



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 01-263/06.co1	13 april 2005	CGM/050427-01	27 april 2005
Onderwerp			
Advies kennisgeving IG 01-263/6			

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de wijziging op kennisgeving IG 01-263/6, getiteld 'Implementatie van een lentivirus-afgeleid genoverdracht systeem', van het Leids Universitair Medisch Centrum, 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), met genen coderend voor fluorescerende eiwitten, is gebracht. Het doel van de werkzaamheden is om fluorescentiefoto's te maken van levende getransduceerde cellen met behulp van een confocale-laserscan microscoop. De aanvrager is reeds in het bezit van een vergunning voor werkzaamheden met deze cellen in een ML-II laboratorium. De voorgenomen 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 geïnfecteerde zoogdiercellen worden onder inperking in het ML-II laboratorium één dag gekweekt, tweemaal gewassen met een zoutoplossing en éénmaal met een trypsine-oplossing. Gezien het feit dat de hoeveelheid virus elke tien uur halveert en de onzekerheid over de efficiëntie van de wasstap met trypsine, kan niet worden uitgesloten dat detecteerbare hoeveelheden gg-virussen aanwezig blijven. Hierdoor is de kans aanwezig dat eventueel aanwezige actieve virusdeeltjes vrij kunnen komen in het milieu. Derhalve is de COGEM, ook in dit specifieke geval, van mening dat de veiligheid voor mens en milieu, bij het uitvoeren van de experimenten buiten inperking, niet gewaarborgd is.

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 dash.

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

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

Titel: Metingen van lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen onder een microscoop in een ruimte zonder inperking

COGEM advies: CGM/050427-01

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 de werkzaamheden is om fluorescentie-foto's te maken van levende getransduceerde cellen met behulp van een confocale-laserscan microscoop. Hiertoe zullen verschillende genen die coderen voor fluorescerende eiwitten met behulp van lentivirale vectoren in primaire en tumorcellen tot expressie worden gebracht.

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van de retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een genoverdrachtsysteem. Dit systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel. Lentivirale vectoren hebben het voordeel 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 de vectorproductie geen replicatie-competent retrovirus (RCR) kan ontstaan. In het derde-generatie lentivirale vectorsysteem zijn de benodigde virale genen en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (2). Voor de vorming van RCR zijn minimaal drie recombinatie gebeurtenissen vereist. Mede doordat een minimum aan overlappende sequenties gebruikt wordt, is de kans op RCR vorming hierdoor aanzienlijk verkleind. Daarnaast draagt het gebruik van zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vectoren (zoals de betreffende lentivirale vector) bij aan een hogere bioveiligheid (3). Bij SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties gedeleteerd uit de 3'LTR van de vector. Daarnaast zijn de *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* en *nef* genen niet nodig en verwijderd. Hierdoor wordt het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementierend 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 (IG 01-263).

Het oorspronkelijke envelopeiwit, dat ondermeer de weefsel-specificiteit van het virus bepaalt, is in de lentivirale vectoren vervangen door het glycoproteïne G eiwit van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G). Als gevolg van deze pseudotypering kan het virus in principe een groot aantal celtypen infecteren, waardoor de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefsel-tropisme heeft verkregen (5).

In de lentivirale vectoren zijn reporter genen ('green fluorescent protein', 'red fluorescent protein' en luciferase) 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 tijdens de productie van derde generatie lentivirale vectoren (6).

De zoogdiercellen worden twee tot zestien uur onder ingeperkt gebruik geïncubeerd met de lentivirale vectoren en vervolgens één maal gewassen met fysiologische zoutoplossing. Na één tot drie 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 voorzien van kweekmedium en overgebracht in microscopiekweeschaaltjes.

De cellen zullen onder een fluorescentiemicroscopie bestudeerd en gefotografeerd worden. Gedurende de microscopische handelingen in een niet-ingeperkte ruimte blijven de kweeschaaltjes gesloten en worden er volgens de aanvrager in de ruimte geen open handelingen met de cellen verricht. Na afloop van de werkzaamheden zullen de werkoppervlakken en instrumenten worden schoongemaakt met 70% ethanol en zullen de kweeschaaltjes met cellen teruggebracht worden naar het ML-II laboratorium.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd over soortgelijke adviesvragen (CGM/040209-01, CGM/041103-01, CGM/050309-01 en CGM/050330-01). De omstandigheden in de huidige adviesvraag zijn vergelijkbaar met die welke zijn vermeld in advies CGM/050309-01, met uitzondering van de kweektijd van de cellen en de verschillende wasstappen. In de vorige aanvraag is door de aanvrager verzocht om gesloten microscopische handelingen te mogen uitvoeren in een ruimte buiten inperking. Alvorens de cellen te bestuderen onder de microscoop waren deze niet één dag, maar tenminste een week gekweekt in een ML-II ruimte. Tevens werden de cellen tweemaal gewassen met fysiologische zoutoplossing en tweemaal met een 0,05% trypsine oplossing. Bij het uitvoeren van dit specifieke experiment buiten inperking heeft de COGEM destijds geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn (CGM/050309-01).

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 recombinatie 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). Zoals in eerdere adviezen is aangegeven (CGM/050309-01 en CGM/040209-01), acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat met derde generatie zelfinactiverende lentivirale vectoren RCR gevormd worden. De COGEM is conform een eerder advies (CGM/050309-01) van mening, dat het testen van de virusbatch op afwezigheid van RCR niet verder zal bijdragen aan het beperken van de risico's voor mens en milieu.

De in deze aanvraag getransduceerde zoogdiercellen worden opgegroeid bij een temperatuur van 37°C gedurende minimaal één dag. Lentivirale vectoren die gepseudotyperd zijn met het VSV-G eiwit hebben bij een temperatuur van 37°C een halfwaardetijd van circa tien uur (7). Bij een dergelijke halfwaardetijd is de oorspronkelijke concentratie infectieuze vectordeeltjes na één dag met een factor 5,3 ($= 2^{2,4}$) verlaagd. Tijdens de kweekperiode worden de cellen tweemaal gewassen met fysiologische zoutoplossing waaraan geen lentivirale partikels zijn toegevoegd. Als gevolg van de wasstappen zal het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes per wasstap verder gereduceerd worden met ongeveer 95% (factor 20 reductie). Tevens worden de cellen éénmaal behandeld met een 0,05% trypsine-oplossing. Aangezien er tweemaal gewassen wordt met een fysiologische zoutoplossing (reductiefactor 400) én eenmaal met een trypsine-oplossing, zullen de wasstappen verreweg het grootste aandeel hebben in de reductie van het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes, in vergelijking met de kweekperiode van één dag (reductiefactor 5,3).

Bij een kweekperiode van één week bij 37°C met twee wasstappen met fysiologische zoutoplossing is het aantal infectieuze vectordeeltjes met factor $5,2 \times 10^7$ ($= 2^{17} \times 20 \times 20$) verlaagd (CGM/050309-01). De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat met deze procedure, inclusief twee wasstappen met een 0,05% trypsine-oplossing, de hoeveelheid vrije lentivirale vectoren gereduceerd is tot niet-detecteerbare hoeveelheden (CGM/050309-01). In de huidige aanvraag wordt echter één tot drie dagen gekweekt. Bij een kweekperiode van één dag inclusief twee wasstappen met fysiologische zoutoplossing, zonder de trypsine wasstap, zal het aantal infectieuze vectordeeltjes met factor $2,1 \times 10^3$ ($= 2^{2,4} \times 20 \times 20$) verlaagd worden.

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). Trypsine zorgt er voor dat virusdeeltjes die gehecht zijn aan de cellen losgemaakt worden en zodoende weggewassen kunnen worden. Daarbij zullen de overgebleven virusdeeltjes niet meer infectieus zijn, doordat trypsine het VSV-G eiwit kan inactiveren (8-12). Uit de literatuur blijkt dat de reductie van het aantal HIV virusdeeltjes bij een wasstap met

0,01% trypsine gedurende vijf minuten varieert tussen een factor 10 en 115 (8). De virusinactiverende werking is afhankelijk van de incubatietijd van trypsine en van de hoeveelheid virus dat in de celweek aanwezig is (8). In deze studie worden echter geen absolute virusaantallen vermeld (8). Tevens heeft de aanvrager niet aangegeven hoeveel virus gebruikt wordt en hoelang de wasstep met trypsine duurt. Daarnaast wordt in het betreffende artikel uitgegaan van HIV en niet van VSV-G gepseudotypeerd HIV, zoals in de huidige aanvraag (8). Hierdoor is het moeilijk om een correcte inschatting te maken van de reducerende factor van trypsine. Een andere studie heeft wel het effect onderzocht van trypsine op VSV-G gepseudotyperde lentivirale virussen (9). Hierbij is een fysische methode (immuunprecipitatie) gebruikt om de inactivatie van VSV-G eiwit te detecteren. De waargenomen reductie in trypsine-resistentie van 100% tot 0% in deze assay is weinig informatief om de reductiefactor te bepalen, aangezien deze 10^2 maar misschien ook 10^4 kan zijn (9). Aangezien de virusreducerende werking van trypsine onvoldoende is aangetoond, kan niet worden uitgesloten dat de procedure onvoldoende effectief is om het aantal infectieuze vectordeeltjes te reduceren tot niet-detecteerbare hoeveelheden. Hierdoor is er een reële kans dat in de kweekschaaltjes vrije infectieuze vectordeeltjes aanwezig blijven.

Bij de experimenten die plaatsvinden buiten de ingeperkte ruimte wordt volgens de aanvrager gewerkt met gesloten kweekschaaltjes. Aangezien het niet uitgesloten is dat in de kweekschaaltjes vrije infectieuze vectordeeltjes voorkomen, is de kans aanwezig dat deze virusdeeltjes, bij ongelukken of calamiteiten, in het milieu terecht komen en zodoende mensen of dieren kunnen infecteren (5).

Concluderend is de COGEM, in dit geval, van mening dat door het kweken van de getransduceerde zoogdiercellen op ML-II niveau gedurende minimaal één dag, het tweemaal wassen van de cellen met fysiologische zoutoplossing én éénmaal met een trypsine-oplossing, de veiligheid voor mens en milieu bij het uitvoeren van werkzaamheden met een fluorescentiemicroscop met gesloten kweekschaaltjes in een ruimte buiten inperking, niet gewaarborgd is.

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
10. Kawamura, T., Cohen, S. S., Borris, D. L., Aquilino, E. A., Glushakova, S., Margolis, L. B., Orenstein, J. M., Offord, R. E., Neurath, A. R., and Blauvelt, A. (2000). Candidate microbicides block HIV-1 infection of human immature Langerhans cells within epithelial tissue explants. *J Exp Med* **192**, blz. 1491-500
11. Blauvelt, A., Asada, H., Saville, M. W., Klaus-Kovtun, V., Altman, D. J., Yarchoan, R., and Katz, S. I. (1997). Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest* **100**, blz. 2043-53
12. Wu, Z., Chen, Z., and Phillips, D. M. (2003). Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J Infect Dis* **188**, blz. 1473-82