



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
GGO 04-125/02.co1	14 november 2005	CGM/051129-01	29 november 2005

Onderwerp  
Adviesvraag kennisgeving GGO 04-125/02

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag over kennisgeving GGO 04-125/02, 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, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met getransduceerde zoogdiercellen waarin een niet-replicatie competente lentivirale vector is gebracht. Het doel van het onderzoek is de ontwikkeling en fysiologie van hartspierweefsel te bestuderen. De aanvrager is reeds in het bezit van een vergunning voor werkzaamheden met getransduceerde cellen in een ML-II laboratorium. Het verzoek tot wijziging van de vergunning betreft twee studies en heeft betrekking op de omlaagschaling van betrokken werkzaamheden waarbij specifieke meetapparatuur gehanteerd wordt. Deze apparatuur is gesitueerd in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor de werkzaamheden. Risico's bij werkzaamheden met lentivirale vectoren kunnen ontstaan door aanwezigheid van replicatie-competent retrovirus (RCR) of niet-replicatie-competente vrije lentivirale deeltjes welke zich mogelijk in het milieu kunnen verspreiden.

In de eerste studie worden electrofysiologische metingen uitgevoerd aan de getransduceerde cellen (die getest zijn op afwezigheid van virussen, zoals HIV-1) in een open kweekschaaltje buiten inperking. In de andere studie worden getransduceerde cellen geïnjecteerd in proefdieren waarna een MRI gemaakt wordt. De MRI bevindt zich op D-I niveau.

De COGEM is van mening dat met het hanteren van de door de aanvrager voorgestelde werkwijze en aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij de omlaagschaling van de werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn. De COGEM wijst er op dat bij de werkzaamheden buiten inperking veilige microbiologische technieken in acht genomen moeten worden.

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 stylized, cursive 'Z' followed by a horizontal line 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: Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen**

**COGEM advies: CGM/051129-01**

### **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu bij omlaagschaling van handelingen met derde generatie lentiviraal-getransduceerde zoogdiercellen. Het doel van het onderzoek is het bestuderen van de ontwikkeling en fysiologie van hartspierweefsel. Hiertoe zullen verschillende genen variërend van anti-apoptotische genen (dat zijn genen die een geprogrammeerde zelfdood voorkomen) tot genen die coderen voor groeifactoren, met behulp van lentivirale vectoren in zoogdiercellen tot expressie worden gebracht.

Het onderhavige advies heeft betrekking op een verzoek tot wijziging van een vergunning (IG 04-125). Het betreft de volgende werkzaamheden:

- a) het uitvoeren van open handelingen met getransduceerde cellen in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking). De cellen zullen gebruikt worden voor elektrofysiologische metingen.
- b) het uitvoeren van metingen op proefdieren (ingespoten met getransduceerde cellen) met behulp van een 'magnetic resonance imager' (MRI). De MRI bevindt zich onder inperkingsniveau D-I.

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem. Dit systeem maakt een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel mogelijk. Het grote voordeel van lentivirale vectoren is dat ze behalve delende cellen ook niet-delende cellen kunnen infecteren. Als basis voor de lentivirale vector wordt in deze studie 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 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 structurele 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 daarom verwijderd. Deze systemen bevatten minder dan 65% van de oorspronkelijke virale sequenties (3).

In de lentivirale vector die gehanteerd wordt in deze studie is het *env* gen vervangen door het gen dat codeert voor het glycoproteïne G van het *vesicular stomatitis virus* (VSV-G). Door de aanwezigheid van VSV-G kan het virus in principe iedere cel infecteren. Hierdoor heeft de lentivirale vector een groter gastheerbereik en weefseltropisme verkregen (5).

Het splitsen van het lentivirale vectorsysteem in vier plasmiden met een minimum aan overlappende sequenties, verkleint de kans op RCR vorming aanzienlijk. Voor de vorming van RCR zijn minimaal drie homologe recombinitie 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 namelijk verwijderd 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. Het risico op mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cel na infectie met een complementierend recombinant virus wordt daardoor uitermate klein (4).

### **De adviesvraag**

De COGEM is gevraagd te adviseren over omlaagschaling van handelingen met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. De beoogde handelingen vinden plaats in een ruimte buiten inperking. De aanvrager heeft reeds een vergunning om transductie-experimenten uit te voeren met zoogdiercellen en derde generatie lentivirale vectoren onder ML-II condities met aanvullende voorschriften (IG 04-125). Daarnaast beschikt de aanvrager over een wijziging op deze vergunning zodat het toegestaan is om gesloten handelingen met getransduceerde cellen uit te voeren buiten inperking (IG 04-125/1).

De onderhavige adviesvraag heeft betrekking op de omlaagschaling van werkzaamheden waarbij specifieke meetapparatuur gehanteerd wordt. Deze apparatuur is gesitueerd in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor de werkzaamheden.

De te transduceren primaire cellen zijn getest op afwezigheid van een groot aantal virussen, waaronder HIV-1. Vervolgens worden deze zoogdiercellen gedurende vier uur onder ingeperkt gebruik geïncubeerd met de lentivirale vectoren. De aanvrager geeft aan dat de te gebruiken virusbatch niet wordt getest op de aanwezigheid van RCR. Na incubatie worden de cellen 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. Vervolgens worden de cellen drie tot zeven dagen verder gekweekt. Ten slotte worden de cellen vervoerd naar een andere locatie voor verdere werkzaamheden. Op de

nieuwe locatie ondergaan de cellen nogmaals een trypsine behandeling, waarna ze worden overgebracht naar een nieuw kweekschaltje. Hieronder wordt nader ingegaan op de werkzaamheden.

#### *Metingen aan getransduceerde cellen*

Met behulp van de zogenaamde ‘patch clamping’ methodiek worden metingen aan de getransduceerde cellen verricht in een niet-ingerichte ruimte. Patch clamping heeft als doel om ionenstromen over het membraan van één cel te meten. Hiertoe wordt het kweekschaltje open onder een microscoop geplaatst, waarna met behulp van een pipet een individuele cel geïsoleerd wordt. Vervolgens vinden de metingen plaats.

Bij het aanzuigen van een cel is het mogelijk dat aerosolvorming plaatsvindt. Hiertoe is een extra afzuiging geplaatst boven de apparatuur. De aanvrager geeft verder aan dat de apparatuur die eventueel in aanraking kan komen met de cellen (microscooptafel en pipethouder) gereinigd wordt met een effectief desinfectans, bijvoorbeeld 70% ethanol. Daarnaast wordt de omgeving van de meetopstelling gereinigd na afloop van de werkzaamheden. Bovendien wordt de pipet na iedere meting vervangen.

#### *Metingen op proefdieren*

Getransduceerde cellen worden onder DM-II niveau geïnjecteerd in proefdieren (muizen) die gehuisvest zijn in filtertopkooien. De dieren zijn niet genetisch gemodificeerd en zijn volgens de aanvrager vrij van virussen die complementair zijn aan lentivirussen. Naast een DM-II dierverblijf is op dezelfde locatie ook een D-I verblijf aanwezig. In dit verblijf is een veterinaire MRI geplaatst waarmee metingen op de proefdieren worden gedaan.

Voorafgaand aan de meting, worden de dieren onder narcose gebracht. Vervolgens worden de dieren in de MRI geplaatst waarin ze volledig gefixeerd zijn. Bovendien is de MRI in een D-I ruimte gesitueerd waaruit ontsnappen niet mogelijk is.

Na beëindigen van de metingen worden de genarcotiseerde dieren weer teruggeplaatst in filtertopkooien en overgebracht naar het DM-II verblijf. De veterinaire MRI en de fixatiemiddelen worden na iedere meetsessie gedesinfecteerd.

Voor de metingen op zowel cellulair als animaal niveau heeft de aanvrager aanvullende werkvoorschriften opgesteld. Dit betekent dat tijdens de metingen de ruimte niet toegankelijk is voor andere personen, dat handschoenen gedragen worden, dat alle ‘disposable’ materialen afgevoerd worden in ‘biohazard’ containers en dat alle herbruikbare materialen na afloop gedecontamineerd worden. Bij de werkzaamheden op cellulair niveau wordt tevens een specifiek mond/neusmasker (type FFP2) gedragen.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft twee maal eerder geadviseerd over adviesvragen betreffende open handelingen met derde generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen (CGM/040209-01 en CGM/041103-01).

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 positief geadviseerd (CGM/040209-01).

In het tweede geval (CGM/041103-01) heeft de aanvrager verzocht om open handelingen uit te mogen voeren buiten een ingeperkte ruimte. De virusbatch was 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. De COGEM heeft destijds één extra wasstap met medium geadviseerd om de hoeveelheid genetisch gemodificeerd virus verder te reduceren tot niet aantoonbare hoeveelheden (CGM/041103-01).

Verder heeft de COGEM eerder geadviseerd over werkzaamheden met beenmergcellen die geïnfecteerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren (CGM/050527-01). Deze cellen zouden geplaatst worden in bestraalde apen. De aanvrager heeft destijds verzocht om de werkzaamheden met de apen te mogen uitvoeren op DM-II niveau (in plaats van DM-III). De COGEM heeft hierop negatief geadviseerd omdat de kans bestond dat infectieuze virusdeeltjes in het milieu vrij zouden komen.

### **Overweging en advies**

In de onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van een zelfinactiverende derde generatie lentivirale vector. Risico's die kunnen optreden bij werkzaamheden met dergelijke vectoren hebben betrekking op een eventuele aanwezigheid van RCR en van vrije niet-replicerende lentivirale virusdeeltjes. Tevens kunnen risico's ontstaan wanneer recombinatie plaatsvindt van vrije lentivirale virusdeeltjes met in proefdieren aanwezige complementaire virussen.

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). Bij de deskundigen van de COGEM is bekend dat bewust gezocht is naar RCR vorming en dat tevens getracht is om RCR vorming te bewerkstelligen. Uit deze ongepubliceerde data blijkt dat RCR vorming niet is aangetoond. De kans dat met derde generatie zelfinactiverende lentivirale

vectoren RCR gevormd worden, is volgens de COGEM derhalve verwaarloosbaar klein. Dit heeft tot gevolg dat de COGEM het testen op afwezigheid van RCR vorming niet noodzakelijk acht.

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 getransduceerde zoogdiercellen worden opgegroeid bij een temperatuur van 37°C gedurende minimaal één week. Gezien de halfwaardetijd is het 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. Elke wasstap reduceert het aantal aanwezige partikels met een factor 20.

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 ( $\approx \text{pH}=7$ ) efficiënter het VSV-G eiwit afbreekt (8; 9). Elke trypsinebehandeling reduceert het aantal aanwezige lentivirale partikels met een additionele factor 10.

Om te bepalen of de gehanteerde kweektijd, wasstappen en trypsinebehandeling voldoende zijn om de gewenste reductie van de hoeveelheid vrije lentivirale virusdeeltjes te verkrijgen, wordt de volgende formule gehanteerd:

$(20^W * 30^I * 2^{2,4T})/V \geq 100$ . Hierbij is V de titer van het oorspronkelijke inoculum, W is het aantal wasstappen en T is de kweektijd in dagen. Met I wordt het aantal 'inactiverende' wasstappen bedoeld met trypsine of humaan serum. Volgens deze formule wordt een reductiefactor bereikt die minstens 100x groter is dan het oorspronkelijke inoculum. Deze formule is een voorlopige versie waarbij de reductiefactoren op conservatieve wijze zijn ingeschat. Op dit moment stelt de COGEM een algemeen advies op betreffende de inschaling van werkzaamheden met derde generatie lentivirale vectoren. In dit advies zal een verdere uitwerking en onderbouwing van de formule gegeven worden.

In de vergunningaanvraag wordt de gehanteerde titer niet vermeld. Wanneer wordt uitgegaan van een maximaal inoculum van  $8 \times 10^7$  lentivirale partikels dan wordt, met in acht name van de gehanteerde kweektijd, het wassen en de trypsinebehandelingen, het aantal vrije lentivirale partikels gereduceerd tot niet-detecteerbare hoeveelheden. Bij de beoogde experimenten worden zogenaamde 'single cell' metingen uitgevoerd en zal het gebruikte inoculum, volgens de deskundigen van de COGEM, naar alle waarschijnlijk lager zijn dan het aangenomen maximale inoculum. Indien gebruik

gemaakt wordt van een hogere titer dan dienen additionele wasstappen (met fysiologisch zout of humaan serum) of trypsinebehandelingen plaats te vinden. Het is ook mogelijk om de kweektijd te verlengen om uiteindelijk de beoogde reductie van het aantal vrije lentivirale partikels te bereiken.

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 zullen derhalve geen lentivirale partikels kunnen vrijkomen.

Door recombinatie van eventueel aanwezige virussen in de te transduceren cellen met vrije lentivirale partikels zouden replicatie-competente lentivirale vectoren kunnen ontstaan. Aangezien de te transduceren zoogdiercellen getest worden op afwezigheid van onder andere anti-HTLV (anti-Human T-cell Lymphotropic Virus) en HIV-antigeen p24, acht de COGEM de kans op vorming van recombinante infectieuze lentivirussen verwaarloosbaar klein.

Verder heeft de aanvrager voor zowel de electrofysiologische metingen als de metingen aan proefdieren aanvullende werkvoorschriften en desinfectievoorschriften opgesteld. De COGEM is van mening dat met het hanteren van deze voorschriften de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is.

Daarnaast geeft de aanvrager aan dat de proefdieren getest worden op afwezigheid van virussen die complementair zijn aan lentivirussen. Hierdoor is het niet aannemelijk dat infectieuze recombinante lentivirussen zullen ontstaan. Bovendien worden de getransduceerde cellen geïnjecteerd in proefdieren (muizen) die als 'inperkend systeem' beschouwd kunnen worden. Verder bevindt de MRI zich in een D-I verblijf waaruit ontsnapping niet mogelijk is.

Omdat er in de onderhavige adviesvraag 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'.

Concluderend is de COGEM, in dit specifieke geval, van mening dat met 1) het kweken van de getransduceerde zoogdiercellen op ML-II niveau gedurende minimaal één week, 2) het wassen van de cellen met fysiologische zoutoplossing én trypsineoplossingen, en 3) het hanteren van aanvullende werkvoorschriften, de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van electrofysiologische metingen met open kweekschaltes in een ruimte buiten inperking, en daarnaast metingen aan geïnjecteerde proefdieren in een D-I ruimte, 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