

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 |
| GGO 04-125/01.co1 | 23 februari 2005 | CGM/050309-01 | 9 maart 2005 |
| Onderwerp | | | |
| Advies kennisgeving GGO 04-125/01 | | | |

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de wijziging op kennisgeving GGO 04-125/01, getiteld 'Production of self-inactivating lentiviral vectors for the genetic marking of primary vertebrate cells and the establishment and genetic modification of vertebrate cell lines', van de Universiteit Leiden, en het voorblad dat door het Bureau GGO is opgesteld, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met zoogdiercellen waarin een genetisch gemodificeerd virus (lentivirale vector) is gebracht. Het doel van het onderzoek is om de ontwikkeling en fysiologie van hartspierweefsel te bestuderen. De aanvrager is reeds in het bezit van een vergunning voor werkzaamheden met deze cellen in een ML-II laboratorium. De voorgenomen elektrofysiologische metingen en werkzaamheden met de microscoop kunnen om praktische redenen niet in dit laboratorium uitgevoerd worden. De aanvrager heeft daarom verzocht de werkzaamheden te mogen uitvoeren in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking).

De zoogdiercellen worden onder inperking zes dagen gekweekt en minimaal tweemaal gewassen. Tijdens de kweek halveert de hoeveelheid overgebleven virus elke tien uur, zodat de hoeveelheid gg-virus is gereduceerd tot niet detecteerbare hoeveelheden. Hiernaast zullen de cellen tweemaal een trypsine behandeling ondergaan waarmee eventueel nog aanwezige lentivirale deeltjes worden geïnactiveerd. Bij het experiment dat plaatsvindt buiten inperking wordt gebruik gemaakt van gesloten kweekschalmpjes waardoor de kans dat eventueel aanwezige actieve virusdeeltjes vrij komen in het milieu uiterst gering is. 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.

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 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman
voorzitter COGEM

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

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

COGEM advies: CGM/050309-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu van handelingen met derde generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking). Het doel van het onderzoek is om de ontwikkeling en fysiologie van hartspierweefsel te bestuderen. Hiertoe zullen verschillende genen variërend van anti-apoptotische genen tot genen coderend voor groeifactoren, met behulp van lentivirale vectoren in zoogdiercellen tot expressie worden gebracht.

In de ruimte buiten inperking zullen elektrofysiologische metingen worden verricht aan mengcultures van getransduceerde zoogdiercellen en niet-genetisch gemodificeerde zoogdiercardiomyocyten. Daarnaast worden de cellen onder een fluorescentiemicroscoop bestudeerd en gefotografeerd.

Lentivirale 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 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 vectorproductie geen replicatie-competent retrovirus (RCR) kan ontstaan. In de loop der jaren zijn er daarom verschillende lentivirale vectorsystemen ontwikkeld. Het meest geavanceerde systeem is het derde generatie 'packaging' systeem. In dit systeem zijn de virale genen (*pol*, *gag*, en *rev*) 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. Deze systemen bevatten 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 homologe recombinatie gebeurtenissen vereist. Daarnaast draagt het gebruik van self-inactivating (SIN) vectoren (zoals de betreffende lentivirale vector) bij aan een hogere bioveiligheid (3).

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 complementarend recombinant virus uitermate klein (4).

De adviesvraag

De COGEM is gevraagd te adviseren over de handelingen met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. De handelingen vinden plaats in een ruimte buiten inperking. De aanvrager heeft reeds een vergunning om transductie-experimenten uit te voeren met zoogdiercellen en lentivirale vectoren van de derde generatie onder ML-II condities met aanvullende voorschriften, zoals vermeld in COGEM advies CGM/020823-05.

In de betreffende lentivirale vector is het *env* gen vervangen door het gen dat codeert voor het glycoproteïne G van het *vesicular stomatitis virus* (VSV-G). Het VSV-G eiwit werkt co-receptor onafhankelijk. Door de aanwezigheid van het VSV-G kan het virus in principe dus iedere cel infecteren. Hierdoor heeft de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefseltropisme verkregen (5).

In de lentivirale vectoren zijn reporter genen ('green fluorescent protein', 'red fluorescent protein' en luciferase) en hiervan afgeleide varianten aanwezig. De aanvrager geeft aan dat de te gebruiken virusbatch niet wordt getest op de aanwezigheid van RCR aangezien er geen aanwijzingen zijn in de literatuur voor het ontstaan van RCR (6).

De zoogdiercellen worden vier uur onder inperkt gebruik geïncubeerd met de lentivirale vectoren en vervolgens één maal gewassen met fysiologische zoutoplossing. Na drie tot zeven dagen celkweek en één wasstap met fysiologische zoutoplossing worden de cellen behandeld met een 0,05 % trypsine oplossing. Na de trypsine behandeling worden de cellen drie tot zeven dagen verder gekweekt. Tenslotte zullen de cellen nogmaals een trypsine behandeling ondergaan waarna ze worden overgebracht naar een zogenaamd 'multi-electrode array' (MEA)-kweekschaltje. De elektrodes voor de meetapparatuur bevinden zich aan de buitenkant van de kweekschaltjes waardoor er geen contact zal ontstaan tussen de cellen en de meetapparatuur.

De metingen aan de cellen zullen worden verricht in een niet-ingeperkte ruimte. Gedurende de metingen blijven de kweekschaltjes gesloten en worden er volgens de aanvrager in de ruimte geen open handelingen met de cellen verricht, waarbij de deksel van het kweekschaltje afgehaald wordt. De meetapparatuur kan hierdoor niet besmet raken met kweekmedium of cellen. Na afloop van de werkzaamheden zullen de werkoppervlakken en instrumenten worden schoongemaakt met 70% ethanol en

zullen de kweekschaaltjes met cellen teruggebracht worden naar het ML-II laboratorium.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft reeds tweemaal eerder over soortgelijke adviesvragen geadviseerd (CGM/040209-01 en CGM/041103-01). Beide keren betrof het open handelingen met derde generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen.

In het eerste geval (CGM/040209-01) is door de aanvrager 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 waren toegevoegd. De COGEM heeft destijds geadviseerd (CGM/040209-01) 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.

In het tweede geval (CGM/041103-01) heeft de aanvrager verzocht om open handelingen uit te mogen voeren buiten een inperkende ruimte. De virusbatch is hier wel op afwezigheid van RCR getest. De cellen werden één week onder fysieke inperking (ML-II niveau) gekweekt voordat 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. Bij het uitvoeren van dit specifieke experiment buiten inperking heeft de COGEM destijds geadviseerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn (CGM/041103-01).

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van een zelfinactiverende (SIN) derde generatie lentivirale vector. Een risico bij de productie van dit soort 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 recombinitie 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). De kans dat met derde generatie zelfinactiverende lentivirale vectoren RCR gevormd worden, is volgens de COGEM verwaarloosbaar klein.

Tijdens het kweken van de cellen bestaat er een kleine kans dat er contaminatie met andere virussen optreedt. 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.

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 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).

De in deze aanvraag getransduceerde zoogdiercellen worden opgegroeid bij een temperatuur van 37°C gedurende minimaal één week. Gezien de halfwaardetijd is aannemelijk dat de hoeveelheid lentivirale vectoren in deze tijd gereduceerd is tot niet-detecteerbare hoeveelheden. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke concentratie na één week met een factor 2^{17} ($= 1,3 \times 10^5$) verlaagd. Deze afname wordt versterkt door het wassen van de cellen. Tijdens de kweekperiode worden de cellen tenminste tweemaal gewassen met fysiologische zoutoplossing waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd.

Hiernaast worden de cellen minimaal tweemaal behandeld met een trypsine-oplossing. Van trypsine is bekend dat het HIV type 1 inactieveert en bij een fysiologische zuurgraad ($\approx \text{pH}=7$) efficiënt het VSV-G eiwit afbreekt (8; 9). Tezamen met de diverse wasstappen zullen hierdoor de vrije lentivirale partikels gereduceerd worden tot niet-detecteerbare hoeveelheden.

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 (stukgaan) van cellen tijdens handelingen onder de microscoop zullen derhalve geen infectieuze partikels in het medium kunnen vrijkomen.

Bij de experimenten die plaatsvinden buiten de ingeperkte ruimte wordt gewerkt met gesloten kweekschaltes. Hierdoor kan de meetapparatuur niet in aanraking komen met de geïnfecteerde cellen. Indien in het onwaarschijnlijke geval toch RCR aanwezig is, is de kans dat ze uit een afgesloten kweekschalte in het milieu kunnen terechtkomen uiterst gering. De COGEM acht derhalve testen op afwezigheid van RCR in dit geval niet nodig op voorwaarde dat de afdichting van kweekschaltes, voor handelingen buiten inperking, vloeistofdicht is.

Recentelijk heeft de COGEM geadviseerd dat, op grond van het voorzorgsprincipe, het testen op afwezigheid van RCR in de virusbatch noodzakelijk is (CGM/041103-01). In dit specifieke geval betroffen het echter open handelingen waardoor de kans dat eventueel aanwezig RCR in het milieu kan komen vele mate groter was.

Omdat er in onderhavige aanvraag sprake is van werkzaamheden in een ruimte buiten inperking is de COGEM van mening dat de laboranten moeten werken volgens de algemeen aanvaarde “veilige microbiologische technieken”. De COGEM acht de

onderstaande ML-II werkvoorschriften zoals vermeld staan in het COGEM advies CGM/020823-05 voldoende om de veiligheid voor de werknemer te waarborgen:

- 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.

Uit voorzorg adviseert de COGEM hiernaast dat tijdens de werkzaamheden met de microscoop geen werknemers in de ruimte aanwezig zijn die niet deelnemen aan het experiment. Voorts dienen de werkoppervlakken en meetopstellingen na de handelingen met de getransduceerde zoogdieren gereinigd te worden met 70% alcohol om de betreffende oppervlakten te desinfecteren. Tot slot adviseert de COGEM dat het transport van de getransduceerde cellen tussen het ML-II laboratorium en de ruimte alwaar de meetopstelling staat opgesteld plaatsvindt in een gesloten, breukvaste, lekdichte houder, die voor het vervoer uitwendig wordt ontsmet.

Concluderend is de COGEM, in dit specifieke geval, van mening dat door het kweken van de getransduceerde zoogdiercellen op ML-II niveau gedurende minimaal één week, het wassen van de cellen met fysiologische zoutoplossing én een trypsine-oplossing, de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van elektrofysiologische metingen en werkzaamheden met een fluorescentiemicroscoop met vloeistofdichte kweekschaltes in een ruimte buiten inperking, verwaarloosbaar klein zijn.

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. Shokralla, S., He, Y., Wanas, E., and Ghosh, H. P. (1998). Mutations in a carboxy-terminal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G that affect membrane fusion activity. *Virology* **242**, blz. 39-50