

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 05-036.co1	30 mei 2005	CGM/050613-01	13 juni 2005
Onderwerp			
Advies kennisgeving IG 05-036			

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking IG 05-036, getiteld 'Studies in human and animal nutrition, metabolism and physiology', van de Universiteit Maastricht, 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 betreft hier experimenten waarbij een FACS en een microscoop gebruikt worden. Handelingen met deze cellen dienen plaats te vinden in een ML-II ruimte. Vanwege de aard en omvang van de FACS en de microscoop zijn deze gesitueerd op een lager inperkingsniveau (ML-I). De aanvrager verzoekt derhalve de experimenten te mogen uitvoeren op ML-I niveau.

De zoogdiercellen worden respectievelijk twee weken (FACS experiment) of drie dagen (microscoop) gekweekt op ML-II niveau waarbij de hoeveelheid overgebleven virus elke 10 uur zal halveren. Tevens worden de cellen twee maal cq. zes maal gewassen. De COGEM is van mening dat door de combinatie van de kweektijd en de wasstappen in beide experimenten de hoeveelheid overgebleven infectieus gg-virus is gereduceerd tot niet detecteerbare hoeveelheden.

Wanneer het gg-virus opgenomen wordt door de cel verliest het zijn membraan en envelopeiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Indien de cellen tijdens de handelingen met de FACS kapot gaan zullen derhalve geen infectieuze deeltjes in het medium kunnen vrijkomen. Bij het experiment met de microscoop betreffen het gesloten handelingen waardoor de kans dat eventueel aanwezig infectieus gg-virus in het milieu terecht komt verwaarloosbaar klein is.

De COGEM acht, in dit specifieke geval, de risico's voor mens en milieu, bij het uitvoeren van de experimenten op ML-I niveau, verwaarloosbaar klein.

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, stylized loop on the left and a long, horizontal stroke extending to the right.

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

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

Titel: Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte gebruikmakend van FACS en fluorescentie-microscopie

COGEM advies: CGM/050613-01

Inleiding

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

Het doel van de aanvrager is om eiwitten betrokken bij de vet-, suiker- en eiwitregulatie betrokken bij diabetes, obesitas en voedingsinterventies, te bestuderen. Muizen-, ratten- en humane cellen worden hiertoe getransduceerd met lentivirale vectoren van de 3^e generatie waarin genen coderend voor eiwitten betrokken bij de vet-, suiker-, en eiwitregulatie, gekloneerd zijn.

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als 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.

Om ervoor zorg te dragen dat de lentivirale vectoren zich niet zoals het HIV-1 kunnen repliceren worden in het derde-generatie lentivirale vectorsysteem de benodigde virale genen en het transgen verdeeld over vier afzonderlijke plasmiden (2). Voor de vorming van replicatie-competent lentivirus (RCL) zijn hierdoor minimaal drie recombinatie gebeurtenissen vereist. Mede doordat een minimum aan overlappende sequenties gebruikt wordt, is de kans op RCL-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' Long Terminal Repeat (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 complementarend recombinant virus uitermate klein (4).

De adviesvraag

De COGEM is verzocht een advies uit te brengen over handelingen met 3^e generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen. Deze handelingen vinden plaats buiten een veiligheidskabinet in een ML-I ruimte. Het betreft experimenten met een 'Fluorescent activated cell sorter' (FACS) en een fluorescentiemicroscop.

De werkzaamheden met de FACS en de fluorescentiemicroscop kunnen wegens de aard van deze apparatuur niet plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse 2. De FACS en microscop zijn gesitueerd in een ML-I ingeperkte ruimte. Hoewel handelingen met 3^e generatie lentivirale (SIN) getransduceerde zoogdiercellen plaats dienen te vinden in een veiligheidskabinet van klasse 2 verzoekt de aanvrager derhalve handelingen uit te mogen voeren buiten een veiligheidskabinet in het voornoemde ML-I laboratorium.

FACS experiment

De zoogdiercellen worden gekweekt in zogeheten 6-wellsplaten of 6-cm schalen gevuld met medium. Na transductie worden de cellen gedurende twee weken bij 37°C in een ML-II laboratorium gekweekt. De aanvrager levert gegevens waaruit blijkt dat maximaal $6,4 \times 10^6$ transducerende lentivirale deeltjes aan de cellen worden toegevoegd. Tijdens de kweekperiode worden de cellen minimaal twee maal overgezet in vers medium waaraan geen lentivirale deeltjes zijn toegevoegd. Minimaal twee weken na transductie worden de cellen bestudeerd met behulp van een FACS.

De werkomgeving van de FACS wordt voorafgaand en na afloop van het experiment gereinigd met 0,1% sodiumdodecylsulfaat (SDS) en 70% ethanol. Er wordt geen FACS-sorting uitgevoerd waardoor de cellen na meting direct in een afvalvat met 0.1% SDS terecht komen. Na afloop wordt de FACS doorgespoeld met 0,1% SDS zodat de daarin eventueel aanwezige virusdeeltjes zullen worden geïnactiveerd.

Fluorescentiemicroscopie

Voorafgaand aan de fluorescentiemicroscopie worden de getransduceerde cellen drie dagen gekweekt bij 37°C. Ook hier worden maximaal $6,4 \times 10^6$ transducerende deeltjes toegevoegd. Na 24 uur celweek worden de cellen drie maal gewassen en wordt nieuw medium toegevoegd. Op dag 3, voorafgaand aan de microscopische handelingen, worden deze stappen herhaald. De 6-wellsplaten of de 6-cm schalen worden na deze periode afgesloten met een deksel en in een transportcontainer van het ML-II naar het ML-I laboratorium vervoerd.

Het plateau en de omgeving van de microscop wordt voorafgaand en na afloop van het experiment behandeld met een 0,1% SDS oplossing gevolgd door 70% ethanol. Gedurende de microscopische handelingen blijven de kweekschalen gesloten

en vinden er geen open handelingen plaats. Na bestudering van de cellen worden deze teruggeplaatst in de transportcontainer en naar het ML-II laboratorium gebracht

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft reeds eerder over een soortgelijke adviesvraag geadviseerd (CGM/040209-01). Het betroffen hier 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 fluorescentiemicroscoop 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 deeltjes waren toegevoegd. De COGEM heeft destijds geadviseerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn bij het uitvoeren deze experimenten in een ML-I ruimte.

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 RCL die zich in het milieu kunnen verspreiden. Door gebruik te maken van het derde generatie lentivirale systeem wordt dit risico zeer sterk beperkt. Er zijn namelijk minimaal drie homologe recombinatie gebeurtenissen vereist, voordat RCL kan worden gevormd (3). Voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCL vorming bij gebruik van deze vectoren (5). De kans dat met derde generatie zelfinactiverende lentivirale vectoren RCL gevormd worden, is volgens de COGEM verwaarloosbaar klein.

Voorafgaand aan de experimenten waarbij gebruik wordt gemaakt van de FACS en de fluorescentiemicroscoop worden de cellen gekweekt op ML-II niveau. De COGEM wijst erop dat tijdens het kweken van de cellen er een kleine kans bestaat 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.

FACS experiment

De stabiliteit van virale vectoren wordt beïnvloed door verschillende factoren waaronder de temperatuur (6). 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 een halfwaardetijd van minder dan een uur gevonden (6). De in deze aanvraag getransduceerde zoogdiercellen worden gekweekt bij een temperatuur van 37°C.

Voorafgaand aan het FACS experiment worden de cellen minimaal twee weken gekweekt. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke concentratie na twee weken kweken met een factor 2^{34} ($= 1,7 \times 10^{10}$) verlaagd. Deze afname wordt versterkt door het wassen van de cellen. Tijdens de kweekperiode worden de cellen minimaal twee maal gewassen met medium waaraan geen lentivirale deeltjes zijn toegevoegd. Hierdoor zullen de vrije lentivirale deeltjes met het vervangen van het medium grotendeels verwijderd worden. De COGEM is van mening dat deze reductie dermate groot is dat aangenomen kan worden dat de hoeveelheid overgebleven lentivirale deeltjes is gereduceerd tot niet detecteerbare hoeveelheden.

Gezien de toevoeging van maximaal $6,4 \times 10^6$ lentivirale deeltjes en de reductie van $1,7 \times 10^{10}$ die bewerkstelligd wordt door de kweekperiode van 14 dagen waarbij een extra afname plaatsvindt door toepassing van de verschillende wasstappen, is de COGEM van mening dat de hoeveelheid infectieuze lentivirale deeltjes in deze twee weken gereduceerd is tot niet-detecteerbare hoeveelheden.

Wanneer de lentivirale deeltjes opgenomen worden door de cel verliezen ze hun membraan en envelopeiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij eventuele lysatie van cellen tijdens handelingen met de FACS zullen derhalve geen infectieuze deeltjes in het medium kunnen vrijkomen. Hiernaast worden de eventueel nog aanwezige vrije infectieuze deeltjes als ze de FACS verlaten geïnactiveerd met behulp van een 0,1% SDS oplossing. Literatuurgegevens tonen aan dat inactivatie van HIV-1 plaatsvindt bij een SDS concentratie vanaf 0,025% (7). Derhalve acht de COGEM de door de aanvrager voorgestelde methode adequaat om eventueel aanwezige infectieuze lentivirale deeltjes te kunnen inactiveren.

Gezien het bovenstaande is de kans op blootstelling van de medewerker aan infectieuze virale deeltjes minimaal wanneer de aanvullende voorschriften zoals vermeld in het voorstel tot inschaling in acht worden genomen. De COGEM acht derhalve de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein bij uitvoering van onderhavig FACS-experiment op ML-I niveau.

Fluorescentiemicroscopie

Voordat de cellen met de microscoop worden bestudeerd, vindt er een celkweek van drie dagen plaats. Na 24 uur en 72 uur worden de cellen drie maal gewassen. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke concentratie na drie dagen kweken met een factor 2^7 verlaagd. Deze afname wordt versterkt door het 6-voudig wassen van de cellen en twee maal verversen van het medium waaraan geen lentivirale deeltjes zijn toegevoegd. Deze reductie is naar de mening van de COGEM zodanig groot dat aangenomen mag worden dat er geen detecteerbare hoeveelheden infectieuze virusdeeltjes meer aanwezig zijn in het medium.

Doordat er wordt gewerkt met gesloten kweekschaaltjes kan de microscoop niet in aanraking komen met de geïnfecteerde cellen. Indien in het zeer onwaarschijnlijke geval toch infectieuze virusdeeltjes aanwezig zijn, is de kans dat ze uit een afgesloten kweekschaaltje in het milieu kunnen terechtkomen uiterst gering. De COGEM acht derhalve het uitvoeren van de handelingen op ML-I niveau gerechtvaardigd op voorwaarde dat de kweekplaatjes vloeistofdicht gemaakt worden alvorens ze naar het ML-I laboratorium worden vervoerd.

Concluderend is de COGEM van mening dat de handelingen met de getransduceerde zoogdiercellen waarbij gebruik gemaakt wordt van de FACS en de fluorescentie-microscoop in dit specifieke geval kunnen plaatsvinden op ML-I niveau met inachtneming van de aanvullende voorschriften zoals die in onderhavig advies en het voorstel tot inschaling staan beschreven.

Referenties

1. Van Regenmortel MHV (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
2. 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
3. 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
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. 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. *Molecular Therapy* **8**: 830-839
6. Higashikawa F and Chang L (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**: 124-131
7. Howett MK, Neely EB, Christensen ND, Wigdahl B, Krebs FC, Malamud D, Patrick SD, Pickel MD, Welsh PA, Reed CA, Ward MG, Budgeon LR and Kreider JW (1999) A broad-spectrum microbicide with virucidal activity against sexually transmitted viruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 314-321