



Commissie Genetische Modificatie

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

Cogem
postbus 578
3720 AN Bilthoven

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

CGM/051215-01

19 december 2005

Onderwerp

Advies Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen

Geachte heer Van Geel,

Hierbij bied ik u het advies aan getiteld 'Handelingen met door lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen'.

Samenvatting:

Handelingen met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren vinden normaliter plaats op ML-II inperkingsniveau. De COGEM heeft echter steeds meer adviesvragen ontvangen over omlaagschaling van werkzaamheden naar een ML-I niveau of een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met ggo's (buiten inperking). In een aantal gevallen heeft de COGEM hierover positief geadviseerd. In dit onderhavige advies stelt de COGEM algemene richtlijnen op voor handelingen met lentiviraal getransduceerde cellen op een lager niveau dan ML-II.

Als er risico's zijn bij werkzaamheden met lentivirale vectoren dan zijn deze verbonden aan de aanwezigheid van replicatiecompetente lentivirusdeeltjes (RCL) en vrije lentivirale vectordeeltjes afkomstig uit het oorspronkelijke inoculum. Bij het vrijkomen van deze deeltjes, is verspreiding in het milieu mogelijk. De kans op het ontstaan van RCL bij de productie van derde generatie lentivirale vectoren wordt op grond van theoretische en ervaringsoverwegingen verwaarloosbaar klein geacht. Daarom acht de COGEM het niet noodzakelijk om het inoculum te testen op afwezigheid van RCL-vorming. Verder dienen vrije vectordeeltjes in het kweekmedium door de wijze van kweken en wassen dusdanig gereduceerd te worden dat laboratoriummedewerkers geen risico lopen. De reductie wordt bepaald door de halfwaardetijd van het virus, de kweekduur van de cellen na transductie en het aantal wasstappen.

Tevens dient aangetoond te worden dat het gastheermateriaal vrij is van relevante lentivirussen. Bovendien zijn aanvullende voorschriften opgesteld voor handelingen buiten inperking en op ML-I niveau.

Concluderend is de COGEM van mening dat met in acht name van de opgestelde criteria, de aanvullende voorschriften en toepassing van de algemeen aanvaarde 'veilige microbiologische technieken', omlaagschaling van het inperkingsniveau mogelijk is zonder de veiligheid van mens en milieu in gevaar te brengen.

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 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

Dit COGEM advies is mede tot stand gekomen middels een werkgroep bestaande uit Prof. dr. J. Schuitemaker (voorzitter), Dr. B.P.H. Peeters, Dr. T.G. Kimman en Dr. N.A. Kootstra van de subcommissie Medisch Veterinair van de COGEM.

Titel: Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen

COGEM advies: CGM/051215-01

Inleiding

Werkzaamheden met zoogdiercellen die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren vinden normaal plaats op ML-II inperkingsniveau conform de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) (26). De laatste jaren is een toenemend aantal adviesvragen ontvangen tot verlaging van het inperkingsniveau naar ML-I, of een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met ggo's (buiten inperking), vanwege praktische redenen. Meetapparatuur bevindt zich namelijk niet altijd in een ML-II ruimte zodat metingen met bijvoorbeeld een microscoop (waaronder 'Fluorescent Activated Cell Sorter' (FACS) analyse, fluorescentie-microscopie, of confocale laserscan microscopie) niet kunnen plaatsvinden.

De COGEM heeft in een aantal eerdere adviezen positief geadviseerd over omlaagschaling van handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen. Gezien de eerder uitgebrachte adviezen, acht zij het mogelijk om een algemeen advies op te stellen betreffende de omlaagschaling van handelingen met zoogdiercellen (animaal of humaan) die getransduceerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. In dit algemene advies stelt de COGEM richtlijnen op met betrekking tot werkzaamheden op een ML-I inperkingsniveau of buiten inperking.

Lentivirale vectoren

Lentivirale vectoren zijn afgeleid van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*) en worden veelvuldig gebruikt als genoverdrachtsysteem (11; 27; 38; 39). 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 (11).

Als basis voor lentivirale vectoren kan gebruik worden 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*, een complexe combinatie van zes andere genen (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* en *rev*). Niet alle functies van deze genen zijn bekend, maar ze zijn essentieel voor het handhaven van de virulentie van het virus en interfereren mogelijk met de celcyclus en/of celgroei (11; 37). Het eiwit Vpu is betrokken bij de virus-assemblage, waarbij de eiwitten Vif, Vpr en Nef in het virusdeeltje ingebouwd worden. De eiwitten Tat en Rev zijn betrokken bij de regulatie van de virale genexpressie en spelen een centrale rol bij de replicatie van HIV-1 (37; 39).

Het binnendringen van lentivirussen (HIV) 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 een CD4 receptor die aanwezig is op het oppervlak van cellen van het immuunsysteem. Op deze wijze wordt de binding met een co-receptor op de gastheercel mogelijk gemaakt.

Bij lentivirale vectoren wordt vaak het *env* gen vervangen door het glycoproteïne G van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G) teneinde ook cellen buiten het immuunsysteem te kunnen infecteren. Het VSV-G envelop-eiwit is co-receptor onafhankelijk en kan in principe iedere cel infecteren. Hierdoor krijgt de lentivirale vector met een VSV-G envelop-eiwit een groter gastheerbereik en weefseltropisme (11; 15; 19).

Dit advies heeft met name betrekking op VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectoren omdat dit de meest gebruikte vectoren zijn. Bovendien zijn de meeste studies verricht naar dit type vector. Vectoren die het VSV-G envelop-eiwit bezitten worden over het algemeen als stabiel aangemerkt dan andere type lentivirale vectoren. Daarom is dit advies ook van toepassing op minder stabiele vectoren.

Veiligheid lentivirale vectoren

In de loop der jaren zijn diverse vectorsystemen ontwikkeld, de zogenoemde eerste, tweede en derde generatie lentivirale systemen. Bij dergelijke systemen zijn virale genen verdeeld over verschillende plasmiden om zodoende de veiligheid van lentivirale vectoren te vergroten, zodat ze zich niet zoals het HIV-1 kunnen repliceren.

Bij eerste en tweede generatie lentivirale vectorsystemen wordt gebruik gemaakt van een cel die getransfecteerd is met een drietal plasmiden. Verdeeld over deze plasmiden liggen diverse genen van HIV-1 die nodig zijn om een virusdeeltje te produceren. Een eerste plasmide codeert voor eiwitten die noodzakelijk zijn voor het inpakken van de vector. Dit plasmide bevat geen 'packaging' signaal (ϕ) en geen 'Long Terminal Repeats' (LTR's), maar brengt wel alle benodigde virale eiwitten tot expressie, met uitzondering van het envelop-eiwit. Een tweede plasmide brengt het envelop-eiwit tot expressie, bijvoorbeeld het VSV-G eiwit. Tenslotte bevat een derde plasmide het transgen en alle virale elementen die nodig zijn voor transductie en expressie van het transgen, en het inpakken van het plasmide ('packaging' signaal) (11; 24; 25; 30).

De kans op vorming van replicatie-competent virus door recombinatie tijdens productie van de vector is niet geheel uit te sluiten bij eerste en tweede generatie lentivirale 'packaging' systemen. Om de kans nog verder te minimaliseren zijn derde generatie 'packaging' systemen ontwikkeld (23). In dergelijke systemen wordt tevens het Rev eiwit via een afzonderlijke vierde plasmide tot expressie gebracht (11; 13). Daarom zijn bij de productie van derde generatie systemen minimaal drie

recombinante gebeurtenissen vereist voor de vorming van replicatie-competent lentivirus (RCL). Mede doordat een minimum aan overlappende sequenties gebruikt wordt, is de kans op RCL-vorming minimaal (11).

Daarnaast draagt het gebruik van zogenaamde zelf-inactiverende (SIN) vectoren bij aan een hogere bioveiligheid (23; 42). Bij derde generatie lentivirale SIN vectoren zijn de promotor en enhancer sequenties 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 complementsend recombinant virus wordt daardoor uitermate klein (22; 23).

Lentivirale vectoren in laboratoria

Lentivirussen worden volgens de Regeling ggo ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 (26). Laboratoriumwerkzaamheden met volvirulente genetisch gemodificeerde lentivirussen worden ingeschaald op ML-III inperkingsniveau. Met betrekking tot het gebruik van derde generatie lentivirale vectoren heeft de COGEM in het verleden geadviseerd (2) om laboratoriumhandelingen, waaronder infectie van zoogdiercellen, in te schalen op ML-II inperkingsniveau met de volgende aanvullende voorschriften:

- Tijdens de handelingen dienen handschoenen te worden gedragen;
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal moet vrij zijn van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel. Bekende lentivirussen zijn HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1) en HTLV-2 voor mensen, en *Simian immunodeficiency virus* (SIV) voor apen.

De COGEM heeft eerder verscheidene adviezen gepubliceerd over handelingen met derde generatie lentivirale getransduceerde zoogdiercellen op een lager inperkingsniveau (3-10). Het betroffen veelal microscopische handelingen die uitgevoerd werden in een ML-I laboratorium of in een ruimte buiten inperking. Hierbij betrof het enerzijds handelingen met getransduceerde zoogdiercellen in afgesloten kweekschalmpjes, en anderzijds zogenaamde open handelingen, waarbij het kweekmedium direct in contact stond met de apparatuur en waarbij de kans aanwezig was dat aerosolen konden vrijkomen. Teneinde de veiligheid van mens en milieu te waarborgen heeft de COGEM destijds 'case-by-case' eisen gesteld, met betrekking tot de aanwezigheid van lentivirale virusdeeltjes in de proefopstelling. De eisen betreffen onder andere de kweektijd, het aantal wasstappen en de uit te voeren testen op de aanwezigheid van RCL.

Risico-analyse

Het onderhavige advies heeft betrekking op zelfinactiverende (SIN) derde generatie lentivirale vectoren. Bij de productie van dergelijke vectoren en de transductie van zoogdiercellen kan een aantal potentiële risico's benoemd worden, zoals het ontstaan van replicatiecompetente lentivirussen. Verder kan overgebleven oorspronkelijk inoculum resulteren in de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het kweekmedium. Bij handelingen zouden deze deeltjes eventueel in het milieu kunnen vrijkomen.

Replicatiecompetent lentivirus

De kans op het ontstaan van RCL tijdens de productie van derde generatie zelfinactiverende lentivirale vectoren is zeer klein. De vectoren zijn zelfinactiverend en door het gebruik van verschillende plasmiden zijn minimaal drie homologe recombinatie gebeurtenissen vereist voordat een RCL gevormd kan worden (42). Daarbij is er tot op heden nog nooit melding gemaakt van RCL-vorming bij het gebruik van deze vectoren (28).

Indien in het onwaarschijnlijke geval RCL ontstaan dan kunnen deze in de cellen repliceren en vrijkomen in het medium. Bij morsen of andere incidenten kan het virus in het milieu terechtkomen en in eerste instantie laboratoriummedewerkers infecteren. Gezien de relatief beperkte besmettingsroute van HIV is de kans op besmetting van personen voornamelijk aanwezig bij prikincidenten of door contact met open huidwondjes waarbij direct bloedcontact is (29). Indien personen geïnfecteerd zijn dan kunnen de RCL zich verder verspreiden omdat het virus ook in de cellen van de geïnfecteerde personen kan repliceren. Daarbij zijn VSV-G gepseudotyperde lentivirussen in principe in staat om elk celtype te infecteren. Het virus integreert in het DNA waarbij het theoretisch mogelijk is dat door de insertie in of nabij een oncogen een tumor kan ontstaan (22). Opgemerkt moet worden dat de kans hierop zeer klein is omdat tot nu toe nog geen meldingen bekend zijn dat HIV tumoren induceert. Aangezien lentivirale vectoren zijn afgeleid van HIV, is het aannemelijk dat de kans op tumorinductie door dergelijke vectoren ook zeer klein is (22).

Vrije vectordeeltjes

Naast replicatiecompetent lentivirus kunnen ook replicatiedeficiënte vrije vectordeeltjes, afkomstig van het oorspronkelijke inoculum, in het kweekmedium aanwezig zijn. Deze kunnen in geval van morsen of andere incidenten in het milieu terecht komen. Laboratoriummedewerkers kunnen bijvoorbeeld besmet worden door prikincidenten of contact met open huidwondjes (29).

Indien replicatiedeficiënte vectordeeltjes in het lichaam komen, kunnen de deeltjes éénmalig een cel infecteren. Geïnfecteerde cellen kunnen geen nieuwe replicatiecompetente virusdeeltjes meer maken, waardoor de infectie beperkt blijft tot de plaats van besmetting. Indien vectordeeltjes in de bloedbaan terechtkomen dan zal het virus

geïnactiveerd worden door hitte labiele factoren in het plasma (12). De infectie zal hierdoor hoogstwaarschijnlijk beperkt blijven tot de plaats van besmetting. Afhankelijk van het insert en de plaats van insertie in het genoom, is er slechts een theoretische kans op het ontstaan van tumoren (22).

Reductie vrije vectordeeltjes

Uit het bovenstaande blijkt dat de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het kweekmedium bij werkzaamheden op een lager inperkingsniveau vermeden dient te worden. De vectordeeltjes kunnen door diverse wasstappen weggewassen worden, maar ook door langdurig kweken gezien de halfwaardetijd van lentivirussen. De halfwaardetijd is onder andere afhankelijk van de temperatuur (17).

Voor lentivirale vectoren, die gepseudotypeerd zijn met het VSV-G envelop-eiwit, wordt 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 wordt zelfs een halfwaardetijd van minder dan een uur gevonden (17). Zoogdiercellen worden doorgaans gekweekt bij een temperatuur van 37°C, waardoor de gemiddelde halfwaardetijd van lentivirale vectoren hierbij 10 uur zal zijn. Bij een halfwaardetijd van 10 uur is de oorspronkelijke concentratie na bijvoorbeeld zeven dagen kweken met een factor 2^{17} ($= 1,3 \times 10^5$) verlaagd. Daarnaast wordt de afname van het aantal vrije vectordeeltjes verder versterkt door het wassen van de cellen met bijvoorbeeld kweekmedium of een fysiologische zoutoplossing. De exacte reductie is afhankelijk van ondermeer het volume dat gebruikt wordt voor de wasstap. Ruwweg kan aangenomen worden dat met een wasstap ongeveer 95% van de aanwezige vrije vectordeeltjes wordt verwijderd.

Tevens zijn er verschillende agentia die virusdeeltjes kunnen inactiveren en de aanhechting met de gastheercel kunnen verbreken (12; 18; 35; 36). Het is bijvoorbeeld bekend dat trypsine HIV-1 inactieveert en bij een fysiologische zuurgraad ($\approx \text{pH}=7$) efficiënt het VSV-G envelop-eiwit afbreekt (31; 35). Trypsine zorgt ervoor dat virusdeeltjes die gehecht zijn aan de cellen losgemaakt worden en zodoende weggewassen kunnen worden. Daarnaast zullen de overgebleven virusdeeltjes niet meer infectieus zijn, doordat trypsine het VSV-G envelop-eiwit kan inactiveren. 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 (35). De virusinactiverende werking is afhankelijk van de incubatietijd van trypsine en van de hoeveelheid virus dat in de celkweek aanwezig is (35).

Bovendien kunnen lentivirale vectoren die gepseudotypeerd zijn met een VSV-G envelop-eiwit geïnactiveerd worden middels een wasstap met humaan serum (12). Door de aanwezigheid van een hitte labiele component, waarschijnlijk een complementfactor van het immuunsysteem, worden lentivirale vectoren bij een

incubatie van één uur bij 37°C voor meer dan 98% geïnactiveerd (12). Daarnaast tonen literatuurgegevens aan dat inactivatie van HIV-1 ook kan plaatsvinden door behandeling met een sodiumdodecylsulfaat (SDS) concentratie vanaf 0,025% (18). Opgemerkt dient te worden dat cellen een SDS behandeling niet overleven. Een dergelijke inactivering van HIV-1 kan wel toegepast worden voor bijvoorbeeld eiwitanalyses.

Internalisatie en membraangebonden virusdeeltjes

Lentivirale deeltjes kunnen aan het membraan van cellen binden, waardoor ze niet weggewassen kunnen worden. Tevens zijn sommige macrofaagachtige celtypen, waaronder dendritische cellen, in staat om lentivirussen te internaliseren. Hierbij worden de virusdeeltjes als het ware opgeslagen in de cel. Aangezien de deeltjes niet uitgepakt worden, ontstaat er geen infectie. Na verloop van tijd kunnen de virusdeeltjes weer uitgescheiden worden (1; 14; 20; 32; 33; 40; 41). Membraangebonden en geïnternaliseerde virusdeeltjes kunnen onder bepaalde omstandigheden tot negen maanden infectieus blijven (32). In deze situaties zal het weggwassen van virusdeeltjes en ook de kweektijd weinig invloed hebben op het verwijderen van virusdeeltjes.

Mobilisatie van de lentivirale vector

Indien vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes opgenomen worden door een cel verliezen de deeltjes hun membraan en envelopeiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij het eventueel openbreken (lyse) van cellen zullen derhalve geen vectordeeltjes vrijkomen.

Recentelijk is bekend geworden dat in bijzondere situaties onder laboratoriumomstandigheden genomische transcripten kunnen ontstaan in hematopoïetische cellen die getransduceerd zijn met derde generatie SIN lentivirale vectoren (21). Deze genomische transcripten zijn afkomstig van de lentivirale vector en kunnen, na co-infectie met HIV-1, recombinante replicatiecompetente vectordeeltjes vormen (16; 21). Derhalve is het voor de veiligheid van de medewerker van belang dat de gebruikte cellen vrij zijn van relevante lentivirussen.

Advies

De risico's die verbonden kunnen zijn aan werkzaamheden met lentiviraal geïnfecteerde zoogdiercellen zijn de aanwezigheid van RCL en vrije niet-replicerende vectordeeltjes in de celkweken. Bij incidenten kunnen laboratoriummedewerkers besmet en geïnfecteerd raken, waardoor theoretisch tumoren kunnen ontstaan. Derhalve dient bij experimenten met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen, op

een lager inperkingsniveau dan ML-II, zeker gesteld te worden dat infectieuze virussen in het inoculum en in de celkweek afwezig zijn.

RCL test

Voor het ontstaan van RCL zijn door gebruik van het derde generatie lentivirale systeem minimaal drie homologe recombinatie gebeurtenissen vereist (42). Echter, voor zover bekend is er nooit melding gemaakt van RCL-vorming bij gebruik van deze vectoren (28). Bij de deskundigen van de COGEM is bekend dat bewust gezocht is naar RCL-vorming en dat tevens getracht is om RCL-vorming te bewerkstelligen. Uit deze ongepubliceerde data blijkt dat RCL-vorming niet is aangetoond. De kans dat met derde generatie zelfinactiverende lentivirale vectoren RCL gevormd worden, is volgens de COGEM verwaarloosbaar klein. Dit heeft tot gevolg dat de COGEM het testen op afwezigheid van RCL-vorming in de virusbatch niet noodzakelijk acht voor open of gesloten handelingen buiten inperking of op ML-I inperkingsniveau.

Reductiefactor lentivirale deeltjes

Om open handelingen met getransduceerde lentivirale zoogdiercellen op ML-I niveau of buiten inperking te mogen uitvoeren, dienen vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes verwijderd te zijn. Reductie van vrije vectordeeltjes vindt plaats door het langdurig kweken van de getransduceerde zoogdiercellen gezien de halfwaardetijd van lentivirussen. Tevens zal het aantal wasstappen bijdragen aan de reductie van vectordeeltjes.

De reductiefactor van het aantal vrije vectordeeltjes dient uiteindelijk twee log hoger te zijn dan de titer van het oorspronkelijke inoculum.

Hierbij kunnen ruwweg de volgende parameters gesteld worden:

- de halfwaardetijd van een lentivirus bij 37°C is ongeveer 10 uur;
- een wasstap met kweekmedium of zoutoplossing geeft een reductie van ongeveer 95%;
- een wasstap met trypsine of humaan serum inactiverend lentivirussen en zorgt voor een extra reductie van ongeveer een factor 10.

Om vast te stellen of de genomen maatregelen adequaat zijn om de gewenste reductie van de hoeveelheid vrije lentivirale virusdeeltjes te behalen, kan de volgende formule gehanteerd worden:

$$(20^W * 200^I * 2^{2,4T}) / V \geq 100$$

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. Indien geen wasstappen (W of I) worden toegepast kan de betreffende parameter achterwege gelaten worden.

Voorts is de COGEM van mening dat de kans op het vrijkomen van lentivirale deeltjes, bijvoorbeeld via aërosolen, uit het kweekmedium, kleiner is bij gesloten handelingen dan bij open handelingen. Derhalve adviseert de COGEM dat voor gesloten handelingen, op een lager inperkingsniveau dan ML-II, de gehanteerde reductie van van de vectordeeltjes gelijk kan zijn aan de titer van het oorspronkelijke inoculum. Dit betekent dat voor dergelijke handelingen de volgende formule gebruikt kan worden om de gewenste reductie van de hoeveelheid vrije lentivirale virusdeeltjes te behalen:

$$(20^W * 200^I * 2^{2,4T}) / V \geq 1$$

Opgemerkt dient te worden dat beide formules slechts een benadering zijn, aangezien de wasstappen afhankelijk zijn van de vloeistof en het volume waarmee gewassen wordt. Daarbij is de inactiverende werking van trypsine of humaan serum ook nog afhankelijk van de concentratie, incubatietijd, incubatietemperatuur en de zuurgraad (12; 31; 35).

Aanvullende voorschriften

De COGEM is van mening dat laboratoriummedewerkers, die werken met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I laboratorium of in ruimten buiten inperking, de algemeen aanvaarde “veilige microbiologische technieken” in acht dienen te nemen. Daarbij stelt de COGEM de volgende aanvullende voorschriften op:

- Het te gebruiken gastheermateriaal moet, indien de aard van het gastheermateriaal testen toelaat, vrij zijn van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel. Bekende lentivirussen zijn HIV-1, HIV-2, *Human T-cell lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1) en HTLV-2 voor mensen, en *Simian immunodeficiency virus* (SIV) voor apen;
- Handelingen met replicatiecompetente virussen of andere vectorsystemen mogen niet gelijktijdig met de lentivirale vector in het veiligheidskabinet plaatsvinden;
- Het is niet toegestaan handelingen met de lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatiecompetente lenti- of retrovirussen of andere vector-systemen in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden;
- Het transport van de getransduceerde zoogdiercellen tussen de verschillende laboratoria vindt plaats in een gesloten, breukvaste, lekdichte houder, die voor het vervoer uitwendig wordt ontsmet;
- Tijdens de handelingen moeten handschoenen worden gedragen;
- De werkoppervlakken en meetopstellingen dienen na de handelingen met de getransduceerde zoogdiercellen gereinigd te worden met adequate detergentia, zoals 70% alcohol of 0.1% SDS, om de betreffende oppervlakten te desinfecteren.

Humane primaire cellen

De COGEM is van mening dat bij het gebruik van primaire humane cellen niet in alle gevallen voldaan kan worden aan het eerste aanvullende voorschrift dat hierboven vermeld staat. In dit voorschrift wordt gesteld dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij moet zijn van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel. In de praktijk komt het geregeld voor dat primaire humane cellen gebruikt worden waarvan de infectiestatus onbekend is. Vaak geeft het onder meer praktische problemen om deze humane primaire cellen op de aanwezigheid van lentivirussen te testen. De COGEM is van mening dat de kans op aanwezigheid van HIV in humane donoren, waarvan de infectiestatus onbekend is, in Nederland relatief klein is (34). Het testen op de aanwezigheid van relevante lentivirussen in primaire humane cellen is volgens de COGEM niet noodzakelijk voor gesloten handelingen buiten inperking en voor werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau omdat werkvoorschriften en training van de medewerkers voldoende bescherming bieden.

Voor open handelingen buiten inperking is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu over het algemeen groter zullen zijn, aangezien in dergelijke ruimten ook niet-ggo-gekwalificeerd personeel handelingen kan uitvoeren. Derhalve acht de COGEM het noodzakelijk dat bij open handelingen buiten inperking al het te gebruiken gastheermateriaal getest dient te zijn op afwezigheid van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel. Hiertoe kan bijvoorbeeld een gevalideerde p24 ELISA of een commerciële test gebruikt worden.

Macrofaagachtige cellen

Tenslotte is de COGEM van mening dat macrofaagachtige zoogdiercellen, waaronder macrofagen, dendritische cellen en folliculaire dendritische cellen, die geïnfecteerd zijn met lentivirale vectoren, niet onder bovengenoemde voorwaarden buiten een ML-II laboratorium gehanteerd kunnen worden en derhalve van geval tot geval beoordeeld dienen te worden. De COGEM is van mening dat mede op grond van literatuurgegevens niet uitgesloten kan worden dat dergelijke cellen nog infectieuze vectordeeltjes kunnen bevatten na de, in het onderhavige advies, beschreven maatregelen zoals een langdurige kweektijd en diverse wasstappen (20; 32; 33).

In het onderhavige advies heeft de COGEM algemene richtlijnen opgesteld voor open en gesloten handelingen met derde generatie lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen op een lager inperkingsniveau dan ML-II. De criteria voor omlaagschaling zijn samengevat in tabel I.

Met inachtneming van de gestelde richtlijnen blijft de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd.

Tabel I. Overzicht criteria voor handelingen met lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige zoogdiercellen.

Werkruimte ¹	Handeling ²	Criteria ³		
		Reductie titer inoculum ⁴	RCL test ⁵	HIV test primaire humane cellen ⁶
ML-I	Gesloten	≥ 1	Nee	Nee
ML-I	Open	≥ 100	Nee	Nee
Geen inperking	Gesloten	≥ 1	Nee	Nee
Geen inperking	Open	≥ 100	Nee	Ja

¹ De werkruimte kan een ML-I laboratorium zijn of een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met ggo's (Geen inperking).

² Bij open handelingen staat het kweekmedium in direct contact met de lucht en bij gesloten handelingen zijn de kweekflesjes/schaaltjes afgesloten waardoor bijvoorbeeld geen aerosolen kunnen vrijkomen.

³ Met inachtneming van de genoemde criteria en aanvullende voorschriften kunnen handelingen met lentiviraal getransduceerde niet-macrofaagachtige zoogdiercellen in de aangegeven werkruimte uitgevoerd worden.

⁴ De reductiefactor van de titer dient tenminste gelijk te zijn aan, of 100 maal hoger te liggen dan, de titer van het oorspronkelijke inoculum.

⁵ Het testen op afwezigheid van RCL-vorming is niet noodzakelijk voor open of gesloten handelingen buiten inperking of op ML-I inperkingsniveau met zoogdiercellen die met derde generatie lentivirale vectoren geïnfecteerd zijn.

⁶ In tegenstelling tot open handelingen buiten inperking, hoeven voor gesloten handelingen buiten inperking en handelingen op ML-I inperkingsniveau primaire humane cellen, waarvan de infectiestatus onbekend is, niet getest te worden op afwezigheid van relevante lentivirussen met tropisme voor de gastheercel.

Referenties

1. 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
2. COGEM advies CGM/020823-05, Lentivirussen
3. COGEM advies CGM/040209-01, Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte
4. COGEM advies CGM/041103-01, Microscopische handelingen met lentivirale vectoren
5. COGEM advies CGM/050309-01, Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen buiten inperking
6. COGEM advies CGM/050330-01, Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen

7. COGEM advies CGM/050427-01, Implementatie van een lentivirus-afgeleid genoverdracht systeem
8. COGEM advies CGM/050527-01, Lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen
9. COGEM advies CGM/050613-01, Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen in een ML-I ruimte gebruikmakend van FACS en fluorescentiemicroscoop
10. COGEM advies CGM/051129-01, Handelingen met lentivirale getransduceerde zoogdiercellen
11. Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, blz. S125-38
12. DePolo, N. J., Reed, J. D., Sheridan, P. L., Townsend, K., Sauter, S. L., Jolly, D. J., and Dubensky, T. W. Jr. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther* **2**, blz. 218-22
13. 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
14. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, blz. 587-97
15. Hall, M. P., Burson, K. K., and Huestis, W. H. (1998). Interactions of a vesicular stomatitis virus G protein fragment with phosphatidylserine: NMR and fluorescence studies. *Biochim Biophys Acta* **1415**, blz. 101-13
16. Hanawa, H., Persons, D. A., and Nienhuis, A. W. (2005). Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J Virol* **79**, blz. 8410-21
17. Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**, blz. 124-31
18. Howett, M. K., Neely, E. B., Christensen, N. D., Wigdahl, B., Krebs, F. C., Malamud, D., Patrick, S. D., Pickel, M. D., Welsh, P. A., Reed, C. A., Ward, M. G., Budgeon, L. R., and Kreider, J. W. (1999). A broad-spectrum microbicide with virucidal activity against sexually transmitted viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, blz. 314-21
19. Kafri, T. (2004). Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol Biol* **246**, blz. 367-90

20. Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., and Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**, blz. 135-44
21. Logan, A. C., Haas, D. L., Kafri, T., and Kohn, D. B. (2004). Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol* **78**, blz. 8421-36
22. Manilla, P., Rebello, T., Afable, C., Lu, X., Slepshkin, V., Humeau, L. M., Schonely, K., Ni, Y., Binder, G. K., Levine, B. L., MacGregor, R. R., June, C. H., and Dropulic, B. (2005). Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum Gene Ther* **16**, blz. 17-25
23. 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
24. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, blz. 263-7
25. Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* **65**, blz. 532-6
26. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
27. Romano, G. (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect* **18**, blz. 128-34
28. 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
29. Sewell, D. L. (1995). Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin Microbiol Rev* **8**, blz. 389-405
30. Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H., and Nienhuis, A. W. (1991). Targeted and highly efficient gene transfer into CD4⁺ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *J Clin Invest* **88**, blz. 1043-7
31. 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
32. Smith, B. A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A. S., Stilianakis, N. I., Keele, B. F.,

- Kerkering, T. M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A. K., Tew, J. G., and Burton, G. F. (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol* **166**, blz. 690-6
33. Smith-Franklin, B. A., Keele, B. F., Tew, J. G., Gartner, S., Szakal, A. K., Estes, J. D., Thacker, T. C., and Burton, G. F. (2002). Follicular dendritic cells and the persistence of HIV infectivity: the role of antibodies and Fcγ receptors. *J Immunol* **168**, blz. 2408-14
34. Stichting HIV Monitoring. Internet: <http://www.hiv-monitoring.nl> (2 december 2005)
35. 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
36. Urdaneta, S., Wigdahl, B., Neely, E. B., Berlin, C. M. Jr, Schengrund, C. L., Lin, H. M., and Howett, M. K. (2005). Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). *Retrovirology* **2**, blz. 28
37. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
38. Verhoeven, E. and Cosset, F. L. (2004). Surface-engineering of lentiviral vectors. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, blz. S83-94
39. Vigna, E. and Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* **2**, blz. 308-16
40. Wilflingseder, D., Banki, Z., Dierich, M. P., and Stoiber, H. (2005). Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol Immunol* **42**, blz. 229-37
41. 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
42. 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