



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Doel

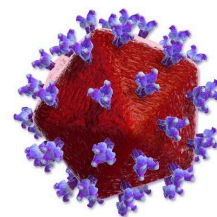
Het doel van deze factsheet is het bieden van relevante informatie die de BVF kan helpen bij het onderbouwen van een risicobeoordeling volgens bijlage 5 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.

Deze factsheet richt zich op lentivirussen en lentivirale vectoren afkomstig uit groep A van artikel 5.4.2: lentivirussen die zijn vervaardigd met een tweede generatie SIN-lentiviraal vectorsysteem, een derde generatie SIN-lentiviraal vectorsysteem of een al dan niet SIN translentiviraal vectorsysteem.

Achtergrond

Algemeen

Wildtype lentivirus	
Familie:	<i>Retroviridae</i>
Geslacht:	<i>Lentivirus</i>
Diameter:	~ 80-120 nm
Genoom	ssRNA (2 kopieën)
Pathogeniteitsklasse:	3



Lentivirale vectorsystemen

Lentivirussen worden vaak gebruikt in onderzoek vanwege hun vermogen om zowel delende als niet-delende cellen te infecteren en zijn zeer efficiënte systemen voor *in vivo* gene delivery. Lentivirale vectorsystemen zijn afgeleid van het humaan immunodeficiëntievirus (HIV).

Wijze van overdracht

Transmissie vindt primair plaats door direct contact met bloed en slijmvliezen, door seksueel contact, of transplacentair van moeder op kind of via borstvoeding. Omdat lentivirussen in het gastheergenoom integreren en endogeen kunnen worden, kan het virus worden geërfd door de nakomelingen van de gastheer.



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Lentivirale genen en hun rol

Gen	Beschrijving
3'LTR, 5'LTR	Het transgen wordt geflankeerd door twee long terminal repeats (LTR's). Alleen sequenties tussen de LTR's worden geïntegreerd in een viraal partikel en zodoende in het gastheergenoom. 5'-LTR fungeert als een promotor voor transcriptie, de 3'-LTR beëindigt de transcriptie. De wildtype LTR is ongeveer 630 bp lang.
(Δ U3) 3'LTR	3'LTR waarin de promotor en de enhancer zijn verwijderd waardoor de vector self-inactivating (SIN) wordt. De delta U3 3'LTR is ongeveer 234 bp lang.
5'LTR (truncated)	5'LTR met daarin een deletie waardoor de promotoractiviteit van de LTR wordt verwijderd, met als gevolg dat transcriptie niet plaats kan vinden. De getrunceerde 5'LTR moet daarom altijd aangevuld worden met een promotor sequentie (meestal een CMV of RSV) en is daardoor chimeer. De getrunceerde 5'LTR is zonder promotor sequentie ongeveer 181 bp lang.
Gag	Gag codeert voor structuur eiwitten bestaande uit matrix-, capsid- en nucleocapsid-componenten en is verantwoordelijk voor virale assemblage.
Pol	Pol codeert voor de enzymen reverse transcriptase (gebruikt om cDNA te genereren van RNA) en integrase (nodig voor integratie in het genoom van de gastheercel).
Env	Env is het envelopeiwit en kan vervangen worden om lentivirale vectoren te pseudotyperen (= het gastheerbereik veranderen). De lentivirale vector kan dan een veel breder spectrum van doelwitcellen infecteren.
Rev	Rev (Regulator of expression of virion proteins) reguleert RNA transport.
Tat	Tat (Trans-activator of transcription) stimuleert transcriptie vanaf de LTR.
RRE	RRE maakt mRNA-export van de kern naar het cytoplasma mogelijk.
Psi (Ψ)	Packaging signaal psi reguleert de verpakking van het virale genoom in de capsid.
vif	Accessoire gen.
vpr	Accessoire gen.
vpu	Accessoire gen.
nef	Accessoire gen.



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Ingeperkte lentivirale vectorsystemen

Ingeperkte lentivirale vectorsystemen behorende tot groep A zijn niet replicerende (replicatie-deficiënte), recombinante virale vectoren gebaseerd op HIV-1. De virale vector is zo ontworpen dat het ontstaan van replicatie-competent virus wordt voorkomen; alleen na een aantal specifieke recombinaties kan het virus repliceren.

Er bestaan verschillende productiesystemen voor het maken van replicatie-deficiënte lentivirale vectoren. Deze worden 'split'-packaging systemen genoemd. Dit houdt in dat verschillende virale genen worden gesplitst en herverdeeld over verschillende plasmiden, op zo'n manier dat de genetische informatie die nodig is voor de replicatie van een virusdeeltje niet in de te gebruiken lentivirale vector is verpakt. 'Split'-packaging systemen bestaan uit:

1. Transfer plasmide: Plasmide dat de twee LTR's en het transgen bevat.
2. Pseudotyping of envelop plasmide: Plasmide dat het envelop-eiwit bevat. Meestal wordt VSV-G gebruikt.
3. Helper plasmiden of packaging plasmiden: Dit zijn plasmiden die de genetische informatie voor virale verpakking en transductie bevatten. Omdat deze plasmiden geen LTR's en psi bevatten, wordt voorkomen dat deze genetische informatie in het virusdeeltje wordt opgenomen.

De transfer, envelop en helper plasmiden worden samen getransfecteerd in een productieceldlijn. Vaak is dit een HEK 293 of HEK 293-afgeleide celdlijn. Virusdeeltjes worden vervolgens geoogst uit het medium en gebruikt om een transgen in het genoom van een target-cel te brengen.

Alleen lentivirale partikels die zijn vervaardigd middels een 2e generatie SIN lentiviraal vector systeem, een 3e generatie SIN lentiviraal vector systeem of een translentiviraal vector systeem (al dan niet SIN) worden als biologisch ingeperkt gezien.



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Specifieke eigenschappen per ingeperkte lentivirale vectorsystemen

	2 ^e generatie SIN	3 ^e generatie SIN	Translenti / Lenti X / 4 ^e generatie (SIN)
Totaal aantal plasmiden	3	4	6
Aantal transfer plasmiden	1	1	1
5'LTR	wildtype	chimeer (tat-onafhankelijke promotor)	wildtype
Self-inactivating 3'LTR ($\Delta U3$)	Ja	Ja	Ja/nee
Accessoire genen aanwezig*	-	-	vpr (niet functioneel t.g.v. frameshift)
Aantal helper plasmiden	1 (of 3**)	2	4
Samenstelling helper plasmiden	Plasmide 1: gag, pol, rev, tat	Plasmide 1: gag, pol Plasmide 2: rev	Plasmide 1: gag-pro Plasmide 2: vpr-pol Plasmide 3: tTA Plasmide 4: tat, rev
Aantal plasmiden met: Tat Rev	1 + +	1 - +	1 + +
Aantal envelop plasmiden***	1	1	1
Aantal recombinaties nodig voor RCL	3	4	4

* Accessoire genen mogen niet aanwezig zijn in een ingeperkt lentiviraal systeem

** Sommige 2e generatie systemen gebruiken 3 (gag/pol, rev en tat plasmide) in plaats van 1 helper plasmide. Dergelijke systemen worden ook als biologisch ingeperkt beschouwd.

** Envelop-gen mag niet van lentivirale oorsprong zijn.

1^e generatie lentiviraal vectorsysteem

Lentivirale vectoren van de eerste generatie worden vervaardigd met behulp van een enkel plasmide dat alle HIV-genen bevat behalve het envelop gen (env). Eerste generatie systemen worden niet gezien als een ingeperkt systeem, vallen daarom niet onder groep A en zullen verder niet uitgewerkt worden in dit document.



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Risicobeoordeling

Lentivirus dat wordt vervaardigd met een 2^e of 3^e generatie SIN-lentiviraal vectorsysteem of een translentiviraal vectorsysteem valt in de regeling GGO onder virusgroep A van de biologisch ingeperkte systemen.

Bijlage 5 deel I:

- Lentivirale systemen van groep A in combinatie met een niet-schadelijk genproduct worden in bijlage 5 deel I via artikel 5.4.2.i ingeschaald op ML-I.
- Transfectie van alleen een lentivirale transfervector (zonder packaging vectoren) met een gekarakteriseerd, niet-schadelijk genproduct wordt via artikel 5.4.1.h ingeschaald op ML-I

Bijlage 5 deel II:

- Bij gebruik van lentivirale systemen van groep A of een lentivirale transfervector op ML-I, is artikel 5.9.2.b uit Bijlage 5 deel II van toepassing verwijzend naar aanvullend voorschrift 9.1.1.1.3.6. uit Bijlage 9: *Het te gebruiken gastheer materiaal is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen.*
- Bij gebruik van lentivirale systemen van groep A of een lentivirale transfervector op ML-II, is artikel 5.10.2.c uit Bijlage 5 deel II van toepassing verwijzend naar aanvullend voorschrift 9.1.1.3.3.5. uit Bijlage 9: *Het te gebruiken gastheer materiaal is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen.*

Inschaling op ML-I is **niet** mogelijk indien:

- Er sprake is van donorsequenties coderend voor toxines, allergenen of prionen. Deze genproducten worden in de context van lentivirussen gezien als schadelijk en inschaling dient via 5.4.2.f plaats te vinden op ML-II.
 - Uitzondering: Sequenties coderend voor oncogenen, pathogeniteitsfactoren, immunomodulatoire genen en aggregerende eiwitten (m.u.v. prionen) kunnen wel via 5.4.2.i op inperkingsniveau ML-I worden ingeschaald omdat er geen replicatie plaatsvindt en verdere verspreiding niet mogelijk is (zie COGEM advies CGM/210218-01).
- Er sprake is van donorsequenties coderend voor andere virussen (PG 2-4) of virale sequenties (PG 3-4). Inschaling dient dan via 5.4.2.g/h plaats te vinden op ML-II,-III,-IV.
 - Een uitzondering hierop zijn bepaalde veelgebruikte korte virale donorsequenties (2A, VSV-tag, HA-tag en AU-1 tag). Inschaling kan dan via 5.4.2.i op ML-I. Ook de immortaliserende virale eiwitten HPV(16/18) E6/E7, SV40 largeT, polyoma middle T of Ad5 E1A kunnen op ML-I worden ingeschaald via 5.4.2.h.



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

- De mogelijkheid bestaat dat er in de te transduceren cellen andere lentivirussen aanwezig zijn. De afwezigheid van lentivirussen kan worden vastgesteld door het gastheer materiaal te testen en/of door middel van een risicoanalyse waarbij op basis van de herkomst van de gastheercellen (b.v. diersoort, celttype, laboratoriumlijn) de aanwezigheid van lentivirussen uitgesloten kan worden.
- Lentivirale vectorsystemen op onjuiste wijze worden gecombineerd (zie tabel).

	2e generatie packagingsysteem	3e generatie packagingsysteem	Translentiviraal packagingsysteem
2e generatie SIN-transfervector	ML-I	X	ML-I
3e generatie SIN-transfervector	ML-I	ML-I	X
Translentivirale transfer vector	ML-III	X	ML-I
Niet-SIN transfer vector	ML-III	ML-III (omlaagschaling mogelijk*)	ML-I

X = Niet functioneel

* zie COGEM advies CGM/200713-01

Als een lentiviraal vectorsysteem niet past in virusgroep A of niet voldaan kan worden aan de aanvullende voorschriften, moet inschaling plaatsvinden via artikel 5.4.3 op ML-III. In sommige gevallen kan om omlaagschaling worden verzocht (zie o.a. COGEM-adviezen CGM/200713, CGM/240306-01).

Activiteiten met dieren in combinatie met lentivirus vallen buiten de scope van deze factsheet. Voor meer informatie, zie website Bureau GGO [Toelichtingen - Inschaling van lentiviraal vervaardigde DM-I dieren op D-I](#)



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Blootstellingsmaatregelen

Werkvoorschriften

Werk volgens de RGGO2013 voorschriften behorende bij de inperking.

Omdat het werken met lentivirus mogelijk een risico kan vormen voor de medewerkers, zijn er vanuit ARBO-overwegingen veiligheidsmaatregelen noodzakelijk om blootstelling te beperken. Blootstelling kan worden voorkomen door de werkzaamheden uit te voeren onder werk- en inrichtingsvoorschriften die gelijk zijn aan inperkingsniveau II (zie COGEM advies CGM/210218-01). Voorbeelden van deze voorschriften zijn:

- Open handelingen worden uitgevoerd binnen een klasse II biologisch veiligheidskabinet.
- Handschoenen worden gedragen tijdens werkzaamheden.
- Vermijd zo veel mogelijk werkzaamheden met naalden, mesjes en sharps.

Desinfectie

Lentivirussen zijn omkapselde virussen. Desinfectiemiddelen op basis van formaldehyde, chloor en ethanol zijn geschikt voor desinfectie.

Incident, accident en calamiteiten

Percutane blootstelling (denk aan prikaccidenten of snijwonden) is een belangrijke blootstellingsroute in een research-, klinische of farmaceutische setting. Bijtonden zijn een belangrijke blootstellingsroute bij werkzaamheden in een dierenverblijf.

Zorg dat er binnen de organisatie een systeem aanwezig is voor het melden van incidenten en dat afstemming met andere betrokken instanties, bijvoorbeeld met een bedrijfsarts of BHV, mogelijk is.

Hou daarbij rekening met gezondheidsaspecten van de medewerker. Is een HIV-besmet personeel betrokken bij het incident, dan is recombinatie in theorie een mogelijkheid. Benoem dit tijdens de afstemming met de (bedrijfs)arts.

Lentivirale vectoren kunnen bij blootstelling cellen van de medewerker infecteren. Alhoewel deze vectorsystemen replicatie-incompetent zijn, kunnen ze wel integreren in het genoom van de medewerker waar het kan leiden tot mutagenese. Hou bij het afhandelen van het incident daarom ook rekening met de donorsequentie. Wanneer het transgen een potentieel schadelijke donorsequentie (bijvoorbeeld een oncogen) betreft, kan dit gevolgen hebben voor de medewerker.



GGO FACTSHEET

Lentivirussen en lentivirale vector systemen

Referenties

- CGM/240306-01 Inschaling van productiewerkzaamheden met lentivirale CAR-T celtherapie
- CGM/220517-02 Vervolgadvies 'Inschaling replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes'
- CGM/210503-01 Vervolgadvies Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatie deficiënte lenti- en gammaretrovirus vector deeltjes
- CGM/210218-01 Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatie deficiënte lenti- en gammaretrovirus vector deeltjes onder Ingeperkt Gebruik
- CGM 2020-01 The COGEM formula revisited, experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles
- [Addgene: Lentiviral Guide](#)
- [Bureau GGO: Toelichtingen voor virussen](#)

Contact

Zie je een fout in dit document of heb je een opmerkingen? Neem contact op met CIE Education via commissieeducatie@bvplatform.nl.