



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

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 02-065/03.co1	21 oktober 2004	CGM/041103-01	3 november 2004

Onderwerp
Advies kennisgeving IG 02-065

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van beschikking IG 02-065, betreffende “Lentiviruses for long term gene expression in the liver” van Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met zoogdiercellen waarin een genetisch gemodificeerd (gg) virus (lentivirale vector) is gebracht. Het betreffen hier experimenten waarbij een microscoop wordt gebruikt. De aanvrager is reeds in het bezit van een vergunning voor werkzaamheden met deze cellen in een ruimte die fysisch is ingeperkt (ML-II niveau). Vanwege praktische redenen is het echter niet mogelijk werkzaamheden met de microscoop op dit niveau uit te voeren. De aanvrager heeft om die reden verzocht de werkzaamheden plaats te laten vinden in een ruimte waaraan geen fysische inperking is toegekend.

Het virus zal, voordat het experiment begint, worden getest op de mogelijkheid om zich te kunnen repliceren (replicatie competente retrovirussen (RCR)). Als is aangetoond dat de virussen zich niet kunnen repliceren worden de cellen geïnfecteerd met het gg-virus. De cellen worden vervolgens één week gekweekt onder relatief hoge fysische inperking (ML-II niveau) waarbij de hoeveelheid overgebleven virus elke 10 uur zal halveren. Na de kweekperiode worden de cellen één maal gewassen met humaan serum waarbij de COGEM één extra wasstam met medium adviseert om de hoeveelheid gg-virus verder te reduceren tot niet aantoonbare hoeveelheden. Hierbij heeft het gg-virus het vermogen verloren om na het binnendringen van een cel een volgende cel te kunnen infecteren. Dit alles maakt het dat de COGEM, in dit specifieke geval, de risico's voor mens en milieu, bij het uitvoeren van de experimenten buiten inperking, verwaarloosbaar klein acht.

Titel: Handelingen met lentivirale getransduceerde cellen in een ruimte zonder inperking

COGEM advies: CGM/041103-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu bij werkzaamheden met getransduceerde zoogdiercellen, geïnfecteerd met lentivirale vectoren, in een ruimte zonder inperking. Het betreffen hier zogenaamde 3^e generatie lentivirale vectoren. De aanvrager is voornemens electrofysiologische metingen op cellen te verrichten waar met behulp van een lentivirale vector ionkanalen zijn ingebracht. Ionkanalen zijn aanwezig in de membraan van een cel waar ze bijdragen aan het transport van oplosbare eiwitten door de membraan, communicatie met andere cellen en het teweegbrengen van intracellulaire processen (1).

Het uiteindelijke doel van het experiment is de ontwikkeling van een natuurlijke pacemaker voor patiënten met hartfalen. Voor de voorgenomen experimenten is het noodzakelijk dat lentivirale vectoren worden gebruikt omdat dit de enige methode is om ionkanalen in primaire hartspiercellen stabiel tot expressie te brengen. In eerste instantie zullen voor de experimenten neonatale hartspiercellen uit rat en konijn worden gebruikt.

Lentivirale virale vectoren zijn afgeleid van de retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdracht systeem dat stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel mogelijk maakt. Het grote voordeel van de lentivirale vectoren is het feit dat ze naast delende cellen ook niet-delende cellen, zoals long- en hersencellen, 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*) (2). Deze genen zijn essentieel voor replicatie en virulentie van het virus.

Het binnendringen van het HIV-1 in de gastheercel wordt bepaald door het virale envelop-eiwit (Env) en de receptoren die tot expressie komen op de gastheercellen. De infectie van de cel wordt geïnitieerd door de interactie van het envelop-eiwit met de zogenaamde CD4 receptor die aanwezig is op het oppervlak van de gastheercel. Op deze wijze wordt de binding met een co-receptor aanwezig op de gastheercel mogelijk gemaakt. Deze binding is noodzakelijk voor de uiteindelijke membraanfusie van het virus met de cel, en de entree van virale deeltjes in het cytoplasma van de gastheercel (9). Welke co-receptoren gebruikt worden is afhankelijk van de virusstam. Zo gebruiken de virussen die macrofagen en monocytten infecteren de CCR5 co-receptor. Virussen die T-cellijnen infecteren gebruiken daarentegen de CXCR4 receptor.

In de loop der jaren zijn er verschillende lentivirale vectorsystemen ontwikkeld. Het meest geavanceerde systeem is het 3^e generatie 'packaging' systeem. In dit systeem zijn de virale genen (*pol*, *gag*, en *rev*) en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (3). Hiernaast is het *env* gen vervangen door glycoproteïne G van het vesicular stomatitis virus (VSV-G). De VSV-envelop is co-receptor onafhankelijk en kan in principe iedere cel infecteren. Hierdoor heeft de vector een groter gastheerbereik en weefseltropisme verkregen (7). De *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* en *tat* genen zijn voor de productie van deze vectoren niet noodzakelijk en uit het genoom verwijderd.

Uit veiligheidsoogpunt is het van belang dat er tijdens de vectorproductie geen replicatie-competent retrovirus kan ontstaan (RCR). Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in vier plasmiden die een minimum aan overlappende sequenties bevatten zoals is gebeurd in het 3^e generatie 'packaging systeem' verkleint deze kans aanzienlijk. Voor de vorming van RCR zijn nu minimaal drie homologe recombinatie gebeurtenissen vereist. Hiernaast draagt het gebruik van self-inactivating (SIN) vectoren (zoals de betreffende lentivirale vector) bij aan een hogere bioveiligheid (8). Bij deze 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 LTR, waardoor het 'packaging' signaal, dat noodzakelijk is voor het inpakken van virusdeeltjes, niet actief kan worden afgelezen. Hierdoor wordt het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een completerend recombinant virus uitermate klein (4).

Adviesvraag

De COGEM is gevraagd te adviseren over de handelingen met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met 3^e generatie lentivirale vectoren. De handelingen vinden plaats in een ruimte buiten inperking. De aanvrager is reeds bevoegd voor het uitvoeren van handelingen met deze zoogdiercellen in een ML-II ruimte.

De aanvrager is voornemens electrofysiologische metingen te verrichten op de eerder genoemde getransduceerde zoogdiercellen. Deze metingen worden verricht onder een microscoop. Om praktische redenen is het niet mogelijk de handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II te verrichten.

De aanvrager heeft aangegeven de virusbatch voorafgaande aan de transductie te willen testen op de aanwezigheid van RCR. De test zal worden uitgevoerd door 10⁵ humane T cel lymphoma's (SupT1 cellen) met 10⁶ infectieuze lentivirale partikels te transduceren. Er wordt gebruik gemaakt van humane T-cel lymphoma's omdat wild type HIV op deze cellen kan repliceren. Bovendien zijn deze cellen goed transduceerbaar door lentivirale vectoren. Omdat T-cellen onder natuurlijke omstandigheden de gastheercellen van het HIV zijn, is de kans groot dat eventueel aanwezig RCR op deze cellen kan repliceren. Na de transductie worden de cellen

gedurende vier weken getest op aanwezigheid van HIV p24 (een mantel eiwit gecodeerd door het *gag* gen) met behulp van een ELISA test. Wanneer er gedurende deze vier weken geen toename van p24 eiwit te zien is wordt het virusreplicaat als replicatie-competent vrij beschouwd.

Als is vastgesteld dat de virusbatch RCR-vrij is zullen de zoogdiercellen getransduceerd worden en vervolgens gedurende één week worden gekweekt. Hierna vindt een eenmalige wassing van de cellen met humaan serum plaats. Om de cellen te vervoeren naar de ruimte waarin de microscoop zich bevindt, wordt gebruik gemaakt van dubbelwandige containers. In de desbetreffende ruimte worden de electrofysiologische metingen uitgevoerd. De metingen zullen één á twee uur in beslag nemen. Na afloop van de metingen zullen de meetopstellingen en werkoppervlakken gereinigd worden met 70% alcohol.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft reeds eerder over een soortgelijke adviesvraag geadviseerd (CGM/040209-01). Het betroffen hier tevens open handelingen met 3^e generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen. De desbetreffende aanvrager heeft destijds verzocht open handelingen te mogen uitvoeren in een ML-I ruimte. Alvorens de cellen te bestuderen onder de microscoop waren deze tenminste twee weken gekweekt in een ML-II ruimte. Tevens werden de cellen twee tot drie maal gewassen met medium waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd. De COGEM heeft destijds geadviseerd dat bij het in acht nemen van bovenstaande werkwijzen de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn bij het uitvoeren van handelingen in een ML-I ruimte.

Overwegingen en advies

In onderhavig experiment wordt gebruikt gemaakt van een 3^e generatie lentivirale vector. Voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCR-vorming bij gebruik van deze vectoren. Omdat in onderhavige aanvraag echter sprake is van een verzoek om handelingen te verrichten in een ruimte buiten inperking acht de COGEM het in het kader van het voorzorgsprincipe van belang dat de virusbatch voor transductie wordt gecontroleerd op de vorming van RCRs. De COGEM is van mening dat de door de aanvrager voorgestelde methode afdoende is voor het aantonen van de aan- of afwezigheid van onderhavige vector alsmede van HIV varianten die de CXCR4 co-receptor gebruiken om gastheercellen te infecteren. Indien er in het laboratorium waar de virusbatch geproduceerd wordt ook werkzaamheden plaatsvinden met CCR5 gebruikend HIV, acht de COGEM het noodzakelijk de virusbatch ook te controleren op contaminatie met deze virussen. Omdat Sup-T1 cellen geen CCR5 eiwit op hun membraan tot expressie brengen is deze cellijn niet geschikt voor het testen van CCR5 HIV varianten en moet gebruik gemaakt worden van bijvoorbeeld een U87-CCR5/CXCR4 cellijn of van primaire perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC).

Als is vastgesteld dat de virusbatch geen RCRs 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 in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met een andere virusbevattende kweek in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden.

Van virale vectoren is bekend dat verschillende factoren zoals temperatuur en incubatiecondities (o.a. groeimedium en serumcomponenten) hun stabiliteit kunnen beïnvloeden (5). Een verhoging 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 gevonden. Bij een temperatuur van 37 °C was dit teruggelopen tot circa 10 uur. De getransduceerde zoogdiercellen van onderhavige aanvraag worden één week gekweekt bij een temperatuur van 37 °C. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke toegevoegde concentratie lentivirale partikels na één week met een factor 2^{17} ($= 1.3 \times 10^5$) afgenomen. Deze afname wordt versterkt door het wassen met humaan serum. De cellen zullen na afloop van de kweekperiode één maal gedurende één uur met humaan serum worden geïncubeerd bij 37 °C. Van vectoren die een VSV-G envelop-eiwit bevatten (zoals onderhavige vector), is bekend dat ze geïnactiveerd worden door humaan serum. De door de aanvrager voorgestelde behandeling inactieveert de lentivirale vectoren met meer dan 98% (6). Omdat er in het onderhavige experiment één week gekweekt wordt en aangenomen mag worden dat een gering aantal virusdeeltjes na deze periode nog aanwezig zijn, adviseert de COGEM na de kweekperiode en voor de behandeling met het humane serum nog één extra wasstap uit te voeren. Met het uitvoeren deze extra wasstap wordt additioneel 95% van de nog aanwezige virale partikels verwijderd. Na de wasstap met humaan serum is het aannemelijk dat de hoeveelheid lentivirale vectoren is gereduceerd tot niet-detecteerbare hoeveelheden.

Wanneer de lentivirale partikels opgenomen worden door de cel verliezen de partikels hun membraan en envelop-eiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij eventuele lysatie van de cellen tijdens handelingen onder de microscoop zullen derhalve geen infectieuze partikels kunnen vrijkomen. De kans op blootstelling van de medewerker aan infectieuze virale partikels zal gezien het bovenstaande dan ook minimaal zijn. Dit is ook het geval wanneer de betreffende handelingen plaatsvinden in een ruimte zonder inperking zoals in de aanvraag wordt beschreven.

Omdat er in onderhavige aanvraag sprake is van werkzaamheden in een ruimte buiten inperking is de COGEM van mening dat voorgeschreven moet worden dat de

laboranten moeten werken volgens de algemeen aanvaarde “veilige microbiologische technieken”. De COGEM acht de ML-II werkvoorschriften zoals voorgesteld door BGGO dan ook voldoende om de veiligheid voor de werknemer te waarborgen. Hiernaast adviseert de COGEM dat tijdens de werkzaamheden met de microscoop geen werknemers in de ruimte aanwezig zijn die niet deelnemen aan het experiment.

De COGEM acht de voorgestelde maatregelen om de werkoppervlakken en meetopstellingen na de handelingen met de getransduceerde zoogdieren te reinigen met 70% alcohol voldoende om de betreffende oppervlakten te desinfecteren.

Concluderend is de COGEM, in dit specifieke geval, van mening dat met het controleren van de virusbatch op RCRs, het kweken van de getransduceerde zoogdiercellen op ML-II niveau gedurende minimaal één week, het wassen van de cellen met medium én met humaan serum de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de werkzaamheden met de microscoop in een ruimte buiten inperking, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Wikipedia, Cell potential: http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_potential
2. Van Regenmortel MHV (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
3. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology* **72**: 8463-8471
4. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, and Verma IM (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology* **72**: 8150-8157
5. Higashikawa F and Chang L (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**: 124-131
6. DePolo NJ, Reed JD, Sheridan PL, Townsend K, Sauter SL, Jolly DJ and Dubensky TW (2000). VSV-G pseudotypes lentivirale vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Molecular therapy* **2**: 218-222
7. Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentivirale vector. *Proceedings of the National Academy of Science* **93**: 11382-11388
8. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, and Trono D (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of Virology* **72**: 9873-9880

9. Bittner A, Mitnacht-Kraus R, Schnierle BS (2002). Specific transduction of HIV-1 envelope expressing cells by retroviral vectors pseudotyped with hybrid CD4/CXCR4 receptors. *Journal of virology methods* **104**: 83-92