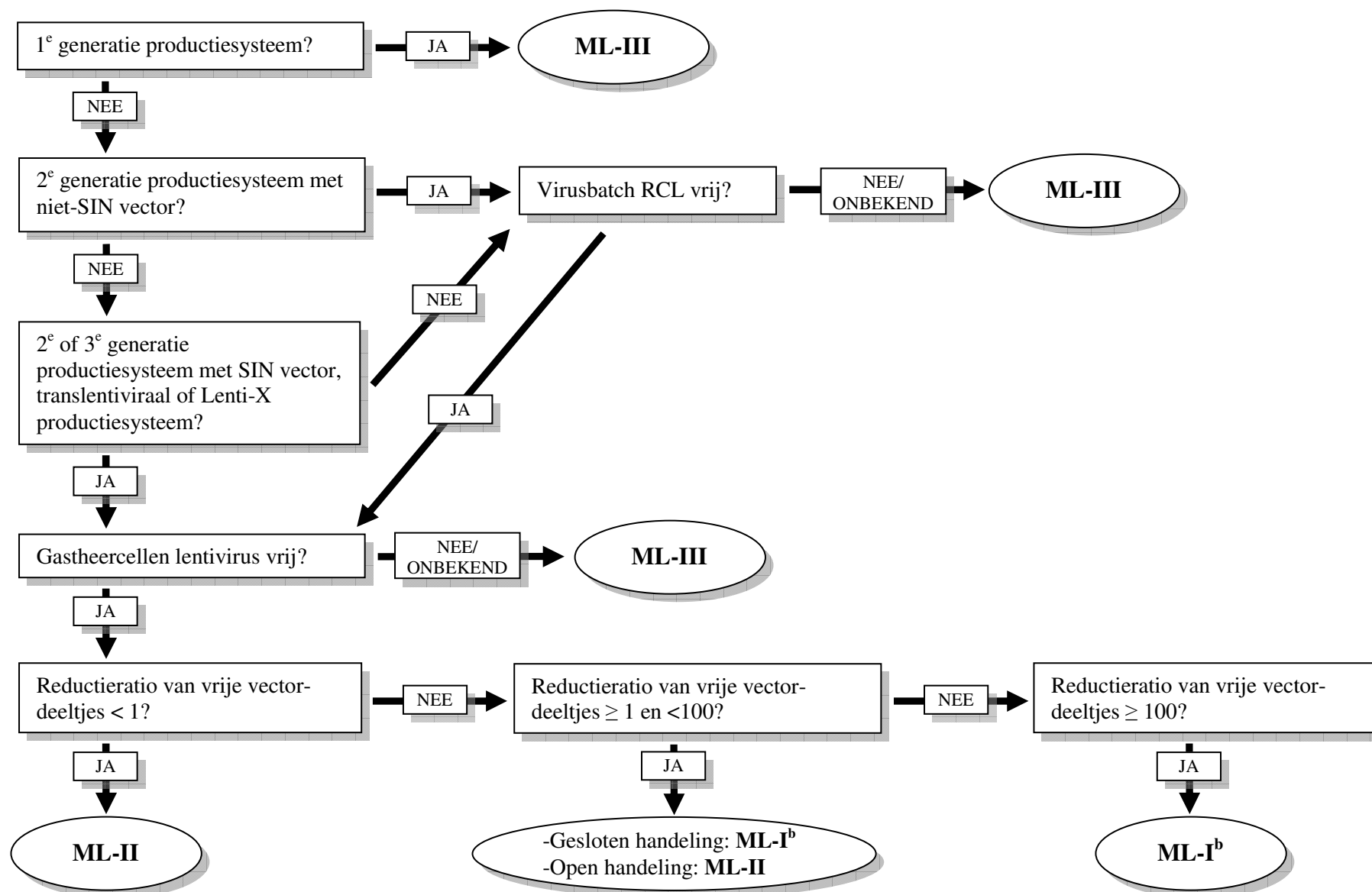
Tabel 2: Inschaling van in-vivo werkzaamheden met lentivirale vectoren^a

Handeling \ Vector	2° generatie productiesysteem met niet-SIN vector		2° generatie productiesysteem met SIN vector		3° generatie productiesysteem met SIN vector, of Lenti-X en translentiviraal productiesysteem met SIN en niet-SIN vector	
	Inschaling	Extra voorschriften/voorwaarden	Inschaling	Extra voorschriften/voorwaarden	Inschaling	Extra voorschriften/voorwaarden
<i>In vivo</i> transductie van dier ^b	DM-II	-RCL-vrij -Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II	DM-II	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II	DM-II	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II
<i>Ex vivo</i> transductie van dier ^b	DM-II	-RCL-vrij -Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II -Transplantaat vrij van lentivirus	DM-II	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II -Transplantaat vrij van lentivirus	D-I	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II -Transplantaat vrij van lentivirus -Geen vrije deeltjes in transplantaat
Langdurige fok van <i>in vivo</i> getransduceerde dieren ^b	DM-II	-Vanaf generatie F1; D-I niveau	DM-II	-Vanaf generatie F1; D-I niveau	D-I	-Vanaf generatie F1 of -Minimaal 14 dagen na transductie, indien vrij van infectieuze deeltjes
Langdurige fok van <i>ex vivo</i> getransduceerde dieren ^b	DM-II	-Vanaf generatie F1; D-I niveau	DM-II	-Vanaf generatie F1; D-I niveau	D-I	-Als transductie op D-I plaatsvond
Handelingen met cellen of weefsels uit dieren afkomstig van DM-II	ML-II	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II	ML-II	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II	ML-II	-Handschoenen dragen -Open handelingen in VKK-II
Handelingen met cellen of weefsels uit dieren afkomstig van D-I	ML-I	N.v.t.	ML-I	N.v.t.	ML-I	N.v.t.

^a Alle *in vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met packagingsysteem van de eerste generatie worden ingeschaald op DM-III niveau

^b Betreffende dieren bevatten geen lentivirussen

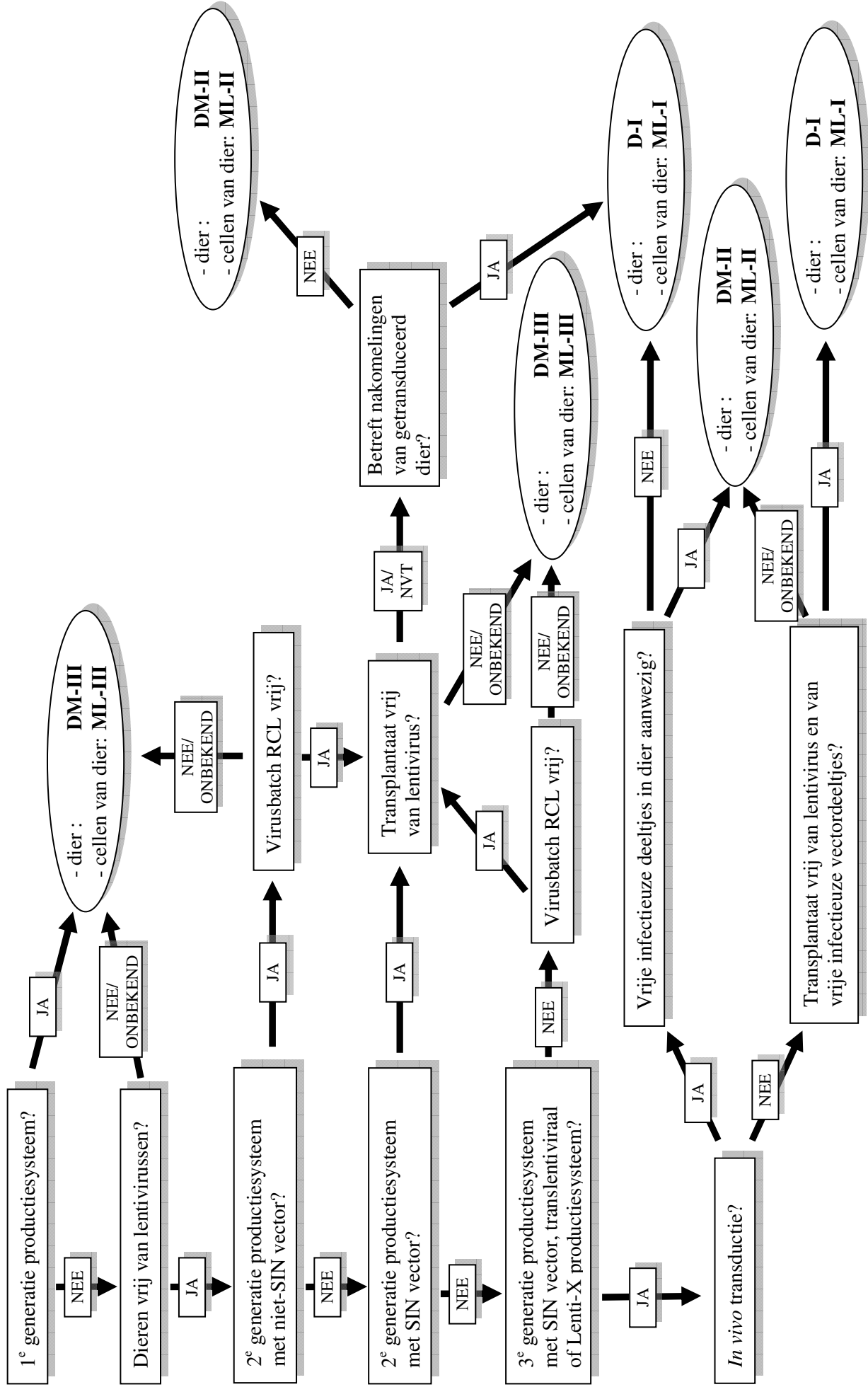
Figuur 1: Inschaling van in vitro handelingen met lentivirale vectoren^a



^a Aanvullende werkvoorschriften voor handelingen met de lentivirale vector worden beschreven in hoofdstuk 3 en staan samengevat in tabel 1

^b Indien het een derde generatie productiesysteem met SIN vector in cellijnen betreft, kan de handeling ook in een ruimte zonder inperking uitgevoerd worden

Figuur 2: *Inschaling van in vivo handelingen met lentivirale vectoren^a*



^a Aanvullende werkvoorschriften voor handelingen met de lentivirale vector worden beschreven in hoofdstuk 4 en staan samengevat in tabel 2

1. Introductie

In de afgelopen jaren heeft de COGEM negenentwintig maal geadviseerd over werkzaamheden met lentivirale vectoren of handelingen met door deze vectoren geïnficeerde cellen of weefsels. Door het ontstaan van betere en veiligere methoden om deze vectoren te produceren en door de toenemende ervaring met het gebruik van deze vectoren heeft de COGEM verschillende keren geadviseerd om werkzaamheden lager in te schalen dan de regeling GGO voorschrijft. Om een overzicht te geven over de afgegeven adviezen en inzicht te bieden in de overweging en het huidige standpunt van de COGEM over de inschaling van de verschillende werkzaamheden met lentivirale vectoren heeft zij dit generieke advies opgesteld. Dit advies geeft daarmee de inschaling en aanvullende voorschriften weer die de COGEM op dit moment adviseert voor de werkzaamheden met lentivirale vectoren en vervangt hiermee, indien van toepassing, eerder afgegeven adviezen.

In het eerste hoofdstuk wordt een algemene inleiding gegeven over lentivirussen en de replicatiecyclus van het virus. Tevens worden de verschillende productiesystemen voor lentivirale vectoren die in de loop der tijd zijn ontwikkeld, uiteengezet.

Uit de adviezen blijkt dat de COGEM voor de risicobeoordeling van werkzaamheden met lentivirale vectoren vier elementen van belang acht. Het betreft: de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus, de mogelijke aanwezigheid van vrije vectordeeltjes, de kans op complementatie en mobilisatie van de vector en de mogelijke uitscheiding van geïnternaliseerde infectieuze vectordeeltjes. Deze aspecten worden in het tweede hoofdstuk van dit advies nader toegelicht.

De overweging die ten grondslag ligt aan de inschaling van de *in vitro* werkzaamheden wordt uiteengezet in het derde hoofdstuk. Er wordt in dit hoofdstuk onderscheid gemaakt tussen werkzaamheden met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met de verschillende bestaande (eerste, tweede of derde generatie) productiesystemen. Ook wordt hierin het standpunt van de COGEM uiteengezet over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het translentivirale en het Lenti-X productiesysteem.

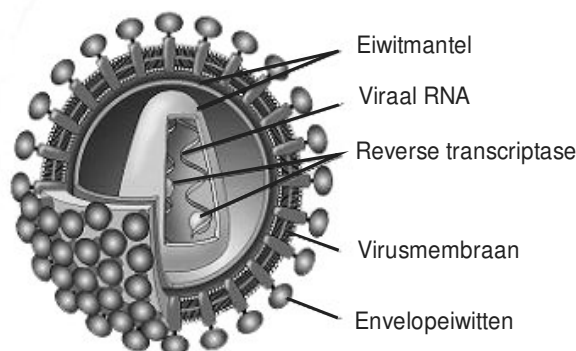
In hoofdstuk vier worden de inschaling en aanvullende voorschriften die de COGEM adviseert voor *in vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren nader toegelicht. De COGEM heeft de werkzaamheden met niet-humane primaten dikwijls hoger in geschaald dan werkzaamheden met dieren als rat, muis en konijn. Dit is gebaseerd op het feit dat eerst genoemde dieren wildtype lentivirussen kunnen bevatten. Deze lentivirussen kunnen mogelijk

recombineren met de toegepaste lentivirale vectoren, waardoor nieuwe lentivirussen kunnen ontstaan met onbekende eigenschappen. Het onderscheid tussen deze dieren vervalt echter als de niet-humane primaten niet besmet zijn met dergelijke lentivirussen.

In het kader van dit generieke advies heeft de COGEM zich beperkt tot de werkzaamheden met lentivirale vectoren in dieren, waarvoor is aangetoond dat ze geen lentivirussen (kunnen) bevatten, die met de lentivirale vector zouden kunnen recombineren. Hoofdstuk vier is dus niet van toepassing op werkzaamheden met dieren die positief zijn getest op een of meerdere lentivirussen, of waarvan het niet bekend is of ze geïnficeerd zijn of kunnen worden met lentivirussen. In dit geval acht de COGEM het noodzakelijk dat de werkzaamheden van geval tot geval beoordeeld worden.

1.1. Lentivirus

Lentivirussen zijn enkelstrengs RNA virussen en behoren tot de familie van retrovirussen (*Retroviridea*, genus *Lentivirus*). Het *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) behoort tot dit genus en wordt vaak gebruikt als basis voor de huidige lentivirale vectoren (1). Het lentivirus deeltje is opgebouwd uit een eiwitmantel waarin zich twee kopieën van het virus genoom en enkele belangrijke enzymen bevinden (zie figuur 3). De eiwitmantel wordt omgeven door het virusmembraan met zogenaamde envelopeiwitten.



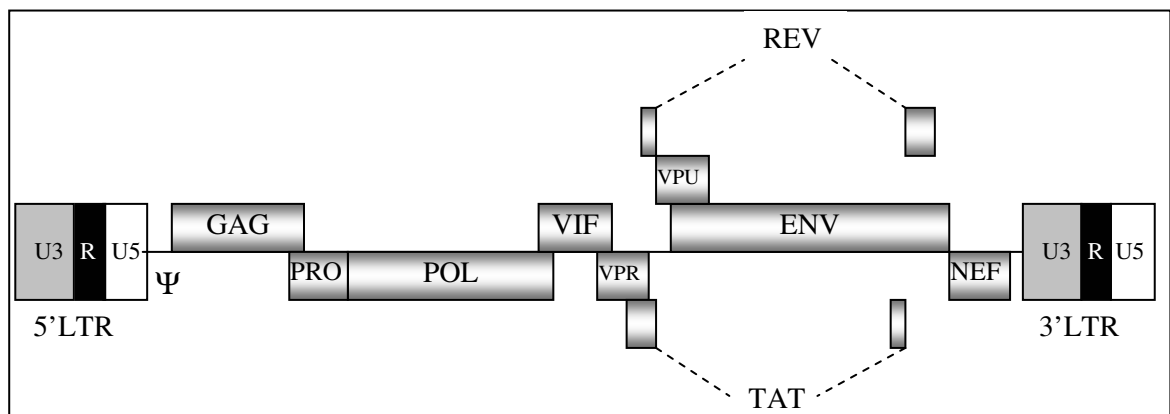
Figuur 3: Schematische representatie van een HIV-1 virusdeeltje (51)

Het genoom van HIV-1 heeft aan weerszijden een zogenaamde ‘Long Terminal Repeat’ (LTR) en bevat daarnaast een packagingsignaal (ψ), drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), een viertal accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*) (zie figuur 4) (1).

De structurele Gag eiwitten vervullen verschillende functies gedurende de virusassemblage. Ze vormen het frame van het virusdeeltje en zorgen via een interactie met het packagingsignaal dat het virusgenoom in het deeltje wordt opgenomen. Het packagingsignaal is voor deze opname van essentieel belang. Zonder dit specifieke domein wordt het virusgenoom niet ingepakt in een

virusdeeltje. De Gag eiwitten spelen ook een rol bij het omringen van het virusdeeltje met een membraan met geassocieerde envelopeiwitten. Deze virale envelopeiwitten (Env) binden aan receptoren die op het celoppervlak van de gastheer cel aanwezig zijn en bepalen daarmee welke celtypen door het lentivirus geïnficeerd kunnen worden. De Env van HIV-1 binden aan de CD4 receptor en de co-receptoren CCR5 of CXCR4, waardoor het verschillende cellen van het immuunsysteem zoals de T lymfocyten, macrofagen en monocytten kan infecteren (2).

Na de binding van het virus met de receptor en co-receptor, fuseert het virusmembraan met het membraan van de cel en wordt het deeltje gedeeltelijk ontmanteld. In het cytoplasma van de cel wordt het virale RNA door het enzym 'reverse transcriptase' omgezet in cDNA, het zogenaamde pro-virale genoom. Het reverse transcriptase wordt gecodeerd door het *pol* gen. Daarnaast codeert het *pol* gen ook voor het enzym integrase. Door het integrase wordt het pro-virale genoom in het DNA van de geïnficeerde cel geïntegreerd. Dit geïntegreerde HIV DNA fungeert als matrijs voor virale RNA synthese. Een gecombineerde actie van het virale Tat eiwit, het RNA polymerase II en de cellulaire transcriptiefactoren NF- κ B en Sp1 zorgen voor een hoge concentratie virus RNA. Dit RNA wordt de kern uit getransporteerd door het virale shuttle eiwit Rev, waarna de envelop eiwitten, de Gag eiwitten en de Gag-Pol poly-eiwitten worden geproduceerd en getransporteerd naar het plasmamembraan. De accessoire genen zijn *in vitro* niet noodzakelijk voor efficiënte virusreproductie, maar *in vivo* spelen ze een belangrijke rol in de virulentie. Zonder de accessoire genen kunnen lenti-



Figuur 4: Schematische weergave van het provirale genoom van HIV-1. LTR: long terminal repeat, ψ : packagingsignaal

virussen niet repliceren in mens en dier. De accessoire eiwitten Vpu en Nef zijn betrokken bij de down-regulatie van CD4, de precieze functie van de verschillende accessoire eiwitten is echter nog niet geheel duidelijk.

De LTRs spelen een belangrijke rol bij de productie van het pro-virale genoom, de integratie hiervan in het genoom van de gastheer en de synthese van het

lentivirale RNA. Door zogenaamde afsnoeringen van het plasmamembraan komen de nieuwgevormde virussen vrij uit de cel.

1.2. Lentivirale productiesystemen

De lentivirale vectoren zijn afgeleid van de lentivirussen en worden veelvuldig toegepast als gentransfersysteem, omdat dit vectorsysteem stabiel integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel en omdat de lentivirale vectoren zowel delende als niet-delende cellen kunnen infecteren (48, 52, 53, 54).

Voor de productie van de lentivirale vectoren worden de verschillende virusfuncties opgesplitst en over tenminste drie vectoren verdeeld (52, 55). Door deze opsplitsing moet de productie van replicatiecompetent lentivirus (RCL) voorkomen worden en kan het transgen of gastheerbereik van de lentivirale vector eenvoudig aangepast worden. De drie vectoren zijn:

1) de ‘transfervector’. Dit construct bevat het gewenste transgen, geflankeerd door virale LTRs. Dit construct bevat ook het packaging signaal, zodat het transgen in de virusdeeltjes wordt ingepakt.

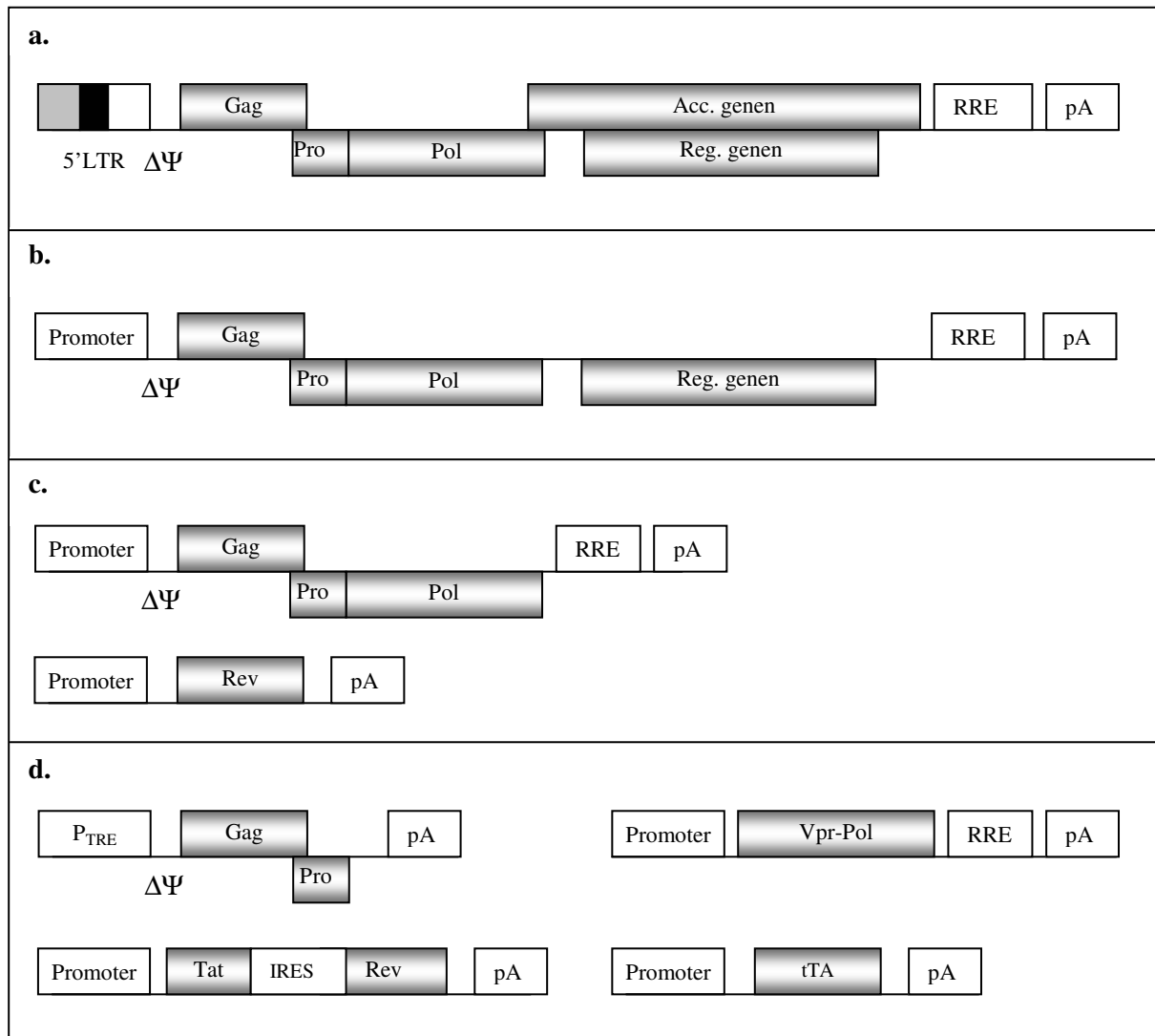
2) de ‘pseudotyping vector’. Dit is een expressievector voor een envelop eiwit. Meestal wordt het VSV-G gebruikt, waardoor de resulterende lentivirale vector een veel breder spectrum van doelwitcellen kan infecteren, dan HIV-1.

3) het ‘packagingconstruct’. Dit plasmide (of set van plasmiden) bevat de HIV-1 eiwitten, die nodig zijn voor virusproductie. Gag en Pol zijn de minimale componenten, maar daarnaast kunnen ook regulatoire en/of accessoire eiwitten aanwezig zijn. Het packagingsignaal en de LTRs ontbreken in deze constructen.

De bovengenoemde vectoren moeten gezamenlijk in een gastheercel getransfecteerd worden om virusdeeltjes te kunnen produceren.

In de afgelopen jaren zijn er drie ‘lentivirale packagingsystemen’ ontwikkeld met een oplopende mate van veiligheid (55). Dit zijn de zogenaamde eerste, tweede en derde generatie van lentivirale productiesystemen. Het verschil tussen deze productiesystemen is gelegen in verbeteringen in het packagingconstruct, waardoor de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus wordt teruggedrongen. Het onderscheid tussen de generaties van productiesystemen is dus onafhankelijk van aanpassingen in de transfervector of pseudotyping vector. Afgezien van de sequentie coderend voor Env bevat het packagingconstruct van de eerste generatie alle lentivirale genen (zie figuur 5a).

Uit het packagingconstruct van de tweede generatie zijn naast de sequenties coderend voor Env ook alle accessoire genen verwijderd (zie figuur 5b). Deze accessoire genen zijn essentieel voor de replicatie van HIV in mens en dier. De afwezigheid van deze genen vormt derhalve een belangrijke biologische inperking.



Figuur 5: De belangrijkste verschillen tussen de packagingconstructen van de verschillende lentivirale productiesysteme: **a.** packagingconstruct van de eerste generatie. (dit construct bevat soms ook nog de 3'LTR), **b.** packagingconstruct van de tweede generatie, **c.** packagingconstructen van de derde generatie, **d.** packagingconstructen van het Lenti-X of het translentiviraal productiesysteem. $\Delta\Psi$: deletie van packagingsignaal, IRES: 'internal ribosome entry site', RRE: 'Rev-responsive element', pA: polyadenylering signaal, PTRE: 'Tetracycline responsive' promoter

Uit het packagingconstruct van de derde generatie zijn ook nog de regulatoire genen verwijderd, waardoor alleen de *gag* en *pol* genen overblijven (46, zie figuur 5c). Een van de regulatoire genen codeert voor de transcriptiefactor Tat. Deze transcriptiefactor is noodzakelijk voor de productie van genomisch lentiviraal RNA. Deze functie van Tat kan echter door een constitutieve promoter overgenomen worden. Het andere regulatoire gen codeert voor het zogenaamde Rev eiwit en heeft een belangrijke rol in de nucleaire export van zowel het zogenaamde *gag-pol* mRNA als ook het genomische RNA van de transfer vector. Vanwege zijn belangrijke rol in de productie van lentivirale vectoren wordt Rev via een vierde afzonderlijk plasmide tot expressie gebracht. De derde generatie

van packagingsystemen maakt in tegenstelling tot de andere packagingsystemen dus gebruik van twee packagingconstructen.

Naast de productiesystemen van de eerste, tweede en derde generatie is er onlangs een nieuw type packagingsysteem ontwikkeld, waaronder het Lenti-X productiesysteem en het translentivirale productiesysteem vallen. In dit type packagingsysteem zijn de genen *gag* en *pol* die in het packagingsysteem van de derde generatie samen aanwezig zijn op een plasmide, gesplitst en verdeeld over twee plasmiden (zie figuur 5d). Het ene construct bevat de *gag-pro* genen en het andere construct het *pol* gen. Deze splitsing voorkomt het ontstaan van een functionele *gag-pol* structuur (49). Deze structuur is noodzakelijk voor de mobilisatie van de vector met de mogelijke vorming van RCL tot gevolg. Om het Pol eiwit in virusdeeltjes terecht te laten komen is het gefuseerd met het Vpr eiwit.

Als extra veiligheidsmaatregel staat de expressie van de *gag-pro* genen in dit type packagingsysteem onder controle van een zogenaamd 'Tetracycline responsive element' (TRE). Hierdoor is de expressie van Gag-Pro afhankelijk van de aanwezigheid van de zogenaamde 'Tet-gecontroleerde transactivator' (tTA) en Doxycycline. Doxycycline kan apart aan het kweekmedium worden toegevoegd. Voor expressie van tTA is echter een extra plasmide noodzakelijk. Dit laatste type packagingsysteem maakt dus gebruik van vier verschillende packagingconstructen (zie figuur 5d). In tegenstelling tot het packagingsysteem van de derde generatie is de transcriptiefactor Tat nog wel aanwezig in dit type packagingsysteem. Ten opzichte van het productiesysteem van de derde generatie is het nieuwe type productiesysteem op het gebied van de veiligheid dus niet louter verbeterd. Het Lenti-X en het translentivirale productiesysteem wordt derhalve niet aangemerkt als vierde generatie productiesysteem.

Naast de verbeteringen van het packagingconstruct, is de bioveiligheid van de lentivirale systemen ook verbeterd door de ontwikkeling van zelf-inactiverende (SIN) transfervectoren (5, 6). Uit deze SIN vectoren is een deel van de 3'LTR, het zogenaamde U3 domein verwijderd (zie figuur 4). Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5'LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Door deze deletie is de Tat afhankelijke promoteractiviteit uit het LTR domein verwijderd en wordt de initiatie van transcriptie via Tat verhinderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk (49). In het geval van een superinfectie van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus kan de transfer vector in principe niet meer worden gemobiliseerd uit het genoom van de gastheercel.

In het U3 domein van de LTR bevinden zich zogenaamde promoter en enhancer sequenties. Indien een lentivirale vector in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan dit U3 domein leiden tot de activering van het betreffende proto-oncogen. In de SIN vectoren is het U3 domein echter uit de 3'LTR verwijderd. Naast de reductie op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan.

2. Risico's en risicobeheersing

Het onderhavige advies heeft betrekking op verschillende handelingen met lentivirale vectoren. Aan de productie van deze vectoren, de infectie van zoogdiercellen, het gebruik van deze vectoren in dieren en de analyse of de langdurige kweek van getransduceerde cellen of weefsels is een aantal potentiële risico's verbonden. De aspecten die de COGEM van belang acht voor de risico-analyse zijn:

- de mogelijke vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL),
- de aanwezigheid en concentratie van vrije vectordeeltjes,
- de kans op complementatie en mobilisatie van de vector.

Afhankelijk van het type transfervector en het gebruikte productiesysteem zijn deze aspecten in meer of mindere mate van belang. Hierbij merkt de COGEM op dat in het specifieke geval van experimenten met macrofaagachtige cellen, de uitscheiding van geïnternaliseerde virusdeeltjes nog langdurig kan optreden.

Naast bovengenoemde risico's kan de insertie van een lentivirale vector in het gastheergenoom ook een zeker risico inhouden. In theorie kan een dergelijke insertie leiden tot transcriptionele effecten. De COGEM schat het risico van gen-activatie door het gebruik van een niet-SIN vector hierbij hoger in dan dat van een SIN vector. Zij is daarbij van mening dat dit risico alleen een rol speelt in het geval van een klinische toepassing van deze vector. Voor laboratoriumwerkzaamheden acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de medewerker besmet raakt met een lentivirale vector en dientengevolge tumoren zal krijgen. Dit baseert zij op de zeer beperkte wijze waarop lentivirussen worden overgedragen en het feit dat het gebruik van niet-SIN lentivirale vectoren in mensen en proefdieren tot op heden niet is geassocieerd met het ontstaan van tumoren (3).

2.1. Het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus

De kans op het ontstaan van RCL is onder andere afhankelijk van het aantal recombinaties dat nodig is om de vector weer alle eigenschappen terug te geven die van belang zijn voor zelfstandige replicatie in cellen. In het geval van de eerste generatie van lentivirale vectoren zijn er minimaal twee recombinaties nodig voordat een RCL kan ontstaan. Gezien dit lage aantal recombinaties beschouwt de COGEM het ontstaan van RCL bij de productie van eerste generatie lentivirale vectoren als een reëel risico.

In het geval van een tweede generatie lentivirale vector zijn er ook minimaal twee recombinaties vereist. Tevens moeten de accessoire genen weer worden opgenomen in het virale genoom. Indien een zelf-inactiverende vector wordt gebruikt, moet daar aan worden toegevoegd dat ook de LTR van de vector

hersteld dient te worden. In de wetenschappelijke literatuur is RCL-vorming bij het gebruik van een productiesysteem van de tweede generatie in combinatie met de SIN vectoren nog nooit gerapporteerd.

Als er gebruik wordt gemaakt van het productiesysteem van de derde generatie zijn de virale sequenties verdeeld over vier plasmiden en zijn er minimaal drie recombinaties nodig voordat er sprake kan zijn van RCL. Daarnaast dienen ook in dit productiesysteem de accessoire genen geherintroduceerd te worden en de LTR's worden hersteld in het geval van een SIN vector. In de wetenschappelijke literatuur wordt gerapporteerd dat RCL-vorming bij gebruik van dit type productiesysteem niet wordt waargenomen (44). Bovendien is het bij de COGEM bekend dat in het Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, USA) onderzoek is uitgevoerd naar de mogelijkheid om RCL-vorming te bewerkstelligen (45). Onder de geteste condities is het echter niet mogelijk gebleken RCLs te laten ontstaan. Voor het productiesysteem van de derde generatie acht de COGEM de kans op RCL tijdens de vector productie daarom verwaarloosbaar klein. De COGEM gaat er in deze gevallen van uit dat de in de transfervector gekloneerde genen geen effect hebben op de replicatie van de virale vector.

2.2. De aanwezigheid van vrije vectordeeltjes

Na de transductie kunnen er replicatiedeficiënte vectordeeltjes afkomstig van het oorspronkelijke inoculum in de kweek aanwezig blijven. Door morsen of andere incidenten kunnen deze deeltjes in het milieu terecht komen en in eerste instantie laboratoriummedewerkers infecteren. Door de relatief beperkte besmettingsroutes van HIV is de kans op besmetting van personen klein en voornamelijk aanwezig bij prikincidenten of door direct bloedcontact via open huidwondjes. Indien deze replicatiedeficiënte vectordeeltjes in het lichaam komen, kunnen ze eenmalig infecteren. Aangezien er in de geïnfecteerde cel geen nieuwe replicatie-competente virusdeeltjes gevormd kunnen worden, zal de infectie beperkt blijven tot de plaats van besmetting (1). Afhankelijk van het insert en de plaats van insertie in het genoom, is er een theoretische kans op het ontstaan van tumoren (4).

De aanwezigheid van vrije vectordeeltjes en hun uiteindelijke concentratie is afhankelijk van een aantal factoren, waaronder de halfwaardetijd van de virusvector en het aantal wasstappen na infectie. Voor lentivirale vectoren, die gepseudotypeerd zijn met het VSV-G envelop eiwit wordt bij 20°C een halfwaardetijd van circa 50 uur gevonden en bij 37°C is de halfwaardetijd ongeveer tien uur (7). Onder kweekomstandigheden, die normaliter gebruikt worden voor zoogdiercellen zal de concentratie van infectieuze lentivirus deeltjes dus elke tien uur halveren.

De concentratie van vrije vectordeeltjes is ook afhankelijk van het aantal wasstappen dat na infectie is uitgevoerd met bijvoorbeeld kweekmedium of een fysiologische zoutoplossing. De reductie is ondermeer afhankelijk van het volume dat gebruikt wordt. Gebaseerd op praktische ervaring hanteert de COGEM als vuistregel dat bij iedere wasstap ongeveer 95% van de aanwezige vectordeeltjes wordt verwijderd. Dit levert bij elke wasstap een factor 20 reductie op in de concentratie van de virusdeeltjes.

Naast deze reductie van de concentratie is het ook mogelijk het virus te inactiveren (17, 18, 19, 20). Het wildtype HIV-1 virus wordt efficiënt geïnactiveerd door trypsine. Een incubatie van HIV-1 met 0.01% trypsine inactieveert in tien minuten minimaal 90% van het aanwezige virus (19). Ook het VSV-G envelopeiwit is gevoelig voor een trypsine behandeling. Hierdoor kunnen virale vectoren die door middel van dit envelopeiwit aan cellen gehecht zijn, worden losgemaakt en weggewassen en kunnen de vrije vectordeeltjes niet meer aan cellen binden. Naast het gebruik van trypsine kunnen vrije virus deeltjes met het VSV-G envelopeiwit ook worden geïnactiveerd door het zogenaamde complement in humaan serum. Het complement is een onderdeel van het humorale immuunsysteem (17). Een incubatie van lentivirale vectoren in humaan serum inactieveert bij 37°C 98% van de virusdeeltjes in één uur.

Indien een van bovengenoemde inactivatie methoden wordt toegepast en het inactiverende agens na incubatie weggewassen wordt, gaat de COGEM er bij iedere inactivatie stap vanuit dat er minimaal een 200-voudige reductie van de concentratie optreedt.

Om te kunnen bepalen welke reductie van het oorspronkelijke inoculum voor een bepaalde situatie van toepassing is, hanteert de COGEM de volgende formule:

$$\text{Reductieratio} = (20^W \times 200^I \times 2^{2,4T})/C_i$$

In deze formule is W het aantal wasstappen, I het aantal inactiverende wasstappen met trypsine of humaan serum en T staat voor de kweektijd in dagen na transductie. De factor 2,4 is gebaseerd op de halfwaardetijd van een lentivirus vector bij een temperatuur van 37°C. De C_i is het oorspronkelijke aantal virusdeeltjes in het inoculum. De resulterende reductieratio is voor de COGEM mede van belang voor de risicoanalyse, waarop zij de inschaling van de werkzaamheden met lentivirale vectoren baseert.

2.3. Complementatie en mobilisatie van de vector

Lentivirale vectoren die niet zelfinactiverend zijn, kunnen nadat ze in het genoom van een gastheer geïntegreerd zijn, gemobiliseerd worden als gevolg van een co-infectie van de gastheer met HIV-1, HIV-2 of een ander lentivirus. Door de

aanwezigheid van wildtype lentivirussen worden de genen die in de lentivirale vector ontbreken gecomplementeerd en is het mogelijk dat er nieuwe recombinante lentivirale vectordeeltjes geproduceerd worden.

Om mobilisatie te voorkomen zijn zelf-inactiverende transfervectoren ontwikkeld. In een recente studie is echter aangetoond dat de 5'LTR van deze SIN vectoren in zogenaamde bloedvormende of hematopoietische cellen nog een minimale promoteractiviteit bezit. Als gevolg van deze activiteit worden er in het geval van de zelf-inactiverende vectoren een beperkte hoeveelheid transcripten gevormd (9). Na co-infectie met een wild-type lentivirus is het dus niet geheel uit te sluiten dat er in hematopoietische cellen infectieuze recombinante vectordeeltjes worden gevormd (9, 10). Door het verschil in transcriptie niveau tussen HIV-1 en de SIN vector is het echter niet waarschijnlijk dat de SIN vector transcripten in een virusdeeltje worden ingepakt.

Om de kans op complementatie en mobilisatie van de vector tijdens handelingen met lentiviraal getransduceerde animale cellen te minimaliseren acht de COGEM het van belang om ieder mogelijk contact van de cellen met een lentivirus of lentivirale vector te vermijden.

2.4. Geïnternaliseerde virusdeeltjes

In afwezigheid van RCL acht de COGEM het risico voor mens en milieu van geïnternaliseerde virusdeeltjes verwaarloosbaar klein. Uitzondering hierop vormen virusdeeltjes die geïnternaliseerd zijn door sommige macrofaagachtige celtypen, zoals dendritische cellen. Deze cellen zijn in staat om lentivirussen te internaliseren zonder dat er sprake is van een infectie. De virusdeeltjes blijven in deze situatie intact in de cel aanwezig en kunnen na verloop van tijd weer worden uitgescheiden (8, 11-16). In geïnternaliseerde toestand kunnen de virusdeeltjes tot negen maanden na internalisatie infectieus blijven (14), waardoor eventuele wasstappen of langere kweektijd weinig invloed zal hebben.

Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat het niet uitgesloten kan worden dat macrofaagachtige cellen nog infectieuze vectordeeltjes kunnen bevatten en uit kunnen scheiden. Zij acht het derhalve raadzaam om van geval tot geval te oordelen over mogelijke risico's van werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde, macrofaagachtige cellen. De werkzaamheden met macrofaagachtige cellen vallen derhalve buiten dit advies.

3. *In vitro* gebruik van lentivirale vectoren

3.1. Algemeen

In de loop der jaren is er met het oog op de veiligheid van de lentivirale vectoren een aantal verbeteringen aangebracht in de toegepaste packagingsystemen. Met een oplopende mate van veiligheid is hierdoor onderscheid te maken in een eerste, tweede en derde generatie van packagingsystemen. Tevens is de transfervector verbeterd door de introductie van de zogenaamde SIN vector. De inschaling die de COGEM adviseert voor de productie en het gebruik van lentivirale vectoren wordt mede bepaald door het type packagingsysteem en transfervector dat is toegepast. De definities van de verschillende packgingsystemen, de SIN en de niet-SIN vector, die de COGEM hanteert en waarop ondergenoemde inschaling is gebaseerd, staan beschreven in paragraaf 1.2.

Ondanks genoemde verbeteringen aan het packagingsysteem, blijft het essentieel om ieder contact tussen lentivirale vector en wildtype lentivirussen ten alle tijden te voorkomen. Door recombinatie tussen het genoom van de transfervector en het genoom van een wildtype lentivirus of door het inpakken van beide genomen in één virusdeeltje (co-packaging) kan er in theorie RCL ontstaan. Onafhankelijk van het packagingsysteem en de transfervector is de COGEM van mening dat voor de productie van lentivirale vectoren het te gebruiken gastheer materiaal vrij dient te zijn van HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus type 1* (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere zogenaamde relevante lentivirussen die de vector kunnen complementeren of met de vector kunnen recombineren en de gastheercel kunnen infecteren.

Het merendeel van de uitgebrachte COGEM adviezen over lentivirale vectoren betrof vectoren die gepseudotypeerd zijn met het glycoproteïne G van het *Vesicular stomatis virus* (VSV-G). Onderstaande inschaling geldt derhalve voor dit type lentivirale vectoren, maar is ook van toepassing indien er virale envelopes worden gebruikt die wat betreft gastheerbereik, stabiliteit en gevoeligheid voor inactivatieprocedures vergelijkbaar zijn met VSV-G of daarvoor onderdoen.

3.2. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de eerste generatie

Door de reële kans op replicatiecompetent lentivirus (RCL) en de aanwezigheid van de accessoire genen in het packagingconstruct wordt een lentivirale vector, die geproduceerd is met een packagingsysteem van de eerste generatie ingeschaald als zijnde een vol-virulent HIV virus. Conform de Regeling GGO

adviseert de COGEM daarom alle *in vitro* werkzaamheden met dergelijke lentivirale vectoren uit te voeren op ML-III niveau (21).

3.3. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de tweede of derde generatie

3.3.1. De productie van lentivirale vectoren

Tweede generatie lentiviraal packagingsysteem met niet-SIN vector

Bij de productie van lentivirale vectoren met het packagingsysteem van de tweede generatie zijn minimaal twee recombinaties nodig en moeten de accessoire genen in het genoom opgenomen worden voordat een RCL zou kunnen ontstaan. Hoewel de COGEM de kans op RCL klein acht, kan zij niet geheel uitsluiten dat er RCL ontstaat. Vanwege deze kleine kans op RCL-vorming adviseert de COGEM de productie van de niet-SIN vector met het productiesysteem van de tweede generatie op ML-III niveau in te schalen.

Tweede generatie lentiviraal packagingsysteem met SIN vector

Tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het packagingsysteem van de tweede generatie moeten twee recombinaties optreden, moeten de accessoire genen worden opgenomen in het genoom van de vector en dient de LTR van het SIN-construct gerepareerd te worden alvorens er sprake is van RCL. In de wetenschappelijke literatuur is nog nooit gerapporteerd dat er tijdens de productie van deze vectoren RCL is ontstaan.

Het risico ligt daarom met name bij een besmetting van de medewerker met betreffende vectoren. Om de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein te houden acht de COGEM een inschaling op ML-II niveau afdoende (22). De COGEM adviseert derhalve de productie in te schalen op ML-II niveau met de volgende aanvullende voorschriften:

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden,
- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen.

Derde generatie lentiviraal packagingsysteem met SIN vector

In het geval van het packagingsysteem van de derde generatie wordt voor de vectorproductie gebruik gemaakt van vier plasmiden die minimale homologie hebben in virale sequenties. Hierdoor zijn er naast het herstellen van de LTR en het opnemen van de accessoire genen in ieder geval drie recombinaties vereist voordat een RCL zou kunnen ontstaan. Ondanks het feit dat dit productiesysteem wereldwijd al jaren gebruikt wordt, is er tot op heden nooit melding gemaakt van RCL-vorming. Wetenschappelijk onderzoek naar het ontstaan van RCL wijst uit dat RCL-vorming bij gebruik van dit type productiesysteem niet wordt

waargenomen (44). Bovendien kent de COGEM ongepubliceerde data van het Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, USA) die actief hebben geprobeerd om RCL te creëren tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het packagingsysteem van de derde generatie (45). In geen van de experimenten leidde de aanwezigheid van wildtype lentivirus tot het ontstaan van RCL. Met het oog op het bovenstaande acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCL verwaarloosbaar klein. Zij is derhalve van mening dat de kans op verspreiding van een replicatiecompetente lentivirale vector in het milieu in dit geval nihil is (22, 23).

Voor de productie van deze lentivirale vectoren adviseert de COGEM, daarom een ML-II inperkingsniveau en de volgende voorschriften:

- de handelingen dienen uitgevoerd te worden in een klasse II veiligheidskabinet,
- tijdens de handelingen dient de medewerker handschoenen te dragen.

3.3.2. Transductie van zoogdiercellen met lentivirale vectoren

Tweede generatie lentiviraal packagingsysteem met niet-SIN vector of SIN vector

In het geval een lentiviraal packagingsysteem van de tweede generatie in combinatie met een transfervector, die niet zelf-inactiverend is, kan het volgens de COGEM niet geheel uitgesloten worden dat de vectorbatch RCL bevat als gevolg van recombinatie gebeurtenissen. In het verleden heeft de COGEM derhalve geadviseerd de transductie van zoogdiercellen met deze niet-SIN vectoren op ML-III niveau in te schalen. De COGEM is echter van mening dat de transductie met deze vector op ML-II uitgevoerd kan worden, indien de vectorbatch negatief is getest op de aanwezigheid van RCL (27).

Om de vectorbatch te controleren op RCL dient een algemeen geaccepteerde en als gevoelig aangemerkte methode gebruikt te worden. Als een mogelijke optie beveelt de COGEM de zogenaamde p24 ELISA aan (38). Het p24 eiwit wordt gecodeerd door het HIV-*gag* gen en vormt een onderdeel van de mantel van het virus. Het p24 eiwit wordt geproduceerd indien er sprake is van virusreplicatie en zal al naar gelang het virus zich vermeerderd in concentratie toenemen. Wellicht ten overvloede merkt de COGEM hierbij op dat er cellen gebruikt moeten worden die de replicatie van eventueel aanwezige RCL's ondersteunen. De RCL-test dient uitgevoerd te worden op ML-III niveau.

Onder navolging van de voorwaarde dat het gastheer materiaal dat voor de productie is gebruikt vrij was van zogenaamde relevante lentivirussen en op basis van de overweging genoemd in paragraaf 3.3.1 is de COGEM van mening dat de transductie werkzaamheden met de SIN vectoren, die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de tweede generatie zonder RCL-test op ML-II niveau ingeschaald kunnen worden.

Als voorwaarde voor de inschaling van beide typen vectoren op ML-II niveau adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd.

In principe is het mogelijk dat er na de transductie contaminatie optreedt met andere virussen door de aanwezigheid van virussen in de kweek of door zogenaamde insleep. Om te voorkomen dat na transductie RCL gevormd wordt door een dergelijke contaminatie of de recombinante vector gemobiliseerd kan worden, heeft de COGEM tevens de volgende voorschriften opgesteld (22, 31):

- de te transduceren cellen dienen vrij te zijn van HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus type 1* (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel,
- handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of andere retrovirale vectorsystemen en handelingen met de lentivirale vector dienen niet gelijktijdig in hetzelfde veiligheidskabinet uitgevoerd te worden,
- tussen handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of andere retrovirale vectorsystemen en handelingen met de lentivirale vector in hetzelfde veiligheidskabinet dient een marge van minimaal 30 minuten gehanteerd te worden.

Derde generatie lentiviraal packagingsysteem met SIN vector

Aangezien de COGEM de kans op RCL voor dit packagingsysteem verwaarloosbaar klein acht, ziet zij geen toegevoegde waarde van een RCL test. Daarom heeft zij in het verleden geadviseerd de transductie van zoogdiercellen met lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de derde generatie uit te voeren op ML-II niveau. Daarbij zijn dezelfde aanvullende voorschriften van kracht als opgesteld voor de lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de tweede generatie (31).

Indien primaire humane cellen worden getransduceerd, komt het in de praktijk regelmatig voor dat de infectiestatus van deze cellen onbekend is en het op praktische of maatschappelijke problemen stuit om dit gastheermateriaal op lentivirussen te testen¹. Daar de verspreiding van HIV in Nederland epidemisch verloopt, kan het aantal HIV-geïnfecteerde individuen redelijk nauwkeurig worden geschat (43). In 2005 werd het aantal geïnfecteerde individuen in

¹ Een HIV test mag alleen uitgevoerd worden indien daar toestemming voor gegeven is en de uitslag van de test valt onder de medische geheimhouding. Bovendien zijn de maatschappelijke gevolgen bij seropositiviteit voor HIV zeer ingrijpend.

Nederland geschat op 18.500 (42). Hiervan waren ongeveer 7.500 HIV-geïnfecteerden niet op de hoogte van hun eigen HIV status. Dit betekent dat in Nederland in 2005 0.05% van de bevolking geïnfecteerd was met HIV zonder daarvan op de hoogte te zijn. Door de intensivering van het HIV-testbeleid in Nederland en de opkomst van de HIV-zelftest is de COGEM van mening dat dit percentage na 2005 nog verder zal zijn gedaald. De COGEM acht de kans daarom relatief klein dat er in Nederland HIV aanwezig is in humane donoren, waarvan de infectiestatus onbekend is (31).

Daarnaast is de COGEM bekend met experimenten die zijn uitgevoerd in het Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, USA) waarin actief is geprobeerd om RCL te creëren tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het packagingsysteem van de derde generatie. In geen van deze experimenten leidde de aanwezigheid van wildtype lentivirus tot het ontstaan van RCL. De COGEM adviseert daarom om de transductie van humane primaire cellen met de lentivirale SIN vectoren, die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de derde generatie op ML-II niveau in te schalen. Op dit inperkingsniveau blijft de veiligheid voor mens en milieu ook gewaarborgd als de primaire cellen vooraf niet worden getest op de afwezigheid van HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV en andere lentivirussen.

3.3.3. Kweek en analyse van getransduceerde zoogdiercellen

Tweede generatie lentiviraal packagingsysteem met een niet-SIN vector of met een SIN vector

De risico's die verbonden kunnen zijn aan handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen zijn afhankelijk van de mogelijke aanwezigheid van RCL en vrije niet-replicerende vectordeeltjes in de celkweek. Aan het aantal in de celkweek aanwezige vrije niet-replicerende vectordeeltjes heeft de COGEM een grens gesteld op basis van de reductieratio (reductiefactor/oorspronkelijk virus-inoculum, zie paragraaf 2.2). Voor gesloten handelingen adviseert zij een reductieratio van minimaal één. Deze waarde houdt in dat er door verdunning en inactivatie maximaal één virusdeeltje in de kweek over is gebleven. Voor open handelingen adviseert de COGEM een reductieratio van minimaal 100 (0,01 virusdeeltje per kweek). De COGEM wijst daarbij op het feit dat de reductie van het aantal vrije vectordeeltjes door infectie van de zoogdiercellen niet in deze berekening wordt verdisconteerd. Hierdoor zal in de praktijk het aantal vrije niet-replicerende vectordeeltjes dat daadwerkelijk in de celkweek aanwezig is, veelal lager zijn dan op basis van de reductieratio wordt aangenomen. Onder navolging van bovengenoemde reductieratio en met het oog op de beperkte wijze waarop lentivirus overgedragen kan worden, acht de

COGEM de kans op besmetting van de medewerker met een lentivirale vector verwaarloosbaar klein.

In het kader van de risico's door RCL is de COGEM van mening dat de virusbatch van niet-SIN vectoren getest moet zijn op de afwezigheid van RCL. Als de getransduceerde cellen zijn getest op eerder aangegeven relevante lentivirussen en de insleep van lentivirus tot een minimum is beperkt door de aanvullende werkvoorschriften voor de transductie van zoogdiercellen, is de COGEM van mening dat de kans op RCL-vorming verwaarloosbaar klein is.

Indien aan de gestelde voorwaarden is voldaan adviseert de COGEM de werkzaamheden met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met bovengenoemde lentivirale vectoren op ML-I niveau in te schalen. Hierbij stelt zij de volgende aanvullende voorschriften voor:

- tijdens de handelingen moeten handschoenen gedragen worden,
- de werkoppervlakken en meetopstellingen dienen na de handelingen met de getransduceerde zoogdiercellen gereinigd te worden met adequate detergentia, zoals 70% alcohol of 0.1% SDS, om betreffende oppervlakken te desinfecteren.

Onder gestelde voorwaarden en voorschriften is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

Table 3. *Overzicht van criteria voor handelingen met niet-macrofaagachtige zoogdiercellen die getransduceerd zijn door lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de tweede generatie.*

Werkruimte	Handeling ^a	Transfer vector	Criteria ^b	
			Reductieratio ^c	RCL test ^d
ML-I	Gesloten	Niet-SIN	≥ 1	Ja
		SIN	≥ 1	Nee
ML-I	Open	Niet-SIN	≥ 100	Ja
		SIN	≥ 100	Nee

^a Bij open handelingen staat het kweekmedium in direct contact met de lucht en bij gesloten handelingen zijn de kweekflesjes/schaaltjes afgesloten waardoor bijvoorbeeld geen aerosolen kunnen vrijkomen

^b Met inachtneming van de genoemde criteria en aanvullende voorschriften kunnen handelingen met lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige zoogdiercellen in de aangegeven werkruimte uitgevoerd worden

^c De reductiefactor gedeeld door het aantal virusdeeltjes in het oorspronkelijke inoculum

^d Het testen van de virusbatch op RCL dient uitgevoerd te worden op ML-III niveau

Derde generatie lentiviraal packagingsysteem met SIN vector

Als niet-macrofaagachtige zoogdiercellen getransduceerd zijn met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de derde generatie, is de COGEM van mening dat open en gesloten handelingen met deze cellen onder voorwaarden op een lager inperkingsniveau dan ML-II ingeschaald kunnen

worden. In het verleden heeft de COGEM hiervoor algemene richtlijnen opgesteld, die zijn samengevat in tabel 4 (26, 28, 29, 31, 34, 35).

Voor open en gesloten handelingen op ML-I niveau gelden dezelfde richtlijnen en voorschriften als gesteld voor de kweek en analyse van zoogdiercellen die getransduceerd zijn met lentivirale SIN vectoren geproduceerd met het productiesysteem van de tweede generatie.

Door de verwaarloosbare kleine kans op RCL bij gebruik van de derde generatie productiesysteem is de COGEM tevens van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd blijft als gesloten handelingen buiten inperking worden uitgevoerd. Voor open handelingen buiten inperking acht zij het echter noodzakelijk een extra voorschrift toe te voegen. Zoals aangegeven in paragraaf 3.3.2. is de COGEM van mening dat de kans op aanwezigheid van HIV in primaire humane cellen klein is. Zij kan dit echter niet uitsluiten. Door de grotere verspreidingskans bij open handelingen buiten inperking adviseert de COGEM derhalve dat ook de primaire humane cellen getest dienen te zijn op afwezigheid van lentivirussen met tropisme voor de gastheer.

Tabel 4. Overzicht van criteria voor handelingen met niet-macrofaagachtige zoogdiercellen die getransduceerd zijn door lentivirale SIN vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de derde generatie.

Werkruimte ^a	Handeling ^b	Criteria ^c		
		Reductieratio ^d	RCL test	HIV test primaire humane cellen ^e
ML-I	Gesloten	≥ 1	Nee	Nee
ML-I	Open	≥ 100	Nee	Nee
Geen inperking	Gesloten	≥ 1	Nee	Nee
Geen inperking	Open	≥ 100	Nee	Ja

^a De werkruimte kan een ML-I laboratorium zijn of een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met ggo's (geen inperking)

^b Bij open handelingen staat het kweekmedium in direct contact met de lucht en bij gesloten handelingen zijn de kweekflesjes/schaaltjes afgesloten waardoor bijvoorbeeld geen aerosolen kunnen vrijkomen

^c Met inachtneming van de genoemde criteria en aanvullende voorschriften kunnen handelingen met lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige zoogdiercellen in de aangegeven werkruimte uitgevoerd worden

^d De reductiefactor gedeeld door het aantal virusdeeltjes in het oorspronkelijke inoculum

^e In tegenstelling tot open handelingen buiten inperking, hoeven voor gesloten handelingen buiten inperking en handelingen op ML-I inperkingsniveau primaire humane cellen, waarvan de infectiestatus onbekend is, niet getest te worden op afwezigheid van lentivirussen met tropisme voor de gastheer

3.4. Handelingen met lentivirale vectoren geproduceerd met het Lenti-X of translentiviraal packagingsysteem

3.4.1. De productie van lentivirale vectoren

Zoals aangegeven in paragraaf 1.2 zijn de translentivirale en Lenti-X productiesystemen qua veiligheid het best te vergelijken met het productiesysteem van de derde generatie, maar wijkt het op een aantal punten hiervan af.

In dit packagingsysteem zijn de aanwezige HIV genen verdeeld over drie plasmiden. Voor de vorming van RCL moeten deze drie plasmiden, de pseudotypingvector en de transfervector met elkaar recombineren. Gezien de beperkte homologie tussen deze constructen is de kans op de vereiste recombinatie gebeurtenissen zeer klein. Bovendien zijn er in het beperkte aantal van overlappende sequenties puntmutaties aanwezig die hersteld moeten worden alvorens er functionele genen ontstaan. Daarnaast moet er voor de expressie van *gag* en *pro* een andere promotor worden ingebouwd of dient de tTa expressiecassette in de betreffende RCL opgenomen te worden. Hiervoor zijn additionele recombinaties nodig.

Zelfs indien alle recombinatie gebeurtenissen en restauratieve puntmutaties op een goede wijze plaatsvinden, ontbreken de accessoire genen *vif*, *nef*, *vpu* en *vpr*. Deze accessoire genen zijn essentieel voor de replicatie van HIV in mens en dier. De afwezigheid van deze genen vormt derhalve een belangrijke biologische inperking.

Met het oog op bovenstaande overweging, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCL tijdens productie van zowel SIN als ook niet-SIN vectoren verwaarloosbaar klein. Zij adviseert daarom de productie van de SIN en niet-SIN lentivirale vector uit te voeren op ML-II niveau (41) en voegt hier de volgende aanvullende voorschriften aan toe:

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden,
- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht.

3.4.2. Transductie van zoogdiercellen met lentivirale SIN en niet-SIN vectoren

In een speciaal daarvoor opgezet onderzoeksproject is gezocht naar de mobilisatie frequentie van lentivirale vectoren. In deze studie werd met een niet-SIN vector, die geproduceerd was door het trans-lentivirale productiesysteem geen mobilisatie waargenomen (49, 50). Op basis van deze gegevens en de ervaring met het vergelijkbare productiesysteem van de derde generatie acht de COGEM de kans op RCL als gevolg van recombinatie verwaarloosbaar klein voor zowel SIN als ook niet-SIN vectoren die geproduceerd zijn met het Lenti-X of het translentivirale packagingsysteem. Een RCL-test acht de COGEM daarom niet noodzakelijk.

Om de mogelijkheid van mobilisatie te reduceren adviseert de COGEM de cellen te testen op de afwezigheid van lentivirussen en maatregelen te treffen tegen eventuele insleep van deze virussen.

Concluderend, adviseert de COGEM transductie werkzaamheden op ML-II niveau uit te voeren (40, 41). Om eventuele risico's verder te minimaliseren, adviseert zij tevens de volgende aanvullende voorschriften:

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden,
- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht,
- het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV en andere relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel,
- handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of andere vector systemen dienen niet gelijktijdig met de lentivirale vector in het veiligheidskabinet plaats te vinden,
- het is niet toegestaan dat transductie plaatsvindt in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatiecompetente lentivirussen of andere vector systemen in hetzelfde kabinet hebben plaatsgevonden.

3.4.3. Kweek en analyse van getransduceerde zoogdiercellen

Als niet-macropaagachtige zoogdiercellen getransduceerd zijn met lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het Lenti-X of het translentivirale packagingsysteem, is de COGEM van mening dat open en gesloten handelingen met deze cellen onder voorwaarden op een lager inperkingsniveau dan ML-II ingeschaald kunnen worden. De COGEM heeft hiervoor algemene richtlijnen opgesteld, die zijn samengevat in tabel 5.

De risico's die verbonden kunnen zijn aan handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen zijn afhankelijk van de mogelijke aanwezigheid van RCL en vrije niet-replicerende vectordeeltjes in de celkweken. Voor het aantal in de celkweek aanwezige vrije niet-replicerende vectordeeltjes heeft de COGEM een grens geadviseerd op basis van de reductieratio (reductiefactor gedeeld door het oorspronkelijk virus-inoculum, zie paragraaf 2.2). Voor gesloten handelingen adviseert zij een reductieratio van minimaal 1 en voor open handelingen een reductieratio van minimaal 100. Onder navolging van bovengenoemde reductieratio en met het oog op de beperkte wijze waarop het lentivirus overgedragen kan worden, acht de COGEM de kans op besmetting van de medewerker met een lentivirale vector verwaarloosbaar klein.

Zoals in de vorige paragraaf reeds opgemerkt, acht de COGEM het niet nodig een RCL-test uit te voeren in het geval van niet-SIN en SIN vectoren die

geproduceerd zijn met dit type productiesysteem. Als de getransduceerde cellen zijn getest op lentivirussen en de insleep van lentivirus tot een minimum is beperkt door het opvolgen van de opgestelde werkvoorschriften voor de transductie van zoogdiercellen, is de COGEM van mening dat de kans op mobilisatie of RCL-vorming in getransduceerde cellen verwaarloosbaar klein is. Daarvoor is de aanwezigheid van een relevant replicatiecompetent lentivirus immers noodzakelijk.

Indien aan de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, adviseert de COGEM de werkzaamheden met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met bovengenoemde lentivirale vectoren op ML-I niveau in te schalen. Hierbij stelt zij de volgende aanvullende voorschriften voor:

- tijdens de handelingen moeten handschoenen gedragen worden,
- de werkoppervlakken en meetopstellingen dienen na de handelingen met de getransduceerde zoogdiercellen gereinigd te worden met adequate detergentia, zoals 70% alcohol of 0.1% SDS, om betreffende oppervlakken te desinfecteren.

Onder gestelde voorwaarden en voorschriften is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

Tabel 5. *Overzicht van criteria voor handelingen met niet-macrofaagachtige zoogdiercellen die getransduceerd zijn door lentivirale vectoren geproduceerd met het Lenti-X of het translentivirale packagingsysteem.*

Werkruimte ^a	Handeling ^b	Transfer vector	Criteria ^c	
			Reductieratio ^d	RCL test
ML-I	Gesloten	Niet-SIN	≥ 1	Nee
		SIN	≥ 1	Nee
ML-I	Open	Niet-SIN	≥ 100	Nee
		SIN	≥ 100	Nee

^a De werkruimte kan een ML-I laboratorium zijn of een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met ggo's (geen inperking)

^b Bij open handelingen staat het kweekmedium in direct contact met de lucht en bij gesloten handelingen zijn de kweekflesjes/schaaltjes afgesloten waardoor bijvoorbeeld geen aerosolen kunnen vrijkomen

^c Met inachtneming van de genoemde criteria en aanvullende voorschriften kunnen handelingen met lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige zoogdiercellen in de aangegeven werkruimte uitgevoerd worden

^d De reductiefactor gedeeld door het aantal virusdeeltjes in het oorspronkelijke inoculum

4. *In vivo* gebruik van lentivirale vectoren

4.1. Algemeen

In de adviezen van de afgelopen jaren maakt de COGEM op het gebied van dierexperimenten onderscheid tussen dieren als rat, muis en konijn enerzijds en niet-humane primaten anderzijds. Dit onderscheid is gebaseerd op de mogelijke aanwezigheid van wildtype lentivirussen. De eerst genoemde dieren bevatten voor zover bekend geen wildtype lentivirussen, die de huidige lentivirale vectoren kunnen complementeren en mobiliseren of waarmee ze kunnen recombineren (47). Hierdoor is de COGEM van mening dat in deze dieren de kans op het ontstaan van nieuwe lentivirussen verwaarloosbaar klein is.

Daarentegen kunnen niet-humane primaten wildtype lentivirussen bevatten, die de huidige lentivirale vectoren wel kunnen complementeren en mobiliseren of waarmee ze kunnen recombineren. In deze proefdieren is het dus mogelijk dat de interactie van een lentivirale vector met een wild type variant kan leiden tot het ontstaan van een nieuw lentivirus met onbekende eigenschappen (30, 32). Daarom adviseert de COGEM voor het gebruik van lentivirale vectoren in niet-humane primaten veelal hogere inperkingniveau's dan voor hetzelfde soort werkzaamheden in rat, muis of konijn. Dit extra risico vervalt echter als de niet-humane primaten niet besmet zijn met lentivirussen. In deze situatie is de COGEM van mening dat werkzaamheden met niet-humane primaten op dezelfde wijze ingeschaald dienen te worden als werkzaamheden met knaagdieren of andere dieren, die geen lentivirussen kunnen bevatten.

De in dit hoofdstuk gegeven inschaling geldt derhalve voor dieren, die voor zover bekend geen lentivirussen kunnen hebben of waarvoor afdoende is aangetoond dat de dieren ten tijde van het experiment niet geïnfecteerd zijn of kunnen worden met lentivirussen. Om aan te tonen dat de dieren vrij zijn van lentivirussen moet een algemeen geaccepteerde en als gevoelig aangemerkte methode worden gebruikt. In het geval dat dieren positief zijn getest op een of meerdere lentivirussen is de COGEM van mening dat de aanvraag apart beoordeeld moet worden. Dit geldt ook voor experimenten met dieren, waarvan het niet bekend is of ze geïnfecteerd zijn of kunnen worden met een lentivirus.

Bij het gebruik van lentivirale vectoren in dierexperimenten maakt de COGEM onderscheidt tussen een *in vivo* en een *ex vivo* toediening. In het geval van een *in vivo* toediening wordt de lentivirale vector direct in het proefdier geïnjecteerd. In het geval van de zogenaamde *ex vivo* toediening wordt het proefdier geïnjecteerd met cellen, die *in vitro* zijn getransduceerd met lentivirale vectoren.

4.2. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de eerste generatie

Conform de Regeling GGO worden lentivirale vectoren, die geproduceerd zijn met het productiesysteem van de eerste generatie geclassificeerd als een volvirulent HIV virus (21). Op basis van deze classificatie adviseert de COGEM de transductie van dieren met deze lentivirale vectoren en de langdurige fok van dieren die getransduceerd zijn met deze vectoren in te schalen op DM-III niveau. De werkzaamheden met weefsels of cellen die afkomstig zijn uit dieren adviseert de COGEM in te schalen op ML-III niveau.

4.3. Handelingen met vectoren geproduceerd met een packagingsysteem van de tweede of derde generatie

4.3.1. Transductie van dieren met lentivirale vectoren

Tweede generatie packagingsysteem met SIN of niet-SIN vector

Op grond van de afwezigheid van wildtype lentivirussen in de betreffende proefdieren is de COGEM voor lentivirale vectoren die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de tweede generatie van mening dat de mogelijkheid op het ontstaan en verspreiden van nieuwe lentivirussen verwaarloosbaar klein is.

Uit de beschikbare epidemische literatuur valt af te leiden dat horizontale transmissie van HIV tussen gezinsleden zeldzaam is indien sexuele of percutane blootstelling uit blijft (57, 58, 59). In het zeldzame geval dat er toch besmetting met HIV was opgetreden, leek deze terug te voeren op blootstelling van beschadigde huddelen aan besmet bloed. Door de kans op bijtincidenten kan de COGEM in het geval van proefdierexperimenten horizontale transmissie derhalve niet volledig uitsluiten. Hierdoor is het in theorie mogelijk dat lentivirale vectordeeltjes die afkomstig zijn uit het oorspronkelijke inoculum en niet zijn opgenomen door cellen van het getransduceerde dier via horizontale verspreiding overgaan naar andere dieren. Door het gebruik van het VSV-G envelop eiwit is de COGEM echter van mening dat een groot deel van de toegediende lentivirale vectoren de initiële gastheer zal infecteren, waardoor het aantal vrije vectordeeltjes in het dier sterk zal afnemen. Bovendien is de halfwaardetijd van een dergelijk viruspartikel bij 37°C ongeveer tien uur. De periode dat het virus infectieus is, als het extracellulair in het proefdier aanwezig blijft, is hierdoor beperkt. Op basis van deze reductie van het toegediende aantal infectieuze virusdeeltjes en de beperkte wijze waarop het virus overgedragen kan worden (3), acht de COGEM de kans klein dat er horizontale verspreiding op zal treden.

Bovendien geldt voor werkzaamheden in DM verblijven het algemene werkvoorschrift ter voorkoming van kruiscontaminatie. Hierdoor mogen alleen

dieren binnen één cohort in dezelfde kooi gehuisvest worden en moet mogelijk contact met andere dieren voorkomen worden. Onder navolging van dit werkvoorschrift acht de COGEM zelfs in het geval van een bijtincident de kans verwaarloosbaar klein dat de lentivirale vector op een naïef dier wordt overgedragen.

Op grond van bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat het DM-II inperkingsniveau mens en milieu voldoende bescherming biedt in het geval van een injectie van dieren met lentivirale vectoren of in het geval van een transplantatie van dieren met door lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen (22). Hierbij dient de virusbatch van niet-SIN vectoren getest te zijn op de afwezigheid van RCL. Om de vectorbatch te controleren op RCL dient een algemeen geaccepteerde en als gevoelig aangemerkte methode gebruikt te worden, zoals de p24 ELISA. Verder adviseert de COGEM voor de handelingen met dieren de volgende aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd of er dient een veiligheidsbril, mond – en neuskapje gedragen te worden,
- het te transplanteren materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

Derde generatie packagingsysteem met SIN vector; in vivo toediening

Voor de transductie van dieren met SIN vectoren die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de derde generatie baseert de COGEM zich op dezelfde overwegingen als genoemd voor de lentivirale vectoren geproduceerd met packagingsystemen van de tweede generatie. Op basis van deze overwegingen adviseert de COGEM de toediening van deze SIN vectoren aan dieren en de daarop volgende handelingen met de getransduceerde dieren op inperkingsniveau DM-II uit te voeren (37). Op basis van de overweging gesteld in paragraaf 3.3.1 acht de COGEM het niet noodzakelijk dat de lentivirale vectorbatch getest wordt op de aanwezigheid van RCL. Voor de *in vivo* transductie van dieren op DM-II niveau is de COGEM van mening dat de volgende aanvullende voorschriften in acht moeten worden genomen:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd of er dient een veiligheidsbril, mond – en neuskapje gedragen te worden.

Derde generatie packagingsysteem met SIN vector; ex vivo toediening

Uit de literatuur blijkt dat een SIN vector die geproduceerd is met een packagingsysteem van de derde generatie niet gemobiliseerd kan worden uit een

geïnficeerde cel door een additionele infectie met HIV (6, 56). Op basis van deze data en vanwege het feit dat de bedoelde proefdieren geen wildtype lentivirussen (kunnen) bevatten, is de COGEM van mening dat de mogelijkheid op complementatie van deze lentivirale SIN vectoren verwaarloosbaar klein is. Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat transplantatie van de getransduceerde cellen in de proefdieren en daarop volgende handelingen op D-I inperkingsniveau kunnen plaatsvinden (36), indien aan de volgende twee voorwaarden is voldaan:

- de zoogdiercellen zijn getransduceerd onder navolging van de voorschriften die de COGEM heeft uitgevaardigd voor transductie werkzaamheden onder ML-II niveau (zie paragraaf 3.3.2.b),
- de getransduceerde cellen zijn op het moment van transplantatie vrij van infectieuze lentivirale vectordeeltjes. Ofwel, de reductie is door wasstappen en halfwaardetijd minimaal 100 maal hoger dan de oorspronkelijke inoculumdosis (reductieratio ≥ 100).

Om mogelijke risico's voor mens en milieu verder te beperken, dienen voor de transplantatie van de cellen en andere handelingen met de proefdieren de volgende aanvullende voorschriften in acht genomen te worden:

- open handelingen moeten in een veiligheidskabinet klasse-II worden uitgevoerd,
- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht,
- het te transplanteren materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

4.3.2. Langdurige fok van lentiviraal getransduceerde dieren

Lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de tweede generatie

In 2007 heeft de COGEM geadviseerd dat de inschaling van handelingen met nakomelingen (tiende generatie) van ratten die getransduceerd zijn met een tweede generatie lentivirale SIN vector uitgevoerd kunnen worden op D-I niveau (27). In lijn met dit advies, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat in dieren complementatie en mobilistatie van de lentivirale vector optreedt, als er voor de dieren geen lentivirussen bekend zijn die dit kunnen bewerkstelligen of er afdoende is bewezen dat de dieren ten tijde van het experiment niet geïnficeerd zijn en worden met een lentivirus. Een test op een mogelijke aanwezigheid van RCL in deze proefdieren is volgens de COGEM niet nodig.

Aangezien de vectordeeltjes niet overgedragen kunnen worden van generatie op generatie en de deeltjes instabiel zijn bij lichaamstemperatuur met een halfwaarde tijd van tien uur, is de COGEM van mening dat er in alle

nakomelingen (vanaf F1) van getransduceerde dieren geen vrije vectordeeltjes meer aanwezig kunnen zijn en uitgescheiden kunnen worden. De kans dat laboratorium-medewerkers geïnfecteerd raken met de lentivirale vector door werkzaamheden met nakomelingen van de getransduceerde dieren acht de COGEM dan ook verwaarloosbaar klein. Indien de virusbatch negatief is getest op RCL, is zij derhalve van mening dat alle nakomelingen van lentiviraal getransduceerde dieren zonder aanvullende voorwaarden gehuisvest kunnen worden op D-I niveau.

Lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de derde generatie

Voor het terugplaatsen van de geïnfecteerde dieren naar D-I niveau is het van belang dat er geen extracellulair virus meer in het dier aanwezig is. Gezien de korte halfwaardetijd van het virus bij 37°C acht de COGEM de kans klein dat er na twee weken nog extracellulair virus in het dier aanwezig is. De COGEM heeft in het verleden geadviseerd dat geïnfecteerd muizen twee weken na infectie terug geplaatst kunnen worden naar D-I niveau (24). Om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen adviseert de COGEM terugplaatsing van lentiviraal getransduceerde dieren naar D-I toe te staan indien aan het volgende aanvullende voorschrift is voldaan:

- op de dag van de terugplaatsing naar D-I niveau zouden er op basis van de halfwaardetijd van de lentivirale vector geen infectieuze partikels meer in de proefdieren aanwezig moeten zijn. Hierbij wordt een minimum gesteld van 14 dagen na transductie.

Alle nakomelingen (F1 en verder) van getransduceerde dieren kunnen teruggeplaatst worden naar D-I niveau, aangezien de veiligheid van lentivirale vectoren, die geproduceerd zijn met het packagingsysteem van de derde generatie in dieren zonder relevante lentivirussen volgens de COGEM voldoende is aangetoond (25, 36). Zij acht het daarom niet noodzakelijk dat de dieren worden getest op de afwezigheid van de lentivirale vector en RCL.

4.3.3. Handelingen met cellen of weefsels afkomstig uit getransduceerde dieren

Lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de tweede generatie

Indien de getransduceerde dieren, waaruit de betreffende cellen afkomstig zijn op DM-II niveau ingeschaald waren, is de COGEM van mening dat voor werkzaamheden met deze cellen de inschaling op ML-II voldoende bescherming biedt voor mens en milieu (22). Hierbij adviseert zij de volgende aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd of er dient een veiligheidsbril, mond – en neuskapje gedragen te worden.

Onder bepaalde voorwaarden is de COGEM echter van mening dat handelingen met cellen of weefsels uit getransduceerde dieren omlaag geschaald kunnen worden naar ML-I niveau, zonder dat de veiligheid voor mens en milieu daarbij in het geding komt. De voorwaarden waaraan voldaan moet worden om deze omlaagschaling te rechtvaardigen zijn:

- er is gebruik gemaakt van een SIN transfervector,
- op basis van de halfwaardetijd van de lentivirale vector zijn er op het moment van de isolatie van desbetreffende cellen geen infectieuze partikels meer in de proefdieren aanwezig.

Lentivirale vectoren geproduceerd met het packagingsysteem van de derde generatie

Als de getransduceerde dieren, waaruit de betreffende cellen of weefsels afkomstig zijn op DM-II niveau ingeschaald waren, adviseert de COGEM de handelingen met deze cellen of weefsels op ML-II niveau in te schalen (22, 39). Hierbij moeten de volgende aanvullende voorschriften in acht worden genomen:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen,
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd of er dient een veiligheidsbril, mond – en neuskapje gedragen te worden.

Indien voor de getransduceerde dieren is voldaan aan de voorwaarden die in de vorige paragraaf zijn gesteld voor een inschaling op D-I niveau, is de COGEM van mening dat handelingen met weefsels en cellen afkomstig uit deze dieren zonder aanvullende voorschriften op ML-I niveau uitgevoerd kunnen worden (36).

Conform een eerder uitgebracht advies (33), wil de COGEM hier aan toevoegen dat indien het handelingen betreft met cellen die gefixeerd zijn in een 4% paraformaldehyde oplossing, deze volgens de COGEM veilig kunnen plaatsvinden buiten inperking. Na inactivatie van de getransduceerde cellen met bovengenoemde fixatie methode acht de COGEM de risico's voor mens en milieu als gevolg van de analyse van deze cellen verwaarloosbaar klein.

4.4. Handelingen met vectoren geproduceerd met het Lenti-X of het translentiviraal packagingsysteem

Zoals reeds opgemerkt in paragraaf 3.4.1 is de COGEM van mening dat de kans op het ontstaan van RCL bij de productie van zowel SIN als niet-SIN vectoren met het Lenti-X of translentiviraal productiesysteem verwaarloosbaar klein is. Voor dierexperimenten met SIN of niet-SIN vectoren die geproduceerd zijn met dit type productiesysteem is zij derhalve van mening dat dezelfde richtlijnen gehanteerd kunnen worden als voor dierexperimenten met SIN vectoren die geproduceerd zijn met het productiesysteem van de derde generatie. Ook hier geldt als voorwaarde dat de dieren voor zover bekend geen gastheer zijn voor lentivirussen of het dieren betreft waarvoor afdoende is aangetoond dat ze ten tijde van het experiment niet geïnfecteerd zijn of kunnen worden met lentivirussen.

5. Conclusie

In de regeling GGO worden lentivirussen als HIV, HTLV en SIV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. Conform deze indeling worden *in vitro* en *in vivo* laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren die van deze lentivirussen zijn afgeleid, ingeschaald op respectievelijk ML-III en DM-III inperkingsniveau. Door de ontwikkeling van verbeterde productiesystemen en veiligere lentivirale vectoren hebben vergunningaanvragers in de loop der jaren meerdere malen verzocht de werkzaamheden omlaag te schalen. Op basis van de toenemende kennis over en ervaring met de lentivirale vectoren heeft de COGEM geoordeeld dat voor werkzaamheden met de lentivirale vectoren de bovengenoemde ontwikkelingen hebben geleid tot een afname van de risico's voor mens en milieu. In lijn met deze beoordeling heeft zij verschillende malen geadviseerd om werkzaamheden met lentivirale vectoren omlaag te schalen.

Bij de risicoanalyse die aan de inschaling ten grondslag ligt, spelen een aantal aspecten een rol waaronder de mogelijke gevolgen van de aanwezigheid van lentivirussen, de kans op het ontstaan van RCL en de mogelijke aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes.

Voor *in vitro* werkzaamheden acht de COGEM de afwezigheid van lentivirussen in het te gebruiken gastheer materiaal een belangrijke voorwaarde voor de omlaagschaling naar een ML-II inperkingsniveau. Voor deze omlaagschaling stelt de COGEM tevens de voorwaarde dat er tijdens de vectorproductie geen RCL is ontstaan. Een verdere omlaagschaling naar ML-I niveau is alleen van toepassing indien er aannemelijk gemaakt kan worden dat er geen vrije lentivirale vectordeeltjes meer in het experiment aanwezig zijn. Als handleiding voor de inschaling van de *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren heeft de COGEM een beslisboom ontwikkeld. Deze is weergegeven in figuur 1 (pagina 9). Een gedetailleerd overzicht over de inschaling en bijbehorende voorwaarden van de verschillende *in vitro* werkzaamheden wordt gegeven in tabel 1 (pagina 7).

Voor de omlaagschaling van *in vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren naar een DM-II inperkingsniveau acht de COGEM het van essentieel belang dat de betreffende dieren geen lentivirussen bevatten en het te gebruiken virusinoculum vrij is van RCL. Voor met name de langdurige fok van getransduceerde dieren adviseert de COGEM de werkzaamheden verder omlaag te schalen naar D-I niveau. Voor deze omlaagschaling vormt de afwezigheid van vrije lentivirale deeltjes in de dieren de voornaamste voorwaarde. Figuur 2 (pagina 10) bevat een beslisboom voor de inschaling van de verschillende *in vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren. In tabel 2 (pagina 8) wordt een gedetailleerd overzicht gegeven over de inschaling van en aanvullende voorschriften voor deze werkzaamheden.

Referenties

1. Knipe DM and Howley PM (eds) Fields Virology. **Chap. 59**: HIVs and their replication. 1971-2041
2. Knipe DM and Howley PM (eds) Fields Virology. **Chap. 60**: Pathogenesis and medical aspects of HIV-1 infection. 2043-2094
3. Sewell DL. (1995) Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:389-405
4. Manilla P *et al.* (2005) Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum. Gene Ther.* **16**:17-25
5. Miyoshi H *et al.* (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* **72**:8150-8157
6. Zufferey R *et al.* (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* **72**:9873-9880
7. Higashikawa F and Chang L (2001) Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**:124-31
8. Blauvelt A *et al.* (1997) Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J. Clin. Invest.* **100**:2043-2053
9. Logan AC *et al.* (2004) Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J. Virol.* **78**:8421-8436
10. Hanawa H *et al.* (2005) Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J. Virol.* **79**: 8410-8421
11. Smith-Franklin BA *et al.* (2002) Follicular dendritic cells and the persistence of HIV infectivity: the role of antibodies and Fcγ receptors. *J. Immunol.* **168**:2408-2414
12. Geijtenbeek TB *et al.* (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-597
13. Kwon DS *et al.* (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**:135-144
14. Smith BA *et al.* (2001) Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J. Immunol.* **166**:690-696
15. Wilflingseder D *et al.* (2005) Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol. Immunol.* **42**:229-237
16. Wu Z *et al.* (2003) Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J. Infect. Dis.* **188**:1473-1482
17. DePollo NJ *et al.* (2000) VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* **2**:218-222

18. Howett MK *et al.* (1999) A broad-spectrum microbicide with virucidal activity against sexually transmitted viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:314-321
19. Tang SB *et al.* (1991) Inactivation of HIV-1 by trypsin and its use in demonstrating specific virus infection of cells. *J. Virol. Methods* **33**:39-46
20. Urdaneta S *et al.* (2005) Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). *Retrovirology* **2**:28
21. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en het Besluit Genetisch Gemodificeerde Organismen (2004)
22. COGEM (2002) Advies kennisgeving GGO 94-454/1, GGO 01-154 en GGO 01-159/3. (CGM/020823-05)
23. COGEM (2001) Advies kennisgeving GGO 00-159/1. (CGM/010213-01)
24. COGEM (2003) Productie en gebruik van virale vectoren t.b.v. gerichte somatische gen modificatie in muizen. (CGM/030401-02)
25. COGEM (2003) Terugplaatsing van proefdieren vervaardigd met derde generatie lentivirale vectoren. (CGM/031001-01)
26. COGEM (2004) Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte. (CGM/040209-01)
27. COGEM (2007) Inschaling handelingen lentiviraal getransduceerde ratten van de tiende generatie. (CGM/070718-02)
28. COGEM (2004) Microscopische handelingen met lentivirale vectoren. (CGM/041103-01)
29. COGEM (2005) Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen buiten inperking. (CGM/050309-01)
30. COGEM (2005) Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen. (CGM/050330-01)
31. COGEM advies CGM/051215-01, Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen
32. COGEM (2005) Implementatie van een lentivirus-afgeleid genoverdracht systeem. (CGM/050427-01)
33. COGEM (2005) Lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen. (CGM/050527-01)
34. COGEM (2005) Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte gebruikmakend van FACS en fluorescentiemicroscop. (CGM/050613-01)
35. COGEM (2005) Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen. (CGM/051129-01)
36. COGEM (2006) Omlaagschaling van werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen in associatie met ratten. (CGM/060328-01)
37. COGEM (2006) Handelingen met lentivirale vectoren in konijnen. (CGM061030-01)

38. COGEM (2006) Boordeling detectiemethoden voor replicatiecompetente lentivirale vectoren en vrije lentivirusdeeltjes. (CGM/060502-05)
39. COGEM (2006) Advies handelingen met lentiviraal getransduceerde cellen in apen. (CGM/060710-01)
40. COGEM (2007) Advies translentiviraal vectorsysteem. (CGM/070726-01)
41. COGEM (2008) Lenti-X lentivirus productiesysteem met niet-SIN vectoren. (CGM/080310-01)
42. Coul op de E *et al.* (2006) Schatting van het aantal volwassenen met HIV/aids in Nederland in 2005. *Infectieziektenbulletin* **17**: 398-403
43. Stichting HIV Monitoring (2007) Wetenschappelijk rapport 2007. www.hiv-monitoring.nl (9 feb. 2009)
44. Sastry L *et al.* (2003) Certification assays for HIV-1-based vector: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol. Ther.* **8**:830-839
45. 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.
46. Dull T *et al.* (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**:8463-8471
47. Van Regenmortel MHV (2000) Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
48. Vigna E and Naldini L (2000) Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* **2** :308-316
49. Kappes JC and Wu X (2002) Safety consideration in vector development *Somat. Cell Mol. Genet.* **126**: 147-158
50. Wu X *et al.* (2000) Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol. Ther.* **2**: 47-55
51. COC Nederland. Internet: www.coc.nl/dopage.pl?thema=hiv aids&pagina=view artikel &artikel_id=485 (26 juni 2008)
52. Delenda C (2004) Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J. Gene Med.* **6 suppl 1**: S125-38
53. Romano G (2005) Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect.* **18**: 128-134
54. Verhoeven E and Cosset FL (2004) Surface-engineering of lentiviral vectors. *J. Gene Med.* **6 Suppl. 1**: S83-94
55. Cockrell AS and Kafri T (2007) Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* **36**: 184-204
56. Bukovsky AA *et al.* (1999) Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus intrinsuced cells. *J. Virol.* **73**:4991-5000
57. Orth H *et al.* (2000) HIV transmission between two siblings in Africa. *AIDS* **14**:896

58. Hiemstra R *et al.* (2004) Unexplained HIV-1 infection in children-documenting cases and assessing for possible risk factors *S. Afr. Med. J.* **94**:188-193
59. Salvatori F *et al.* (1998) Horizontal transmission of human immunodeficiency virus type 1 from father to child. *AIDS Red. Hum. Retroviruses* **14**:1679-1685