

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

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IG 05-020.co1	16 maart 2005	CGM/050330-01	30 maart 2005
Onderwerp			
Advies kennisgeving IG 05-020			

Geachte heer Van Geel,

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

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met beenmergcellen die geïnfecteerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. Deze cellen zullen getransplanteerd worden in bestraalde apen. Het doel is te onderzoeken of de beenmergcellen in de apen overleven en de ontwikkeling van de transgene stamcellen te volgen. De aanvrager verzoekt om de dierexperimenten onder een lager inperkingsniveau dan DM-III, uit te voeren. Tevens verzoekt de aanvrager om microscopische handelingen met de genetisch gemodificeerde cellen te mogen verrichten in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking).

Voor aanvang van het experiment wordt het viruspreparaat getest op de aanwezigheid van retrovirussen die zich kunnen vermenigvuldigen (replicatie-competent retrovirussen, RCR). De COGEM is van mening dat met de voorgestelde test niet kan worden uitgesloten dat de gebruikte virusbatch RCR bevat. Ook kan niet worden uitgesloten dat zich detecteerbare hoeveelheden infectieuze vectordeeltjes in het transplantaat bevinden op het moment dat dit aan de proefdieren wordt toegediend. Hierdoor is de kans aanwezig dat deze vectordeeltjes recombineren met mogelijk in de apen aanwezige (onbekende) wildtype lentivirussen. Nieuwe recombinante virussen met andere eigenschappen zouden dan kunnen ontstaan die zich in het milieu kunnen verspreiden. De COGEM is van mening dat de veiligheid voor mens en milieu alleen gewaarborgd is als de voorgenomen dierexperimenten op minimaal DM-III en de microscopische handelingen op minimaal ML-II inperkingsniveau plaatsvinden.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bastiaan Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

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

Titel: Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen

COGEM advies: CGM/050330-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over experimenten met apen (*Macaca mulatta*) in associatie met lentivirussen. De aanvrager is voornemens om uit apen geïsoleerde beenmergcellen te infecteren met derde generatie 'self-inactivating' (SIN) lentivirale vectoren. Middels de vectoren worden een reporter-gen of signaaltransductiegenen tot expressie gebracht. Vervolgens worden de hematopoïetische stamcellen getransplanteerd in de apen. De aanvrager verzoekt om deze dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau uit te voeren. Daarnaast zullen handelingen (FACS analyse en fluorescentiemicroscoop) met cellen van de getransplanteerde apen uitgevoerd worden in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking).

Het doel van het experiment is om te onderzoeken of de getransplanteerde beenmergcellen in de apen overleven en of het transgen tot expressie komt. Het onderzoek zal een bijdrage leveren aan de verdere ontwikkeling van beenmergtransplantaties.

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van de retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een genoverdrachtsysteem. Dit systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel. Lentivirale vectoren hebben het voordeel dat ze naast delende cellen ook niet-delende cellen kunnen infecteren. Als basis voor de lentivirale vector wordt gebruik gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1). Het genoom van HIV-1 bevat naast de structurele genen *gag*, *pol* en *env*, zes andere genen (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* en *rev*) (1). Deze genen zijn essentieel voor replicatie en virulentie van het virus.

Uit veiligheidsoogpunt is het van belang dat er tijdens de vectorproductie geen replicatie-competent retrovirus (RCR) kan ontstaan. Daarom zijn er in de loop der jaren verschillende lentivirale vectorsystemen ontwikkeld. Het meest geavanceerde systeem is het derde-generatie vector systeem. In dit systeem zijn de benodigde virale genen en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (2). Voor de productie van derde-generatie lentivirale vectoren zijn de *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* en *nef* genen niet nodig en verwijderd. Dientengevolge bevatten deze systemen minder dan 65% van de oorspronkelijke virale sequenties (3).

Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in vier plasmiden, die een minimum aan overlappende sequenties bevatten, verkleint de kans op RCR vorming aanzienlijk.

Voor de vorming van RCR zijn nu minimaal drie recombinatie gebeurtenissen vereist. Daarnaast draagt het gebruik van zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vectoren (zoals de betreffende lentivirale vector) bij aan een hogere bioveiligheid (3). Bij de SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties gedeleteerd uit de 3'LTR van de vector. Hierdoor mist de vector na reverse transcriptie een functionele promotor in de LTR, waardoor er geen transcripten worden gemaakt die het 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is voor het inpakken van infectieuze vectordeeltjes, bevatten. Het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel wordt na infectie met een complementerend recombinant virus uitermate klein (4).

De adviesvraag

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met hematopoietische stamcellen die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. De hematopoietische stamcellen worden uit het bloed of beenmerg van apen geïsoleerd. De dieren zijn speciaal voor de experimenten gefokt en worden niet in het wild gevangen. De geïsoleerde cellen worden in kweek gebracht om ze te vermeerderen.

Het oorspronkelijke envelopeiwit, dat ondermeer de weefsel specificiteit van het virus bepaalt, is in de lentivirale vectoren vervangen door het glycoproteïne G eiwit van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G) of het envelopeiwit RD114 van het *Feline endogenous retrovirus*. Als gevolg van deze pseudotypering kan het virus in principe een groot aantal celtypen infecteren, waardoor de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefsel tropisme heeft verkregen (5). Middels de vectoren wordt een reporter gen ('green fluorescent protein', GFP) of signaaltransductiegenen (STAT5a/STAT5b) tot expressie gebracht. Van de STAT eiwitten wordt verondersteld dat zij na transductie van hematopoietische stamcellen een selectief groeivoordeel verschaffen. Deze derde generatie vectoren zullen vervaardigd worden onder ML-II condities met aanvullende voorschriften.

De gekweekte cellen worden maximaal twee dagen getransduceerd met lentivirale vectoren met een lage 'multiplicity of infection' (MOI). De aanvrager streeft naar een transductie-efficiëntie van maximaal één integratie van het transgen per cel. Na de laatste toevoeging van lentivirale vectoren aan de cellen, zullen deze nog minimaal 24 uur gekweekt worden. Voordat de getransduceerde hematopoietische stamcellen worden teruggeplaatst in het bestraalde dier, zullen de cellen twee maal gewassen worden met een fysiologische zoutoplossing om de eventueel nog aanwezige vectoren te verwijderen.

Na transplantatie wordt dagelijks bloed, en éénmaal per twee weken beenmerg, van de dieren afgenomen. De hieruit afkomstige levende cellen zullen gebruikt worden voor FACS analyse en fluorescentiemicroscopie. Tevens worden de getransduceerde cellen vóórdat ze in de apen getransplanteerd worden op deze wijze geanalyseerd. De aanvrager verzoekt om deze open handelingen buiten inperking uit te voeren.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft reeds eerder over soortgelijke adviesvragen geadviseerd (CGM/040209-01, CGM/041103-01 en CGM/050309-01). In deze vragen betrof het open of gesloten handelingen met derde generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen buiten inperking of op ML-I inperkingsniveau.

Met betrekking tot open handelingen buiten een inperkende ruimte heeft de COGEM destijds geadviseerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn (CGM/041103-01). In die aanvraag was de virusbatch op afwezigheid van RCR getest. De cellen werden gedurende één week gekweekt onder fysieke inperking (ML-II niveau) alvorens de cellen buiten inperking bestudeerd werden. Na de kweekperiode werden de cellen één maal gewassen met humaan serum waarbij de COGEM één extra wasstap met medium heeft geadviseerd om de hoeveelheid genetisch gemodificeerd virus verder te reduceren tot niet aantoonbare hoeveelheden.

Handelingen met apen in associatie met lentivirale vectoren worden in de regel ingeschaald op DM-III in een isolator of onder DM-III met aanvullende voorschriften die gelden voor apen in associatie met volvirulent HIV-1. Dit is gebaseerd op vermeende interacties tussen de lentivirale vector en de in de aap aanwezige (onbekende) lentivirussen en het ontstaan van RCR of mobilisatie van de vector (CGM/020823-05).

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van een zelfinactiverende (SIN) derde generatie lentivirale vector. Een risico bij de productie van lentivirale vectoren is het ontstaan van RCR die zich in het milieu kunnen verspreiden. Door gebruik van het derde generatie lentivirale systeem zijn minimaal drie homologe recombinatie gebeurtenissen vereist, voordat RCR kan worden gevormd (3). Voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCR vorming bij gebruik van deze vectoren (6). In onderhavige aanvraag is echter sprake van een verzoek om met lentivirale vectoren getransduceerde hematopoietische stamcellen in apen te transplanteren. Deze apen kunnen wildtype lentivirussen bevatten die met de vectoren kunnen recombineren tot nieuwe virussen met andere eigenschappen. Derhalve acht de COGEM het in het kader van het voorzorgsprincipe van belang dat de virusbatch voor transductie wordt gecontroleerd op de vorming van RCR's.

Replicatie competent retrovirus

De aanvrager geeft aan dat het testen op aanwezigheid van RCR in de virusbatch plaatsvindt via standaard *in vitro* methoden met adherente cellen (bijvoorbeeld humane HeLa cellen, Rat-2 cellen, of NIH-3T3 muizencellen). Tevens geeft de aanvrager aan dat met behulp van moleculaire biologische detectietechnieken (PCR)

getest wordt of de kweekvloeistof (supernatant) afkomstig van de adherente test cellen geen virale componenten bevat.

De COGEM is van mening dat de door de aanvrager genoemde adherente cellen niet geschikt zijn om een uitspraak te doen over de afwezigheid van RCR in de virusbatch. De voorgestelde HeLa cellen, Rat-2 cellen, en 3T3-MIH muizencellen zijn niet in staat om wildtype HIV te laten repliceren (3). Omdat HIV in deze cellen niet kan repliceren is onzeker of eventuele aanwezige lentivirale RCR's wel in deze cellen kunnen repliceren. Een negatief resultaat zal derhalve geen uitsluitel geven over de afwezigheid van RCR in de virusbatch. De COGEM heeft eerder het gebruik van humane T-cel lymfoma's (SupT1 cellen) geadviseerd voor het testen op RCR, aangezien wildtype HIV in deze cellen kan repliceren (CGM/041103-01). Daarnaast geeft de aanvrager geen details over de standaard *in vitro* testmethoden, zoals de kweektijd van de cellen, gevoeligheid van de methode en welke controles gebruikt worden. Hierdoor is het moeilijk om te oordelen over de gevoeligheid en betrouwbaarheid van zowel de testmethode met cellen als de PCR methode. Derhalve is de COGEM van mening dat de beschreven testmethoden voor het vaststellen van aanwezigheid van RCR in de virusbatch niet afdoende is en dat niet geconcludeerd kan worden dat de virusbatch vrij is van RCR.

Vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes

De stabiliteit van virale vectoren wordt beïnvloed door verschillende factoren waaronder de temperatuur (7). Verhogen van de temperatuur verlaagt de halfwaardetijd van de vector. Voor lentivirale vectoren, die gepseudotypeerd zijn met het VSV-G eiwit, werd bij een temperatuur van 20°C een halfwaardetijd van circa 50 uur en bij 37°C van circa 10 uur gevonden. Voor 45°C en 50°C werd zelfs een halfwaardetijd van minder dan een uur gevonden (7). In de huidige aanvraag wordt, naast een met VSV-G gepseudotypeerde vector, ook een lentivirale vector gebruikt die gepseudotypeerd is met het RD114 eiwit. Hiervan is de halfwaardetijd niet bekend.

De uit de apen geïsoleerde hematopoietische stamcellen worden minimaal 24 uur blootgesteld aan de lentivirale deeltjes. De getransduceerde cellen worden vervolgens tweemaal gewassen met fysiologische zoutoplossing waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd. Na deze wasstappen zullen de getransduceerde cellen getransplanteerd worden in de apen. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke concentratie na 24 uur kweek met een factor 5,3 ($= 2^{2,4}$) verlaagd. Hierbij is aangenomen dat de lentivirale vectoren die gepseudotypeerd zijn met het RD114 eiwit of het VSV-G eiwit dezelfde halfwaardetijd hebben. Tijdens het wassen van de cellen met fysiologische zoutoplossing zal het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes verder gereduceerd worden met ongeveer 95% (factor 20 reductie). Aangezien er tweemaal gewassen wordt zal de uiteindelijke hoeveelheid vrije vectordeeltjes met een factor $2,1 \times 10^3$ ($= 2^{2,4} \times 20 \times 20$) verlaagd zijn. Ter vergelijking: bij een kweekperiode van minimaal één week bij 37°C met twee wasstappen is het

aantal infectieuze vectordeeltjes met factor $5,2 \times 10^7$ ($= 2^{17} \times 20 \times 20$) verlaagd. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat met deze factor de hoeveelheid lentivirale vectoren gereduceerd is tot niet-detecteerbare hoeveelheden (CGM/050309-01).

De aanvrager streeft naar een transductie-efficiëntie van maximaal één integratie van het transgen per cel (MOI = 1). Onder optimale omstandigheden betekent dit dat elke cel met één vectordeeltje geïnfecteerd wordt. Volgens de aanvrager zullen minimaal 3×10^4 cellen/kg getransplanteerd worden in apen van 3 tot 4 kg. Hieruit volgt dat tenminste 9×10^4 cellen getransplanteerd zullen worden. Om een MOI van 1 te bereiken zijn derhalve minimaal 9×10^4 infectieuze vectordeeltjes nodig. Bij een reductie van het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes met factor $2,1 \times 10^3$ zullen dus tenminste 40 ($= 9 \times 10^4 / 2,1 \times 10^3$) infectieuze vectordeeltjes aanwezig blijven die toegediend worden aan de proefdieren. Daarbij worden de cellen niet met virusinactiverende agentia zoals trypsine of serum gewassen, maar met fysiologische zoutoplossing. Hierdoor blijven de achtergebleven vrije vectordeeltjes actief en infectieus. (7-9). De COGEM is derhalve van mening dat er detecteerbare hoeveelheden vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes in het transplantaat aanwezig blijven.

Transplantatie in apen

De getransduceerde cellen brengen een reportergen (GFP) of signaaltransductiegenen (STAT5a/STAT5b) tot expressie. Het groen fluorescerend eiwit GFP is oorspronkelijk afkomstig uit de kwal *Aequorea victoria* en heeft een lange historie van veilig gebruik. De genen die coderen voor STAT eiwitten zijn afkomstig uit de mens en zijn betrokken bij de proliferatie en differentiatie van hematopoietische cellen. Van de STAT eiwitten wordt verondersteld dat zij na transductie van hematopoietische stamcellen een selectief groeivoordeel verschaffen. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu van deze transgenen verwaarloosbaar klein zijn.

De getransduceerde hematopoietische stamcellen zullen in dezelfde aap, waaruit ze geïsoleerd zijn, weer teruggebracht worden (autologe transplantatie). De betreffende donoraap is vóór de transplantatie sublethaal bestraald, waardoor onder andere beenmergstamcellen en cellen van het afweersysteem sterk verzwakt of afgedood zijn. Mogelijk kunnen hierdoor in de aap aanwezige virussen, die bij immunocompetente apen onderdrukt worden, gaan repliceren en in aantallen toenemen. Gezien het gegeven dat in het transplantaat mogelijk RCR's en vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn, bestaat er een kans dat recombinatie tussen de toegediende infectieuze lentivirale vectordeeltjes en in de aap aanwezige lentivirussen optreedt. Als gevolg van een dergelijke recombinatie kan een nieuw virulent recombinant lentivirus ontstaan met een veranderd gastheerbereik of weefsel tropisme. De kans op het ontstaan van recombinante virussen is klein aangezien een cel geïnfecteerd dient te zijn met zowel het toegediende infectieuze lentivirale

vectordeeltje als met het in de aap aanwezige lentivirus. Om het risico op het ontstaan van recombinante virussen verder te minimaliseren acht de COGEM het noodzakelijk dat het te gebruiken gastheermateriaal getest worden op de afwezigheid van alle bekende lentivirussen, zoals HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus type 1* (HTLV-1) en HTLV-2, *Simian T-cell lymphotropic virus* (STLV) en *Simian immunodeficiency virus* (SIV).

Indien de vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes (dus niet de RCR's) opgenomen worden door een cel verliezen de deeltjes hun membraan en envelopeiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij het eventueel openbreken (lyse) van cellen zullen derhalve geen infectieuze lentivirale vectordeeltjes vrijkomen. Recentelijk is bekend geworden dat in bijzondere situaties onder laboratoriumomstandigheden genomische transcripten kunnen ontstaan in hematopoietische cellen die getransduceerd zijn met derde generatie SIN lentivirale vectoren (10). Deze genomische transcripten zijn afkomstig van de lentivirale vector en kunnen, na co-infectie met HIV-1, recombinante infectieuze vectordeeltjes vormen. De efficiëntie en waarschijnlijkheid is echter zeer klein (10).

De aanvrager heeft aangegeven om de experimenten met apen uit te voeren onder DM-II inperking. De COGEM is van mening dat onvoldoende is aangetoond dat het transplantaat vrij is van RCR's en infectieuze lentivirale vectordeeltjes. Daarnaast zijn de sublethaal bestraalde apen immuungecompromiteerd, hetgeen bijdraagt aan de onzekerheid ten aanzien van recombinatie met mogelijk in de aap aanwezige lentivirussen. Derhalve acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu onvoldoende gewaarborgd indien de voorgestelde dierexperimenten onder DM-II condities worden uitgevoerd. De COGEM is van mening dat de door de aanvrager voorgestelde experimenten met lentivirale vectoren in combinatie met apen ingeschaald dienen te worden op DM-III niveau in een isolator of op DM-III niveau met aanvullende voorschriften, zoals die worden gebruikt voor de inschaling van vol-virulent HIV-1 in associatie met apen (CGM/020823-05).

Het uitvoeren van de betreffende dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau kan volgens de COGEM alleen toegestaan worden indien tenminste aan onderstaande voorwaarden voldaan is:

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

Daarbij acht de COGEM het dragen van handschoenen verplicht bij het uitvoeren van de dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau. Als met een gevalideerde en algemeen geaccepteerde methode is vastgesteld dat de virusbatch geen RCR's bevat kan er echter nog steeds contaminatie met andere virussen tijdens het kweken van de cellen optreden. De COGEM adviseert een aanvullend voorschrift op te nemen waarin gesteld wordt dat handelingen met verschillende viruskweken niet gelijktijdig in het veiligheidskabinet mogen plaatsvinden. Om de kans op contaminatie verder te minimaliseren is het tevens niet toegestaan de handelingen met de getransduceerde cellen uit te voeren binnen een tijdsbestek van 30 minuten nadat handelingen met een andere virusbevattende kweek in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden.

Analyse van cellen buiten inperking

Voorts is de aanvrager voornemens cellen afkomstig van de apen met behulp van FACS analyse en fluorescentiemicroscopie buiten inperking te bestuderen. Het betreft ondermeer getransduceerde hematopoietische cellen vóórdat ze getransplanteerd worden en bloed en beenmergcellen van getransplanteerde apen. Onduidelijk is of bij de experimenten, die uitgevoerd worden buiten de ingeperkte ruimte, open handelingen zullen plaatsvinden en of de meetapparatuur in contact komt met de geïnfecteerde cellen. Daarnaast kan niet worden uitgesloten dat de te bestuderen cellen besmet zijn met RCR's of vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes. Bij handelingen buiten inperking kunnen deze virussen relatief eenvoudig verspreid worden in het milieu, aangezien de aanwezige fysische barrière van de ruimte onvoldoende zal zijn om de virussen niet in het milieu te laten ontsnappen. Derhalve is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gewaarborgd kan worden met het uitvoeren van de beschreven experimenten buiten inperking.

Mits voldaan kan worden aan de bovengenoemde voorwaarden voor dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau, acht de COGEM het uitvoeren van FACS analyse en fluorescentiemicroscopie buiten inperking gerechtvaardigd. Hierbij dienen bepaalde ML-II werkvoorschriften en aanvullende voorschriften gerespecteerd te worden, zoals vermeld staan in het COGEM advies CGM/020823-05:

- tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen;
- alle open handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd;
- de laboranten moeten werken volgens de algemeen aanvaarde “veilige microbiologische technieken”;
- tijdens de werkzaamheden met de microscoop mogen geen werknemers in de ruimte aanwezig zijn die niet deelnemen aan het experiment;
- na afloop van de werkzaamheden worden de meetopstelling en werkoppervlakken gedesinfecteerd met 70% ethanol;
- het transport van de genetisch gemodificeerde cellen tussen het ingeperkte laboratorium en de ruimte alwaar de meetopstelling staat opgesteld vindt

plaats in een gesloten, breukvaste, lekdichte houder, die voor het vervoer uitwendig wordt ontsmet.

Concluderend is de COGEM van mening dat niet kan worden uitgesloten dat, de in de experimenten te gebruiken virusbatch, RCR's aanwezig zijn en dat in het transplantaat van de getransduceerde hematopoietische cellen nog vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn. Hierdoor is het niet uitgesloten dat recombinante virussen met andere (virulente) eigenschappen gevormd worden als gevolg van recombinatie van in de aap aanwezige (onbekende) wildtype lentivirussen en de toegediende infectieuze lentivirale vectordeeltjes. De COGEM is derhalve van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gewaarborgd is indien de dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau uitgevoerd worden. Dit geldt tevens voor de microscopische analyses van getransduceerde cellen in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen.

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

Referenties

1. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
2. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**, blz. 8463-71
3. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* **72**, blz. 9873-80
4. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* **72**, blz. 8150-7
5. Kafri, T. (2004). Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol Biol* **246**, blz. 367-90
6. 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

7. Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**, blz. 124-31
8. Tang, S. B. and Levy, J. A. (1991). Inactivation of HIV-1 by trypsin and its use in demonstrating specific virus infection of cells. *J Virol Methods* **33**, blz. 39-46
9. DePolo, N. J., Reed, J. D., Sheridan, P. L., Townsend, K., Sauter, S. L., Jolly, D. J., and Dubensky, T. W. Jr. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther* **2**, blz. 218-22
10. Logan, A. C., Haas, D. L., Kafri, T., and Kohn, D. B. (2004). Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol* **78**, blz. 8421-36.