

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

DATUM 10 maart 2008
KENMERK CGM/080310-01
ONDERWERP Advies: Lenti-X lentivirus productiesysteem met niet-SIN vectoren

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag van het Academisch Ziekenhuis Leiden betreffende de inschaling van werkzaamheden met een lentivirale vector die geproduceerd wordt met het Lenti-X productiesysteem van ClonTech Laboratories, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van de productie van niet-zelfinactiverende (niet-SIN) lentivirale vectoren met het Lenti-X productiesysteem van Clontech Laboratories. Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over daaropvolgende handelingen met de geproduceerde lentivirale vectoren. De aanvrager verzoekt om bovenstaande werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II niveau.

De COGEM heeft dit type werkzaamheden met een lentivirale vector in het verleden al vaker beoordeeld en ingeschaald op ML-II niveau. Het betrof in deze gevallen echter altijd een zelfinactiverende (SIN) lentivirale vector die met betrekking tot mobilisatie van de vector een hogere veiligheid biedt dan de in deze aanvraag genoemde niet-SIN vector. In onderhavige aanvraag wordt echter een nieuw type productiesysteem toegepast met extra maatregelen op gebied van de bioveiligheid.

Bij het Lenti-X productiesysteem zijn de benodigde genen verspreid over zes plasmiden. Daarnaast zijn enkele belangrijke HIV-1 genen afwezig in het productiesysteem en wordt de zogenaamde gag-pol structuur, die noodzakelijk is voor de vorming van een replicatiecompetent virus, niet gevormd. Hierdoor acht de COGEM de kans dat er tijdens de productie door recombinatie replicatiecompetent virus wordt gevormd, verwaarloosbaar klein.

Wat betreft het gebruik van de geproduceerde lentivirale vector in het aangegeven brede scala van cellen kan de COGEM niet uitsluiten dat de niet-SIN vector door een wildtype lentivirus gemobiliseerd wordt. Dit is echter slechts mogelijk in cellen die door wildtype lentivirussen te infecteren zijn en kan ondervangen worden door een test op relevante lentivirussen en het schoon aanhouden van deze cellijnen. De kans op RCL vorming acht de COGEM bij het *in-vitro* gebruik van de geproduceerde lentivirale vector onder deze voorwaarden verwaarloosbaar klein.

Dit alles maakt dat de COGEM van mening is dat de werkzaamheden kunnen plaatsvinden op ML-II niveau met in acht neming van enkele aanvullende voorschriften.

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 followed by a horizontal stroke and a small vertical tick.

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

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf
Dr. I. van der Leij

Inschaling van een niet-SIN lentivirus vector in combinatie met het Lenti-X productiesysteem

COGEM advies CGM/080310-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de productie van niet-zelfinactiverende (niet-SIN) lentivirale vectoren met het Lenti-X productiesysteem. Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over daaropvolgende handelingen met de geproduceerde lentivirale vectoren. De aanvrager is van plan om een niet-SIN vector te produceren in een beperkt aantal getransformeerde cellen van humane oorsprong. Vervolgens worden humane en animale cellen met deze lentivirale vector geïnfecteerd en wordt de transductie-efficiëntie vergeleken met de huidige lentivirale vectoren.

Gezien de veiligheidsvoordelen van een SIN lentivirale vector ten opzichte van een niet-SIN vector wordt in Nederland tot op heden alleen gewerkt met de SIN vectoren. Met het oog op de verbeteringen van het Lenti-X productiesysteem ten opzichte van derde generatie productiesystemen acht de aanvrager de risico's verbonden aan het gebruik van niet-SIN vectoren, zoals beschreven in onderhavige aanvraag vergelijkbaar met die van de SIN vectoren en verzoekt daarom de werkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II niveau in een veiligheidskabinet klasse II.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van lentivirussen en behoren tot de familie van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*). Dit type vectoren wordt veelvuldig gebruikt als gentransfersysteem omdat het stabiel integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel en omdat het zowel delende als niet-delende celen kan infecteren (1, 2, 3, 4).

Als basis voor de in deze aanvraag beschreven lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1). Het genoom van HIV-1 bevat drie structurele genen *gag*, *pol* en *env*. Daarnaast bevat het genoom vier accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*), die essentieel zijn voor replicatie en virulentie van het virus (5). Het lentivirale genoom bevat aan weerszijden zogenaamd *Long Terminal Repeats* (LTR's) die betrokken zijn bij replicatie en transcriptie.

Uit veiligheidsoogpunt is het van belang dat tijdens de vectorproductie geen replicatiecompetent lentivirus (RCL) kan ontstaan. Teneinde dit te voorkomen, zijn in de loop der jaren diverse productiesystemen ontwikkeld, de zogenaamde eerste, tweede en derde generatie productiesystemen. Bij dergelijke systemen zijn de virale genen die nodig

zijn voor de productie van de lentivirale vector verdeeld over verschillende plasmiden. Hierdoor is recombinatie tussen meerdere plasmiden noodzakelijk, voordat een replicerend virus zou kunnen ontstaan.

Bij de productiesystemen van de eerste en tweede generatie liggen de benodigde genen voor de lentivirale vectoren verspreidt over een drietal plasmiden (1). Bij de derde generatie productiesystemen zijn de benodigde genen verdeeld over vier plasmiden (1, 6). Op twee van deze plasmiden liggen de voor de productie van virusdeeltjes van belang zijnde HIV genen. Daarnaast bestaat dit productiesysteem uit een zogenaamd 'envelopcoderend' plasmide dat een envelopeiwit tot expressie brengt dat bepalend is voor het type gastheercel dat de virusdeeltjes kunnen infecteren. Het vierde plasmide is de zogenaamde transfervector. Dit plasmide bevat de *Long Terminal Repeats* (LTR's), het packagingsignaal en het transgen.

Om de bioveiligheid nog verder te verhogen zijn er zogenaamde zelf-inactiverend (SIN) transfervectoren ontwikkeld. Uit deze SIN vectoren zijn de *enhancer* en *promoter* sequenties (het U3 domein) uit de 3'LTR verwijderd. Tijdens 'reverse transcriptie' naar het provirale genoom wordt deze deletie gekopieerd naar de 5'LTR, waardoor initiatie van de transcriptie via Tat wordt verhinderd en de kans op eventuele mobilisatie van de vector aanzienlijk lager is (7, 8). Naast de reductie van de kans op mobilisatie en RCL-vorming verlaagt deze deletie van de *enhancer* en *promoter* sequenties ook het risico op de activering van een proto-oncogen als gevolg van insertionele mutagenese.

Bij de productie van een SIN vector met de derde generatie van productiesystemen zijn recombinaties tussen minimaal vier plasmiden vereist voordat de vorming van een replicatiecompetent lentivirus kan optreden. Tevens dient in het geval van een SIN vector de deletie in de 3'LTR hersteld te worden. Door deze maatregelen is de kans op RCL-vorming minimaal en is er met dit productiesysteem voor zover bekend nooit RCL waargenomen (1).

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een zogenaamd Lenti-X lentiviraal productiesysteem. Voor de productie van een lentivirale vector zijn de benodigde genen verdeeld over een zestal plasmiden. De HIV genen die noodzakelijk zijn voor de productie van virusdeeltjes zijn verdeeld over drie constructen. Hierbij zijn de genen *gag* en *pol*, die in het productiesysteem van de derde generatie samen aanwezig zijn op een plasmide, gesplitst en verdeeld over twee plasmiden. Het ene construct bevat de *gag-pro* genen en het andere het *pol* gen dat codeert voor het reverse transcriptase en integrase. Deze splitsing voorkomt het ontstaan van een functionele gag-pol structuur (9). Deze structuur is noodzakelijk voor mobilisatie van de vector met de vorming van RCL tot gevolg (9). Het derde construct bevat de lentivirale genen *tat* en *rev*. Het vierde plasmide is het 'envelopcoderende' plasmide, dat codeert voor het *Vesicular stomatitis virus* glycoproteïne G eiwit. Hierdoor kan het virusdeeltje een groot aantal celtypen

infecteren en heeft de lentivirale vector een groter gastheerbereik (3). Het vijfde plasmide expresseert een Tetracycline (Tet) afhankelijke transactivator. Deze transactivator is van belang voor de expressie van *gag-pro*, *tat* en *rev*. Het zesde plasmide is de transfervector en bevat de LTR's, het packagingsignaal en het transgen. De resulterende lentivirale vector is een niet-SIN vector.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden verscheidene malen geadviseerd over de productie van en de werkzaamheden met lentivirale vectoren. Het betrof hier werkzaamheden met de zogenaamde SIN lentivirale vectoren in combinatie met de productiesystemen van de tweede of derde generatie. Onder bepaalde voorwaarden heeft de COGEM geadviseerd de productie van de SIN vector en werkzaamheden met geproduceerde lentivirale vectoren in te schalen op ML-II niveau (11, 12, 13).

In de tweede en derde generatie productiesystemen zijn de benodigde lentivirus genen verdeeld over respectievelijk drie en vier plasmiden. Het Lenti-X productiesysteem maakt echter gebruik van zes plasmiden, waardoor de minimale kans op replicatie-competent lentivirus (RCL) nog verder wordt gereduceerd. Qua veiligheid en verdeling van de HIV-genen over verschillende plasmiden is het Lenti-X productiesysteem het beste te vergelijken met het translentivirale productiesysteem van Open Biosystems, waarover de COGEM onlangs heeft geadviseerd (14).

Dit translentivirale productiesysteem maakt, net als het LentiX systeem gebruik van zes plasmiden. Daarbij zijn *gag-pro* en *pol* gesplitst en verdeeld over twee plasmiden en staat de expressie van *gag-pro*, *tat* en *rev* onder invloed van de Tet afhankelijke transactivator. In tegenstelling tot de situatie in onderhavige aanvraag was de transfervector die in het translentivirale productiesysteem werd gebruikt echter een SIN vector. Naar aanleiding van desbetreffende vergunningaanvraag over dit translentivirale vectorsysteem heeft de COGEM geadviseerd infectie en analyse van animale cellen uit te voeren op ML-II niveau met als aanvullende voorschriften:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen.
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd.
- het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel.

Overweging en advies

De aanvrager verzoekt om de productie van een niet-SIN lentivirale vector met het Lenti-X productiesysteem uit te mogen voeren op ML-II niveau. De geproduceerde lentivirale vector wil hij gebruiken voor infectie van een uitgebreid assortiment aan cellen van zowel humane als animale oorsprong. Ook de infectie en analyse van deze cellen is de

aanvrager van plan uit te voeren op ML-II niveau. Om een uitspraak te kunnen doen over de inschaling van bovengenoemde werkzaamheden, dienen de risico's van dit productiesysteem beoordeeld te worden. Belangrijke risicoaspecten in deze vergunningaanvraag zijn de mogelijke mobilisatie van de te gebruiken niet-SIN transfervector en de vorming van RCL. Uitgesplitst naar de productie en het gebruik van geproduceerde lentivirale vectoren volgt hieronder de visie van de COGEM op deze risico's.

Productie van een niet-SIN vector met het Lenti-X productiesysteem

In het Lenti-X systeem zijn de aanwezige HIV genen verdeeld over drie plasmiden. Het HIV *env* gen is in dit productiesysteem niet aanwezig en wordt vervangen door het VSV-G eiwit. Dit eiwit wordt geëxprimeerd vanaf een vierde plasmide. Voordat er een RCL zou kunnen ontstaan, moeten deze vier plasmiden recombineren met de transfervector. Gezien de beperkte homologie tussen deze plasmiden is de kans op de vereiste recombinatie gebeurtenissen zeer klein en geeft de aanvrager aan dat er een aantal puntmutaties hersteld moet worden om functionele ORF's te creëren. Daarnaast moet er voor de expressie van *tat*, *rev*, *gag* en *pro* een andere promoter worden ingebouwd of dient de Tet-off cassette in de betreffende RCL opgenomen te worden. Hiervoor zijn additionele recombinaties nodig.

Zelfs indien alle recombinatie gebeurtenissen en restoratieve 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. Hierbij dient te worden opgemerkt dat de coderende sequentie voor Vpr wel aanwezig is in het Lenti-X productiesysteem, maar gefuseerd is aan de coderende sequentie van Pol. Door deze fusie aan reverse transcriptase en integrase worden beide eiwitten in het virusdeeltje ingepakt. Vpr komt in dit productiesysteem echter niet afzonderlijk tot expressie zoals het geval is in het wildtype lentivirus.

In het algemeen geldt dat bij gebruik van eenzelfde productiesysteem voor de productie van lentivirale vectoren de SIN vector meer veiligheid biedt dan de niet-SIN vector. Immers, de deletie van het U3 gebied in de 3'LTR van een SIN vector dient hersteld te worden alvorens een RCL gevormd kan worden. Uit de vergunningaanvraag blijkt dat de aanvrager niet-SIN transfervectoren wil gaan gebruiken in combinatie met het Lenti-X productiesysteem. In het Lenti-X productiesysteem zijn ten opzichte van de derde generatie van productiesysteem verbeteringen aangebracht die vergelijkbaar zijn met het translentiviraal productiesysteem. Voor dit laatste systeem is aangetoond dat deze verbeteringen de kans op RCL vorming substantieel verminderen (9, 10).

Door bovenstaande overwegingen en de overeenkomst met het translentivirale productiesysteem acht de COGEM de kans op RCL vorming bij de productie van een niet-SIN vector met het LentiX productiesysteem minstens zo klein als bij productie van een SIN vector met een derde generatie productie systeem.

In theorie is het mogelijk dat er door insleep van relevante wildtype lentivirussen het genoom van de transfervector en het genoom van een wildtype lentivirus tijdens de productie samen ingepakt worden in een virusdeeltje. Door een dergelijke co-packaging kan er een replicatiecompetent virus ontstaan. Dit kan alleen optreden als de cellen, die voor de productie worden gebruikt vatbaar zijn voor infectie met wildtype lentivirussen. De aanvrager is van plan voor de productie van lentivirale vectoren 293, 293T, 911, PER.C6, HeLa en HepG2 cellen te gebruiken. Voor zover bekend bij de COGEM worden deze cellen niet geïnfecteerd door wildtype HIV-1, HIV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere relevante lentivirussen. De kans op RCL vorming als gevolg van bovengenoemde co-packaging acht zij derhalve verwaarloosbaar klein. Op vergelijkbare grond acht zij het ook niet waarschijnlijk dat er door insleep van relevante lentivirussen mobilisatie en complementatie van de niet-SIN vector of recombinatie met de vector op zal treden.

Gezien het bovenstaande, adviseert de COGEM de productie van de niet-SIN lentivirale vector uit te voeren op ML-II niveau. Om de kans op verspreiding van de replicatiedeficiënte lentivirale vectoren door mobilisatie, recombinatie of complementatie met een wildtype lentivirus nog verder te reduceren voegt zij 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,
- het te gebruiken gastheer materiaal moet vrij zijn van HIV-1, HIV-2, SIV en andere relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel.

In-vitro studies met niet-SIN vectoren geproduceerd met het Lenti-X productiesysteem

Zoals hierboven beschreven, heeft de niet-SIN vector op het gebied van bioveiligheid een aantal nadelen ten opzichte van de SIN vector, zoals een verhoogde kans op mobilisatie en genactivatie. De lentivirusvector kan in principe gemobiliseerd worden door wildtype lentivirussen. De kans op mobilisatie hangt af van de mate waarin het Tat eiwit van het ingesleepte lentivirus de LTR van de lentivirale vector activeert. De COGEM wijst erop dat er hierbij onderscheid gemaakt moet worden tussen cellen van primaten en van de kat enerzijds en cellen afkomstig van diersoorten waarin tot op heden nog geen lentivirussen zijn aangetroffen, zoals hond, kip, konijn, muis, rat en varken anderzijds. De kans op mobilisatie is ook afhankelijk van de mate waarin de wildtype lentivirussen de gebruikte

celtypen kunnen infecteren. De COGEM merkt op dat mobilisatie alleen mogelijk is in de cellen van primaten en van de kat na infectie van deze cellen met HIV, SIV of *Feline immunodeficiency virus* (FIV). Door de cellen te testen op de afwezigheid van relevante virussen en door maatregelen te treffen tegen eventuele insleep van relevante lentivirussen zijn de mogelijke risico's echter aanzienlijk te reduceren.

Ten aanzien van recombinatie waaruit RCL kan ontstaan, acht de COGEM bovengenoemd onderscheid tussen SIN en niet-SIN vector niet van belang. De studies naar complementatie van het trans-lentivirale vectorsysteem wijzen uit dat de kans op RCL voor dit systeem substantieel kleiner is dan voor de derde generatie productiesystemen. Ondanks het gebruik van een niet-SIN vector acht zij op basis van deze gegevens de kans op RCL als gevolg van recombinatie met een relevant lentivirus verwaarloosbaar klein.

Wat betreft het derde mogelijke risico is de COGEM van mening dat transcriptionele effecten van de insertie van de beschreven niet-SIN lentivirale vector in het gastheer genoom niet uitgesloten kunnen worden. De promoteractiviteit van de HIV LTR is weliswaar afhankelijk van Tat, maar de COGEM voegt hieraan toe dat de promoter niet inactief is in afwezigheid van Tat. Zij schat het risico van gen-activatie door het gebruik van een niet-SIN vector derhalve hoger in dan dat van een SIN vector. Dit risico speelt met name een rol in het geval van een klinische toepassing van deze vector, maar de COGEM merkt hierbij op dat het gebruik van niet-SIN vectoren in mensen en proefdieren tot op heden niet is geassocieerd met het ontstaan van tumoren. Voor het bedoelde *in vitro* gebruik acht de COGEM het risico van gen-activatie verwaarloosbaar klein.

Concluderend, kan de COGEM instemmen met het uitvoeren van de werkzaamheden op ML-II niveau. 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, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1), HTLV-2, SIV en andere relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel,
- handelingen met replicatiecompetente virussen 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.

Conclusie

De COGEM is van mening dat de productie van een niet-SIN vector met het Lenti-X productiesysteem en de daaropvolgende werkzaamheden met deze lentivirale vector uitgevoerd kunnen worden op ML-II niveau. Met inachtneming van gestelde inperkingsmaatregelen en de voorgestelde aanvullende werkvoorschriften, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de voorgenomen experimenten verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Delenda C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S125-S138
2. Romano G. (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect* **18**: 128-134
3. Vigna E. en Naldini L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* **2**: 308-316
4. Naldini L. *et al.* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267
5. Van Regenmortel M.H.V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
6. Dull T. *et al.* (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**: 8463-71
7. Miyoshi H. *et al.* (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* **72**: 8150-7
8. Zufferey R. *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* **72**: 9873-80
9. Kappes J.C. en Wu X. (2002). Safety considerations in vector development. *Somat Cell Mol Genet* **126**: 147-158.
10. Wu X. *et al.* (2000). Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol Ther* **2**: 47-55
11. COGEM (2002) Advies kennisgeving GGO 94-454/1, GGO 01-154 en GGO 01-159/3. CGM/020823-05
12. COGEM (2001) Advies kennisgeving GGO 00-159/1. CGM/010213-1
13. COGEM (2005) Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. CGM/051215-01
14. COGEM (2007) Inschaling van handelingen met een translentiviraal vectorsysteem. CGM/070726-01