

Aan de Minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 20 november 2007
KENMERK CGM/071120-02
ONDERWERP HIV studies in HIS-muizen

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijziging van de vergunning “Bestudering van het Human Immuundeficiëntie-Virus” van het Academisch medisch centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Human immunodeficiency virus* (HIV) in associatie met gg-muizen. Door modificatie hebben deze gg-muizen zelf geen afweer systeem, maar kunnen een humaan immuunsysteem verkrijgen door toediening van humane stamcellen. De resulterende zogenaamde HIS-muis vormt een interessant diermodel om de replicatie van HIV en de afweerreactie tegen HIV te bestuderen, aangezien de replicatie en verspreiding van HIV afhankelijk is van humane immuuncellen. Bovendien kunnen de stamcellen vóór toediening aan de gg-muis genetisch worden gemodificeerd door middel van lentivirale vectoren. Op deze wijze wil de aanvrager zogenaamde siRNA's tegen bijvoorbeeld HIV in de stamcellen tot expressie brengen en het effect daarvan op de voortgang van een HIV infectie onderzoeken.

Met het oog op de aard van de te bestuderen gg-HIV virussen is de COGEM van mening dat de voorgestelde werkzaamheden in proefdieren uitgevoerd dienen te worden op DM-III niveau. Zij stemt in met de door de aanvrager aangeleverde risico-analyse en de daarin voorgestelde werkvoorschriften om de risico's voor mens en milieu in te perken. Onder deze voorgestelde werkvoorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in dark ink, consisting of a stylized 'Z' followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf
Dr. I. van der Leij

Replicatie van HIV in muizen met een humaan immuunsysteem

COGEM advies CGM/071120-02

Inleiding

De aanvrager wil de replicatie van *Human immunodeficiency virus* (HIV) bestuderen in muizen met een humaan immuunsysteem (HIS-muis). Deze muis heeft zelf geen T, B en NK cellen, maar kan door het inspuiten van humane hematopoietische stamcellen een humaan immuunsysteem opbouwen. Hierdoor vormt de HIS-muis een interessant diermodel om de replicatie van HIV en de immuunrespons die HIV oproept nader te bestuderen. Daarnaast kan men de stamcellen transduceren met behulp van een lentivirale vector, voordat ze aan de muis worden toegediend. Als gevolg van deze modificatie kan men de muizen bijvoorbeeld uitrusten met een populatie van humane bloedcellen die siRNA's tegen HIV tot expressie brengen. Aldus kan een mogelijk effect van siRNA's op replicatie van en immuunrespons tegen HIV bestudeerd worden.

De productie van de HIS muizen, inclusief de eventuele transductie van de stamcellen met een lentivirale vector valt onder een andere vergunning (DGM/SAS IG 03-018) van het AMC. De vervaardiging en productie van de te testen genetisch gemodificeerde gg-HIV varianten zijn reeds vergund onder de huidige vergunning: DGM/SAS IG 02-287 van de aanvrager en vallen derhalve buiten het bestek van dit advies.

Voor de onderhavige wijziging in de vergunning is de COGEM specifiek verzocht te adviseren over de inschaling van handelingen met HIS muizen in associatie met gg-HIV virussen en wildtype HIV-1 isolaten.

HIS-muizen

Door een defect in het recombinase activerende gen 2 (RAG2) en de cytokine receptor gamma keten (γ_c) hebben $RAG2^{-/-}/\gamma_c^{-/-}$ muizen geen cellen als T, B en NK cellen. Hierdoor zijn deze dubbele knock-out muizen immuundeficiënt. In tegenstelling tot andere immuundeficiënte muismodellen hebben de $RAG2^{-/-}/\gamma_c^{-/-}$ muizen als voordeel dat ze geen spontane tumoren ontwikkelen. Bovendien kunnen deze $RAG2^{-/-}/\gamma_c^{-/-}$ muizen worden uitgerust met een humaan adaptief immuunsysteem door het toedienen van humane haematopoietische stamcellen. De resulterende zogenaamde HIS-muizen bevatten goed functionerende humane B, T en dendritische cellen (1, 2).

HIV-1

Het HIV type 1 (HIV-1) behoort tot het genus *Lentivirus* binnen de groep van *Retroviridae* en veroorzaakt het verworven immuundeficiëntie syndroom (AIDS). Het genoom van HIV-1, dat vaak wordt gebruikt als basis voor de ontwikkeling van lentivirale vectoren bevat naast de structurele genen (*gag*, *pol* en *env*) een viertal

accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) en twee regulatoire genen (*tat* en *rev*) (3). Het tropisme van lentivirussen wordt bepaald door het virale envelop-eiwit (Env) dat bindt aan de CD4 receptor. Deze binding is noodzakelijk voor de infectie van onder andere T lymphocyten, macrofagen en monocytten. De infectie van deze immuuncellen leidt tot replicatie en verspreiding van HIV en vormt de basis voor de uiteindelijke aftakeling van het immuunsysteem (4). De transmissie van HIV vindt met name plaats via seksueel contact, via bloed en van moeder op kind. Besmetting door niet-seksuele contacten en blootstelling aan speeksel of urine van geïnfecteerde personen is nagenoeg uitgesloten (6).

Naast wildtype HIV-1 isolaten is de aanvrager van plan gemodificeerde HIV-1 varianten te gebruiken met bijvoorbeeld mutaties of deleties in het virale genoom. Ook doxycycline afhankelijke HIV-1 varianten zijn mogelijkterwijs onderwerp van studie. Volgens de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen worden lentivirussen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 (5). Laboratorium werkzaamheden met vol virulent genetisch gemodificeerde lentivirussen worden derhalve ingeschaald op ML-III of DM-III inperkingsniveau.

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van wildtype HIV-1 en gg-HIV virussen in een muis met een humaan immuunsysteem en wordt er speciaal gekeken naar de replicatie van HIV en de immuunrespons volgend op een ‘challenge’ met bovengenoemde virussen. Er is hier sprake van replicerende HIV-virussen die zich mogelijkterwijs in het milieu zouden kunnen verspreiden.

Om het effect van siRNAs op de progressie van HIV te kunnen bestuderen, geeft de aanvrager aan dat de humane hematopoietische stamcellen getransduceerd kunnen zijn met lentivirale vectoren, bijvoorbeeld vectoren die een siRNA expressiecassette bevatten. Het is uit de aanvraag niet duidelijk welke generatie lentivirale vectoren hiervoor gebruikt wordt en daardoor is de COGEM niet in staat te beoordelen of deze lentivirale vectoren gemobiliseerd kunnen worden na toediening van wildtype HIV-1 of andere replicerende gg-HIV virussen. Gezien de aard van de te bestuderen gg-HIV virussen en de mogelijkheid dat de in de proefdieren aanwezige lentivirale vectoren gemobiliseerd kunnen worden, is de COGEM van mening dat de werk- en inrichtingsvoorschriften behorende bij het DM-III inperkingsniveau noodzakelijk zijn om de veiligheid voor mens en milieu voldoende te waarborgen.

Om het risico op besmetting van de medewerker tijdens de werkzaamheden met de proefdieren te beperken, zal de aanvrager de injectie van proefdieren met gg-HIV uitvoeren in een veiligheidskabinet van klasse II met een opstaande rand. Deze opstaande rand voorkomt dat de muizen uit het veiligheidskabinet kunnen geraken. De aanvrager is

voornemens om de muizen zonder verdoving te injecteren, en stelt dat bij manuele fixatie van het proefdier en zorgvuldige plaatsing van de naald de veiligheid van de medewerker tijdens de injectie voldoende wordt gewaarborgd. De COGEM merkt op dat een complete fixatie van betreffende dieren lastig kan zijn. Bovendien zal bij injectie de naald die van de medewerker af wordt geplaatst logischerwijs in de richting van de eigen hand staan. De COGEM wijst daarom op het belang dat de beschreven injecties uiterst zorgvuldig en door goed getrainde medewerkers worden uitgevoerd.

Voor de huisvesting van al dan niet HIV-geïnfekteerde HIS muizen zal de aanvrager gebruik maken van mini-isolatoren (isocages) waarin onderdruk heerst en die HEPA gefilterd zijn. Tevens is de aanvrager van plan alle handelingen met HIV-geïnfekteerde muizen uit te voeren in een veiligheidskabinet klasse II, waarbij door de medewerker een dubbel paar handschoenen gedragen zal worden. Na de werkzaamheden kan de kooi vanuit het veiligheidskabinet in een zogenaamde onderdompelingstank worden geplaatst, waarin de gehele kooi gedesinfecteerd kan worden zonder dat de muizen daar last van hebben. Gezien de voorgenomen werkvoorschriften en het feit dat de kans op besmetting met HIV via speeksel uiterst klein is (6), acht de COGEM het risico op besmetting van de medewerker en het vrijkomen van gg-HIV in het milieu als gevolg van beschreven werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Conclusie

Concluderend is de COGEM van mening dat de injectie van HIS-muizen met gg-HIV virussen en de handelingen met besmette dieren uitgevoerd dienen te worden op DM-III niveau. Met inachtneming van gestelde inperkingsmaatregelen en de voorgestelde aanvullende werkvoorschriften, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de voorgenomen experimenten verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Mazurier F *et al.* (1999). A novel immunodeficient mouse model -RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants- requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**:533-541
2. Traggiai E *et al.* (2004) Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**:104-107
3. Knipe DM and Howley PM (eds) (2001) *Fields Virology*. vol 2:1971-2042
4. Knipe DM and Howley PM (eds) (2001) *Fields Virology*. vol 2:2043-2094
5. VROM (2004) *Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het besluit genetisch gemodificeerde organismen*.
6. Flint SJ *et al.* (eds.) (2004) *Principles of Virology*. Second edition 633