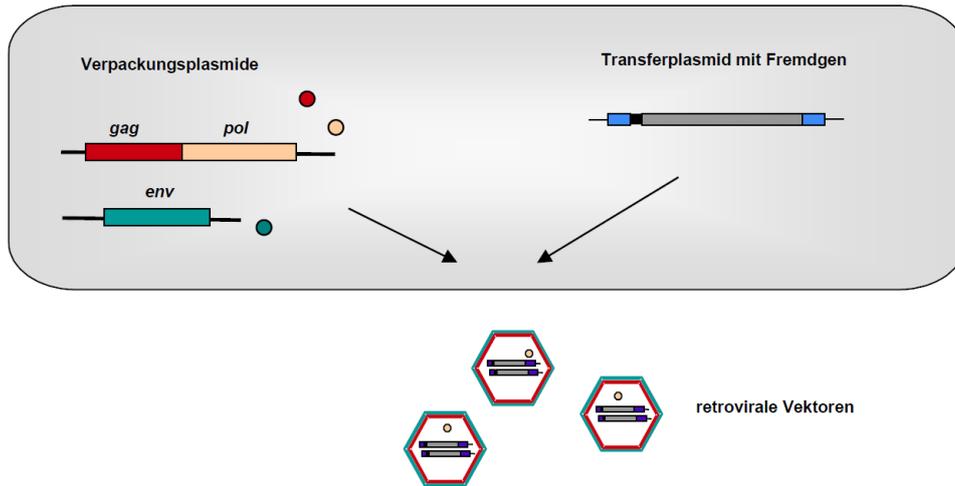


Sicherheitsklassifizierung der HUVEC-GFP-Zellen, gekauft bei der Firma Caltag Medsystems Ltd., nach der ZKBS-Stellungnahme Az. 6790-10-41

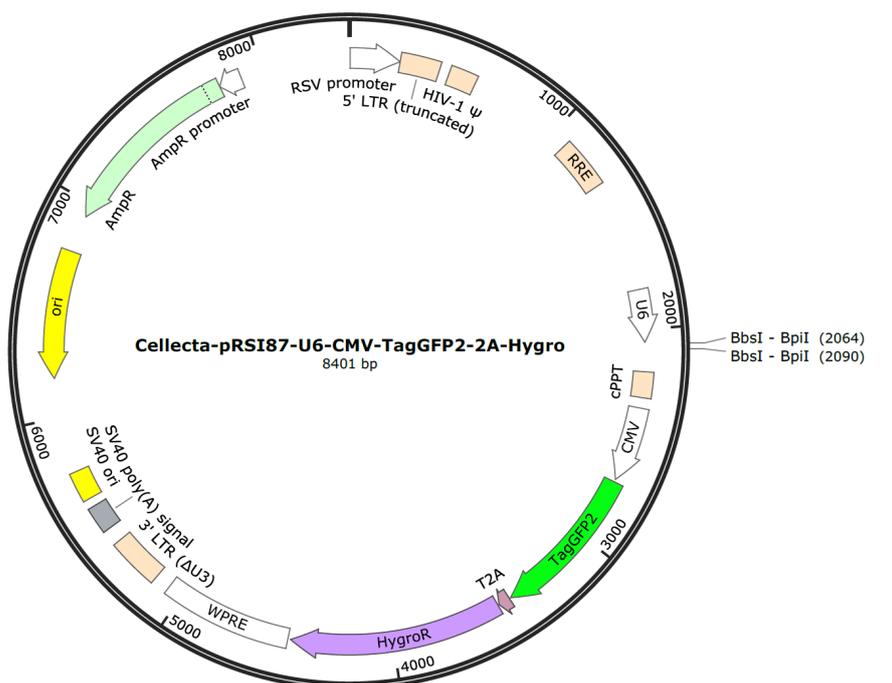
Im Folgenden ist der Prozess zur Herstellung der HUVEC-GFP-Zellen beschrieben. Das Unternehmen produziert replikationsinkompetente lentivirale Vektoren wie folgt: Die Gene für die viralen Proteine sind auf drei Plasmide verteilt: Zwei Verpackungsplasmide und ein Transferplasmid (mit GFP-Gen). Sie werden verwendet, um große Mengen der vollständigen lentiviralen Vektoren in HEK293T-Zellen (siehe Schema unten) zu produzieren, die dann zur Transduktion der HUVECs verwendet werden. Nach der Transduktion werden die verbleibenden Vektoren gewaschen (5 Waschstschritte + ein inaktivierendes Waschen).



In Bezug auf das Hüllprotein-exprimierende Plasmid (siehe unten) verwenden sie ein anderes Virus (VSV-g) als das im Transferplasmid (HIV-1) enthaltene. Dies wird als Pseudotypisierung bezeichnet.

Aus ihren Verpackungsplasmiden (siehe unten) können wir auch ableiten, dass sie Plasmide der 2. oder 3. Generation verwenden.

Lentivirales Transferplasmid:



Verpackungsplasmide

- psPAX2

- Verpackungsplasmid der 2. Generation
- enthält Gag, Pol, Rev und Tat
- kann mit Transferplasmiden der 2. und 3. Generation und Plasmid, das die Hülle exprimiert, verwendet werden

- pMD2.G

- VSV-G-Hülle, die das Plasmid exprimiert

Mit diesen Informationen können wir unsere Zellen nun Schritt für Schritt nach der ZKBS-Richtlinie klassifizieren:

Erzeugung lentiviraler Vektoren:

4.14. Werden ein Transferplasmid und mindestens zwei Verpackungsplasmide der 2., 3. oder neuerer Generation, welche auf einem Lentivirus basieren, in eine Zelllinie der Risikogruppe 1 transfiziert, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 2 zuzuordnen. Das Gen des Hüllproteins und das gag/pol-Gen müssen hierbei auf getrennten Verpackungsplasmiden vorliegen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen.

4.15. Lentivirale Vektoren, die von den unter 4.14. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der Risikogruppe 2 zuzuordnen. Von einer Rekombination zwischen den Plasmiden zu replikationskompetenten Lentiviren ist bei Verwendung von Verpackungssystemen der 2., 3. oder neuerer Generation nicht auszugehen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der Risikogruppe 1 sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen.

Zusammen mit:

Retrovirale Vektoren mit modifizierten Hüllen:

4.22. Wird bei der unter 4.5., 4.6., 4.10., 4.14. oder 4.16. beschriebenen Erzeugung retroviraler Vektoren das retrovirale env-Gen gegen das ggf. modifizierte Gen eines Hüllproteins eines beliebigen Virus (ausgenommen unmodifizierte Proteine eines ecotropen murine γ -Retrovirus) ausgetauscht oder wird dieses Gen zusätzlich exprimiert, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 2 zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen.

4.23. Pseudotypisierte retrovirale Vektoren mit ggf. modifizierten Hüllproteinen fremder Viren, die von den unter 4.22. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der Risikogruppe 2 zuzuordnen, sofern es sich bei den Hüllproteinen nicht ausschließlich um nicht modifizierte Proteine ecotroper muriner γ -Retroviren handelt. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der Risikogruppe 1 sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe 2 zuzuordnen.

Zusammen mit:

Infektion von Zellen mit retroviralen Vektoren:

4.27. **Zellen der Risikogruppe 1**, die mit den unter 4.9., 4.10., 4.12., **4.15.**, 4.16., 4.18., **4.23.** oder 4.25. **beschriebenen retroviralen Vektoren transduziert bzw. infiziert wurden, bei denen nicht von einer Kontamination mit replikationskompetenten Retroviren auszugehen ist, sind der Risikogruppe 1 zuzuordnen**, sofern die Zellen den Replikationsdefekt nicht komplementieren und den Zellen keine infektiösen retroviralen Vektoren mehr anhaften. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe 1 zuzuordnen.