

Advies betreffende: **Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen buiten een veiligheidskabinet in een ML-I ruimte**

Kennisgever: **Vereniging voor Christelijk Wetenschappelijk Onderwijs, Vrije Universiteit**

COGEM kenmerk
CGM/040209-01

BGGO nummer
GGO 02-185/2

Datum advies
9 februari 2004

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu van open handelingen met 3e generatie lentivirale (SIN) getransduceerde zoogdier-cellen buiten een veiligheidskabinet in een ML-I ruimte.

Het doel van de aanvrager is om, gebruikmakend van zoogdiercellijnen, eiwitten betrokken bij de signaaloverdracht in zoogdierhersenen te bestuderen. Primaire zenuwcellen en chromafine cellen worden getransduceerd met lentivirale vectoren van de 3e generatie waarin DNA, coderend voor eiwitten betrokken bij de signaaloverdracht in zoogdierhersenen, gekloneerd zijn.

Tijdens de ontwikkeling van hersenen worden zenuwcellen geïnduceerd om bepaalde signaalstoffen uit te scheiden (neuronaal identiteit). Deze signaalstoffen, waaronder dopamine, worden gereguleerd door een complex systeem van transcriptiefactoren en genen die tot expressie komen (dopaminerge systeem). Verstoringen van deze processen kunnen leiden tot het ontstaan van ziektebeelden zoals schizofrenie, autisme en Parkinson.

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (Retroviridae, genus Lentivirus) en worden vaak gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem dat stabiele integratie in het genoom mogelijk maakt. Het genoom van lentivirussen bevat, in aanvulling op de gag, pol en env genen, een complexe combinatie van genen die coderen voor een zestal eiwitten. Niet alle functies van deze eiwitten zijn bekend, maar ze zijn essentieel voor het handhaven van de virulentie en interfereren mogelijk met de celcyclus en/ of celgroei. Lentivirale vectoren kunnen zowel delende als niet-delende cellen, zoals primaire zenuwcellen, transfecteren. Nadat de lentivirale vector de gastheercel binnengekomen is wordt het virusdeeltje ontmanteld waarna het vector RNA in het cytoplasma wordt omgezet in DNA door het reverse transcriptase enzym dat in het virusdeeltje aanwezig is. In de kern van de gastheercel zal het DNA stabiel integreren in het genoom, waarna expressie van het transgen kan plaatsvinden (1).

In het meest geavanceerde 3e generatie 'packaging' systeem zijn de noodzakelijk virale genen en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (1). Bij de productie van deze vectoren zijn de virale vif, vpr, tat, vpu en nef genen niet nodig en afwezig. Deze systemen bevatten minder dan 65% van de oorspronkelijke virale sequenties (3). Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem over drie of vier plasmiden die een minimum aan overlappende sequenties bevatten, verkleint de kans op het ontstaan van replicatiecompetent retrovirus (RCR) gedurende de vectorproductie. Voor de vorming

van RCR zijn nu minimaal twee onafhankelijke homologe recombinatie gebeurtenissen noodzakelijk. Lentivirale vectoren van het 3e generatie 'packaging' systeem zijn verder verbeterd door modificaties in vectorontwerp en 'packaging' constructen. Met name het gebruik van 'self-inactivating' (SIN) vectoren heeft bijgedragen aan een hogere bioveiligheid. Bij deze SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties gedeleteerd uit de 3' LTR ('long terminal repeat') van de vector. Hierdoor mist de geïntegreerde vector na reverse transcriptie een functionele LTR, waardoor het 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is voor het inpakken in virusdeeltjes, niet actief kan worden afgelezen. Hierdoor wordt de kans op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementierend replicatiecompetente vector uitermate klein (2).

De adviesvraag

De COGEM is gevraagd te adviseren over open handelingen met 3e generatie lentivirale (SIN) getransduceerde zoogdiercellen buiten een veiligheidskabinet in een ML-I ruimte.

De aanvrager heeft reeds een vergunning om transductie-experimenten uit te voeren met zoogdiercellen en lentivirale vectoren van de 3e generatie onder ML-II condities met aanvullende voorschriften (GGO 02-185/1). Deze aanvullende voorschriften staan vermeld in het COGEM advies CGM/020823-05 en luiden:

- tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen,
- alle open handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd,
- de doelwitcellen zijn vrij van HIV-1, HIV-2, Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), HTLV-2, Simian immunodeficiency virus (SIV) en andere lentivirussen.

De zoogdiercellen worden opgegroeid op gecoate glaasjes die geplaatst zijn in zogeheten 6-12 wellsplaten gevuld met medium. Na transductie worden de cellen gedurende twee weken onder 37°C in een ML-II laboratorium gekweekt. Tijdens deze kweekperiode worden de cellen twee tot drie maal gewassen met medium waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd. Minimaal twee weken na transductie worden de cellen bekeken met behulp van een microscoop.

De aanvrager wenst gebruik te maken van een 'evanescent wave'- en/of een confocaal microscoop. Om praktische redenen kan deze handeling niet plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse 2. Het plaatsen van de betreffende microscopen in het veiligheidskabinet zal de luchtstroom dermate verstoren dat de werking te niet gedaan wordt en de fysische inperking verloren gaat.

De genoemde microscopen zijn gesitueerd in een ML-I ingeperkte ruimte. Deze ML-I ruimte voldoet aan alle voorwaarden voor een ML-II ruimte met uitzondering van de aanwezigheid van een veiligheidskabinet klasse 2. Door plaatsing van de twee microscopen in de ruimte is echter geen plaats voor een veiligheidskabinet.

Hoewel open handelingen met 3e generatie lentivirale (SIN) getransduceerde zoogdiercellen plaats horen te vinden in een veiligheidskabinet van klasse 2 verzoekt de aanvrager derhalve open handelingen uit te mogen voeren buiten een veiligheidskabinet in het voornoemde ML-I laboratorium. Het betreft hier de volgende handelingen:

De 6-12 wellsplaten worden afgesloten met een deksel en in een veiligheidsdoos van het ML-II naar het ML-I laboratorium vervoerd. In dit laboratorium worden de glaasjes uit het

medium gehaald en in een speciale kamer (37°C) onder de microscoop gelegd. De glaasjes worden tijdens het bekijken voorzien van continue stroom van medium. Dit medium bevindt zich in een gesloten systeem en wordt opgevangen in een afvalvat dat een 10% chlooroplossing bevat. Na bekijken worden de glaasjes afgevoerd in SZA vaten als besmet materiaal. De speciale kamer in de microscoop wordt gedesinfecteerd met een 10% chlooroplossing.

Overweging en advies

De stabiliteit van virale vectoren wordt beïnvloed door verschillende factoren waaronder de temperatuur (4). Verhogen van de temperatuur verlaagt de halfwaardetijd van de vector. Voor lentivirale vectoren 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 (4).

De in deze aanvraag getransduceerde zoogdiercellen worden opgegroeid bij een temperatuur van 37°C voor minimaal twee weken. Gezien de halfwaardetijd is aannemelijk dat de hoeveelheid lentivirale vectoren in deze twee weken gereduceerd is tot niet-detecteerbare hoeveelheden. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke concentratie na twee weken met een factor 234 ($= 1,3 \times 10^{10}$) verlaagd. Deze afname wordt versterkt door het wassen van de cellen. Tijdens de kweekperiode worden de cellen twee tot drie maal gewassen met medium waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd. Hierdoor zullen de vrije lentivirale partikels met het vervangen van het medium grotendeels verwijderd worden.

Wanneer de lentivirale partikels opgenomen worden door de cel verliezen de partikels hun membraan en envelopeiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij eventuele lysatie van cellen tijdens handelingen onder de microscoop zullen derhalve geen infectieuze partikels in het medium kunnen vrijkomen.

De kans op blootstelling van de medewerker aan infectieuze virale vectorpartikels zal gezien het bovenstaande minimaal zijn, ook wanneer in beperkte mate handelingen buiten een veiligheidskabinet in een ML-I laboratorium worden uitgevoerd.

Hoewel het hier open handelingen betreft met lentivirale vectoren acht de COGEM, mede gezien de halfwaardetijd van lentivirale vectoren en de maatregelen die de aanvrager in acht neemt, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Literatuur

1. 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
2. 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
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. Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* 280, blz. 124-131.