

Bachelorproef

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celtherapie.

GMP-unit CellGenTherapies
C. Heymanslaan 10, 9000 Gent
Hanne Verschuere, Scientist/Project manager

Tiebe Kestelyn

EhB School of Health & Environment

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2025-2026

Bachelorproef

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celtherapie.

GMP-unit CellGenTherapies
C. Heymanslaan 10, 9000 Gent
Hanne Verschuere, Scientist/Project manager

Tiebe Kestelyn

EhB School of Health & Environment

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2025-2026

1. Voorwoord

Mijn bachelorproef gaat over de productie en optimalisatie van lentivirale partikels voor CD70-gerichte CAR-T-cellen. Dit eindwerk is een combinatie van literatuurstudie en praktisch laboratoriumwerk. Met de resultaten van de experimenten hoop ik bij te dragen aan het optimaliseren van het productieproces van lentivirale vectoren.

Ik wil Hanne Verschuere uitdrukkelijk bedanken. Zonder haar begeleiding, expertise en ondersteuning was dit project niet mogelijk geweest. Haar geduld, duidelijke uitleg en praktische ondersteuning speelden een belangrijke rol bij zowel de uitvoering als de interpretatie van de resultaten.

Verder bedank ik graag het volledige team van de GMP-unit CellGENtherapie voor de mooie kansen die ik kreeg doorheen mijn stage en de fijne, leerzame omgeving waar ik terechtkwam.

Tiebe Kestelyn.

2. Inhoudstafel

Inhoud

1.	Voorwoord	2
2.	Inhoudstafel	3
3.	Afkortingenlijst	5
4.	Abstract	6
5.	Inleiding	8
6.	Theoretisch deel – Literatuuronderzoek	9
6.1.	CAR-T-celtherapie	9
6.1.1.	T-cellen	9
6.2.	Lentivirale partikels	10
6.2.1.	HIV-gebaseerde lentivirale partikels	10
6.3.	Productie van lentivirale partikels	11
6.4.	Plasmiden	12
6.4.1.	CAR-plasmide	12
6.4.2.	Gag/Pol-plasmide	12
6.4.3.	VSV-G-plasmide	12
6.4.4.	REV-plasmide	12
6.5.	CD70	13
7.	Experimenten	14
7.1.	Materialen en Methoden	14
7.1.1.	Celcultuur	14
7.1.2.	Productie van plasmiden	15
7.1.3.	Productie van lentivirale partikels	15
7.1.4.	Fysieke titer bepaling	17
7.1.5.	Optimalisatie benzonasebehandeling	17
7.1.6.	Steriele filtratie	19
7.2.	Resultaten & Discussie	20
7.2.1.	Plasmiden	20
7.2.2.	Lentivirale partikel productie	20
7.2.2.1.	Productie van lentivirale partikels	20
7.2.2.2.	Optimalisatie ELISA	21
7.2.2.3.	Bepaling van fysieke titer van virusconditie	23
7.2.3.	Benzonase behandeling	24
7.2.4.	Steriele filtratie	26
8.	Besluit	27
9.	Bronnen	28

10.	Bijlage	30
10.1.	<i>Bijlage 1 - Plasmid plus Midiprep kit.</i>	30
10.2.	Bijlage 2 - resDetect™ HIV-1 p24 Antigen ELISA	30
10.3.	Bijlage 3 – Resultaten Fysieke titer bepaling.	31
10.4.	Bijlage 4 – Resultaten steriele filtratie.....	32
10.4.1.	ELISA.....	32
10.5.	Bijlage 5 - Logboek	35
10.6.	Bijlage 6 – Prestatieformulier	41

3. Afkortingenlijst

AGE	Agarosegelelektroforese	LTR	Long terminal Repeat
ALL	Acute lymfatische leukemie	LVP's	Lentivirale partikels
ALL	Acute lymfatische leukemie	MCB	Master cell bank
B-cel	B-lymfocyt	MPES	Modified Polyethersulfone
Bp	Base pair	NEB	New England Biolabs
CAR	Chimere Antigeen Receptor	O/N	Over Night
CD19	Cluster of Differentiation 19	OD	Optische densiteit
CD4+	CD4-positieve T-helpercel	PBS	Phosphaat buffered saline
CD70	Cluster of Differentiation 70	pEIpro	Polyethyleenimine
CD8+	CD8-positieve cytotoxische T-cel	PES	Polyethersulfone
CO2	Koolstofdioxide	PPT	Polypurine tract
cPPT	Central polypurine tract	PVDF	Polyvinylidene fluoride
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	QP	Qualified Person
DNA	Desoxyribonucleïnezuur	Rcf	Relative centrifugal force
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	RNA	Ribonucleïnezuur
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay	RPM	Rotaties per minuut
FDA	Food and drug administration	RRE	Rev Response element
g	Relatieve centrifugale kracht	SFM	Serum Free Medium
GMP	Good Manufacturing Practice	TAE	Tris-Acetaat-EDTA
GOI	Gene of interest	T-cel	T-lymfocyt
HEK293SF-3F6	Human Embryonic Kidney 293 cells	TCR	T-cell receptor
HIV	Hummaan Immunodeficiëntievirus	TNF	Tumor Necrosis Factor
HRP	Horseradisch Peroxidase	UV/VIS	Ultraviolet/Visible spectrofotometrie
Kb	Kilobase	UZ	Universitair Ziekenhuis
KT	Kamertemperatuur	VF	Verdunningsfactor
LB	Luria-Bertani medium	VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus Glycoproteïne G

4. Abstract

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-celtherapie

Tiebe Kestelyn.

CellGENtherapie, UZ Gent.

CAR-T-celtherapie maakt gebruik van autologe T-cellen die genetisch worden gemodificeerd om tumorcellen te herkennen. Voor de productie van CD70-gerichte CAR-T-cellen worden lentivirale partikels (LVP's) gebruikt als vector voor de genoverdracht.

Het doel van deze bachelorproef was om het productieproces voor LVP's op te zetten. Hiervoor werden LVP's geproduceerd door transfectie van HEK293SF-3F6-cellen met vier plasmiden (CAR, Gag/Pol, VSV-G en REV) en geoogst na 48 uur onder verschillende condities. De fysieke titer werd bepaald met een HIV-1 p24-ELISA en omgerekend naar het aantal LVP's. Een tweede doelstelling was om de benzonasebehandeling te optimaliseren door verschillende incubatieomstandigheden te testen. Het effect van deze benzonase behandeling op steriele filtratie bij drie verschillende filtertypen (PES, MPES en celluloseacetaat) werd onderzocht.

Het productieproces van de LVP's is succesvol verlopen; de fysieke titer varieerde tussen $1,47 \times 10^9$ en $2,62 \times 10^9$ LVP's. De benzonasebehandeling was bij elke incubatieomstandigheid doeltreffend. Hieruit kan worden geconcludeerd dat 2 uur bij 4 °C de meest ideale incubatieomstandigheid is, met zo min mogelijk verlies van LVP's. Bij steriele filtratie gaf de PES-filter de hoogste recovery (54,42%, zonder benzonase). Celluloseacetaat liet zo goed als geen LVP's door. De benzonasebehandeling had steeds een negatieve invloed op de steriele filtratie.

Kernwoorden: Lentivirale Partikels, CAR-T, CD70, HEK293SF-3F6-cellen, ELISA.

Use of Lentiviral Particles in CAR-T Cell Therapy

Tiebe Kestelyn.

CellGENtherapie, UZ Gent.

CAR-T cell therapy employs autologous T cells that are genetically modified to recognize tumor cells. For the production of CD70-targeted CAR-T cells, lentiviral particles (LVPs) are used as vectors for gene transfer. The aim of this bachelor's thesis was to establish a production process for LVPs. LVPs were produced by transfecting HEK293SF-3F6 cells with four plasmids (CAR, Gag/Pol, VSV-G and REV) and were harvested after 48 hours under various conditions. The physical titer was determined using an HIV-1 p24 ELISA and converted to the number of LVPs. A secondary objective was to optimize benzonase treatment by testing different incubation conditions. The effect of a benzonase treatment on sterile filtration using three different filter types (PES, MPES and cellulose acetate) was also investigated.

The LVP production process was successful; physical titers ranged between 1.47×10^9 and 2.62×10^9 LVPs. Benzonase treatment was effective under all tested incubation conditions, and 2 hours at 4 °C was identified as the most favorable condition, minimizing LVP loss. During sterile filtration, the PES filter yielded the highest recovery (54.42%, without benzonase). Cellulose acetate allowed virtually no LVP passage. Benzonase treatment consistently had a negative impact on sterile filtration recovery.

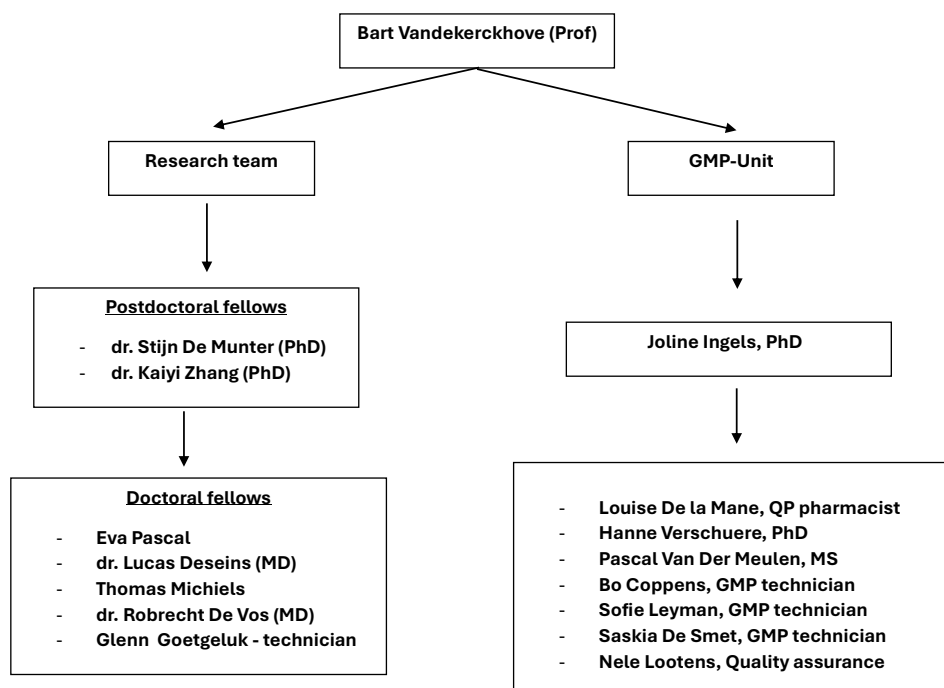
Keywords: Lentiviral particles, CAR-T, CD70, HEK293SF-3F6 cells, ELISA.

5. Inleiding

CAR-T-celtherapie is een vorm van immuuntherapie waarbij de T-cellen van een patiënt genetisch worden gemodificeerd om kankercellen gericht te kunnen herkennen en vernietigen. In dit onderzoek wordt een CAR-T-celtherapie ontwikkeld tegen CD70. Dit is een type-2-transmembraan-glycoproteïne dat op verschillende kankers, zoals myeloïde leukemie en ccRCC, wordt geëxprimeerd. Dit maakt CD70 een goed antigeen voor het bestrijden van verschillende soorten kankers.

Voor de productie van CD70-gerichte CAR-T-cellen kunnen lentivirale partikels worden gebruikt als vector voor de overdracht van het CAR-gen, geproduceerd in HEK293SF-3F6-suspensiecellen door transfectie met vier verschillende plasmiden. Om een veilige genoverdracht te garanderen, is de kwaliteit en zuiverheid van de lentivirale partikels belangrijk. Hierdoor is het van groot belang om de virusproductie te optimaliseren, de benzonasebehandeling te optimaliseren zodat er geen vrije nucleïnezuren meer aanwezig zijn in het eindproduct, en de steriele filtratie te optimaliseren om zo min mogelijk verlies te hebben aan het einde van het productieproces en een steriel product te kunnen leveren.

Hieruit kon de volgende onderzoeksvraag worden opgesteld: wat is het effect van de benzonasebehandeling en steriele filtratie op de fysieke titer van lentivirale vectoren?



Figuur 1. Schematische voorstelling van de onderzoeksgroep van Bart Vandekerckhove, met een overzicht van de onderzoeksteams en de GMP-unit.

6. Theoretisch deel – Literatuuronderzoek

6.1. CAR-T-celtherapie

CAR-T-celtherapie is een nieuwe immuuntherapie waarbij T-cellen van een patiënt genetisch worden gemodificeerd. Door integratie van een CAR-gen in het genoom van autologe T-cellen zal een chimere antigeenreceptor (CAR) op het celoppervlak tot uiting komen; deze aangepaste T-cellen worden CAR-T-cellen genoemd. Deze CAR zorgt ervoor dat T-cellen een specifieke epitoop op de kankercellen herkennen, waardoor de CAR-T-cellen in staat zijn de kankercellen te vernietigen (CAR-T-celtherapie | UZ Gent, z.d.).

De therapie bestaat uit verschillende stappen. Allereerst worden de T-cellen van de patiënt afgenomen en geïsoleerd via aferese. Hierna worden de CAR-T-cellen geproduceerd; deze productie neemt ongeveer vier weken in beslag. Na de productie van de CAR-T-cellen worden deze via een centrale veneuze katheter aan de patiënt toegediend. Deze therapie wordt daarom autogeen of patiënt-eigen genoemd (CAR-T-celtherapie | UZ Gent, z.d.).

De eerste CAR-T-celtherapie die door de Food and Drug Administration (FDA) werd goedgekeurd, was tisagenlecleucel (Kymriah) op 30 augustus 2017, voor de behandeling van acute lymfatische leukemie (ALL). Dit werd geproduceerd door Novartis Pharmaceuticals. Later werden nog drie CD19-specifieke CAR-T-celtherapieën door de FDA goedgekeurd voor de behandeling van B-celmaligniteiten (Mitra et al., 2023).

6.1.1. T-cellen

T-cellen zijn immuuncellen die een cruciale rol spelen in het adaptieve immuunsysteem van het menselijk lichaam. Ze ontstaan uit hematopoëtische stamcellen in het beenmerg en migreren naar de thymus om te rijpen. De positieve selectie zorgt ervoor dat T-cellen lichaamseigen major histocompatibility complex (MHC)-moleculen kunnen herkennen. De negatieve selectie zorgt ervoor dat T-cellen met een hoge affiniteit voor lichaamseigen antigenen worden geëlimineerd, om zo auto-immuniteit te voorkomen (Pu et al., 2025).

Na de selectie differentiëren thymocyten naar positieve cellen die CD4 (helper-T-cel) of CD8 (cytotoxische T-cel) tot expressie zullen brengen. Vervolgens zullen ze de thymus verlaten en rondcirculeren in het lichaam. Met hun T-celreceptor (TCR) zullen ze lichaamsvreemde antigenen herkennen die op MHC-moleculen worden gepresenteerd, deze interactie leidt tot activatie van de T-cellen. Geactiveerde T-cellen kunnen vervolgens pathogenen waarvan ze het antigen herkennen of geïnfecteerde lichaamseigen cellen aanvallen en vernietigen (Pu et al., 2025).

6.2. Lentivirale partikels

Lentivirale partikels zijn vectoren die worden afgeleid van lentivirussen (zoals HIV). Deze virussen zijn aangepast om genetisch materiaal bij een doelcel binnen te brengen, te integreren in het genomisch DNA en te zorgen voor een stabiele genexpressie. Dit worden genetisch gemodificeerde virussen genoemd, waarbij de vector kan worden verpakt in een heterologe virale envelop. Dit proces wordt pseudotypering genoemd (Hu et al., 2019).

Hiernaast zijn lentivirussen in staat om niet-delende cellen te infecteren, wat een voordeel is ten opzichte van retrovirale virussen die enkel delende cellen kunnen infecteren (Jargalsaikhan et al., 2025).

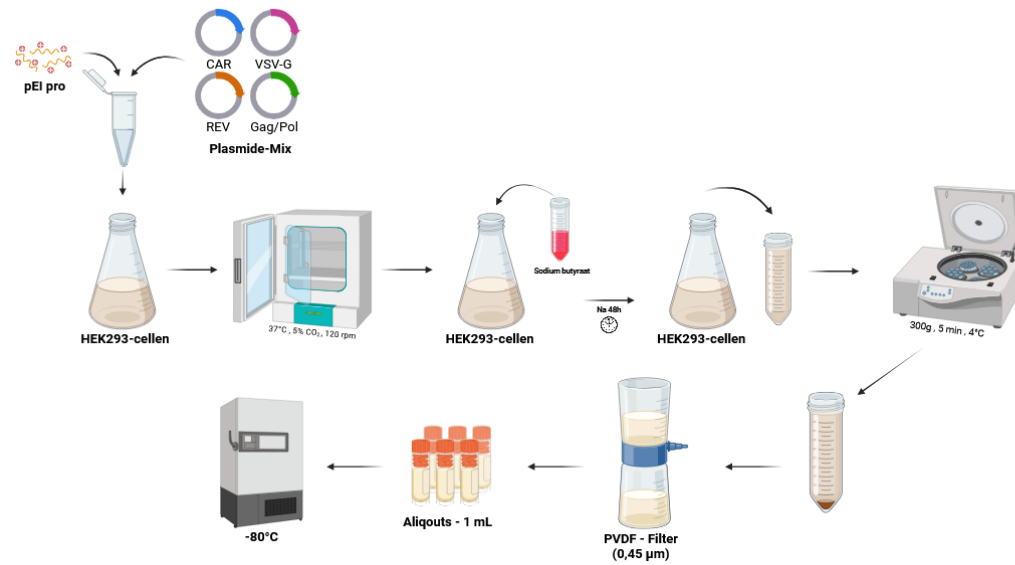
De lentivirale vector zal binden aan het celoppervlak van cellen (in dit geval de T-cellen), waarna ze het genetische materiaal naar binnen zullen brengen. In de cel wordt vervolgens het virale RNA, met behulp van een reverse transcriptase, omgezet naar DNA. Dit zal dan integreren in het gastheergenoom. Daar vindt de transcriptie en translatie plaats, waardoor de CAR tot expressie zal komen op het celoppervlak (Jargalsaikhan et al., 2025).

6.2.1. HIV-gebaseerde lentivirale partikels

Voor deze reeks experimenten wordt gebruikgemaakt van 3e generatie HIV-gebaseerde lentivirale vectoren. Deze vectoren zijn afgeleid van het Humaan Immunodeficiëntievirus type 1 (HIV-1), waarvan de replicatiegenen werden vervangen. In HIV-gebaseerde lentivirale vectoren zijn de eiwitcoderende genen die specifiek zijn voor de HIV-besmetting verwijderd, waardoor er geen virusreplicatie meer kan optreden, dit maakt de vector veilig voor gebruik in humane toepassingen. De lentivirale partikel bevat enkel de cis-acting regulerende elementen die nodig zijn voor de virale levenscyclus van de vector (dit zijn onder andere het R/U5- naar het Ψ -domein, het centrale polypurinekanaal (cPPT), het RRE en de 3'LTR). Hiernaast kunnen andere regulerende elementen worden opgenomen om de expressie te verbeteren of te vergroten (Hu et al., 2019; Jargalsaikhan et al., 2025).

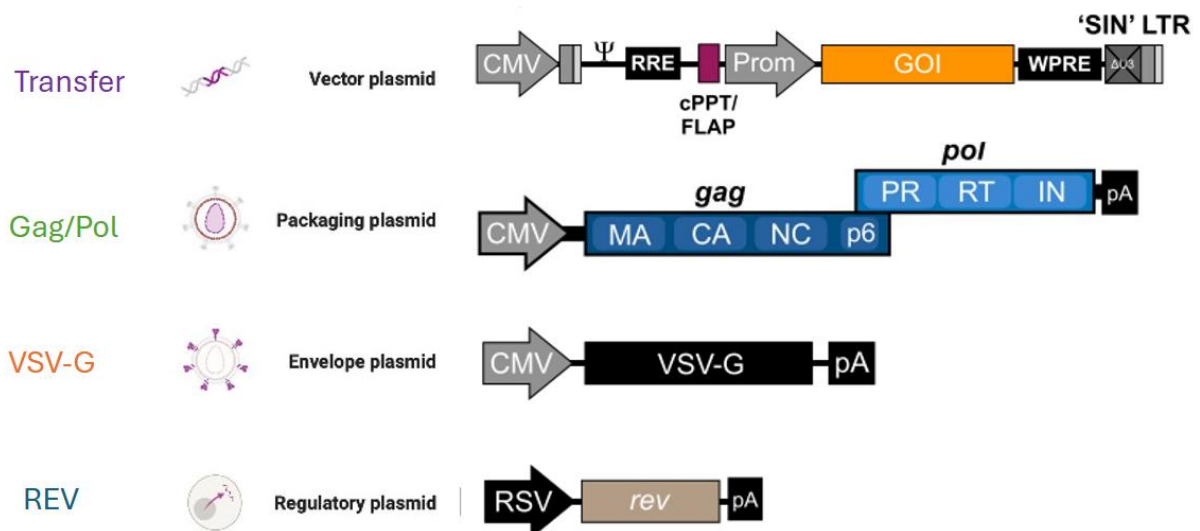
Daarnaast werd ook de eiwitmantel rondom het virus aangepast. Door pseudotypering kan de vector worden verpakt in een andere gewenste enveloppe. Dit aangezien het HIV-virus een beperkt tropisme heeft en voornamelijk CD4+ cellen, zoals macrofagen en helper-T-cellen, kan infecteren. De eigenschap om de virusenvelop aan te passen naar bijna elke andere gewenste heterologe virusenveloppe zorgt ervoor dat een breed bereik aan cellen in het lichaam kan worden geïnfecteerd voor de genoverdracht. Voor de productie van CAR-T-cellen wordt gebruikgemaakt van het VSV-G-envelop (Hu et al., 2019; Jargalsaikhan et al., 2025).

6.3. Productie van lentivirale partikels



Figuur 2. Schematische weergave van het productieproces van lentivirale partikels. De volledige experimentele procedure wordt beschreven in sectie 7.1.3. Productie van lentivirale partikels.

Het productieproces van lentivirale partikels (figuur 2) houdt verscheidene stappen in. Er wordt gebruikgemaakt van het derde generatie lentivirussysteem, dit bestaat uit vier plasmiden (figuur 3) die in HEK293SF-3F6-cellen worden ingebracht met behulp van transfectie. Dit gebeurt met behulp van PEIpro, een transfectiereagens. Elk plasmide heeft zijn eigen functie en zorgt ervoor dat een bepaald onderdeel van het lentivirus tot expressie komt (Hu et al., 2019).



Figuur 3. Overzicht van de plasmiden die gebruikt worden voor de productie van Lentivirale partikels, aangepast uit Wolff & Mikkelsen, 2022.

Na de transfectie wordt sodiumbutyrataat toegevoegd. Dit is een histondeacetylase-inhibitor die de expressie van recombinante eiwitten verhoogt door histon-hyperacetylatie, wat de virusopbrengst verhoogt (Najafi et al., 2024). Na centrifugatie zal het supernatant worden gefiltreerd met behulp van een PVDF-filter (0,45 µm) om alle grote contaminanten te verwijderen.

6.4. Plasmiden

6.4.1. CAR-plasmide

Het transferplasmide zal het therapeutische gen bevatten (figuur 3). Dit is het genetische materiaal dat in de doelcellen zal worden ingebracht om de CAR tot expressie te brengen. In dit geval is dit een CAR gericht tegen het antigeen CD70. Hiernaast bevat het ook het virale RNA-verpakkingssignaal, wat essentieel is voor de selectieve verpakking van het transgeen RNA in de LVP's door interactie met het virale Gag, alsook de sequenties die nodig zijn voor reverse transcriptie (Arduini et al., 2025).

6.4.2. Gag/Pol-plasmide

Het Gag/Pol-plasmide behoort samen met het envelopplasmide tot de basisgenen die nodig zijn voor de productie van lentivirale vectoren. De Pol-genen coderen voor de virale protease, reverse transcriptase en integrase. De virale protease knipt het Gag-Pol zodat de virale eiwitten vrijkomen. Het reverse transcriptase zet het RNA om in DNA en het integrase regelt de integratie van het DNA in het gastheergenoom in de kern (Milone & O'Doherty, 2018; Arduini et al., 2025; Arrasate et al., 2025).

De gag-genen sturen de assemblage van de virusdeeltjes aan en coderen voor structurele eiwitten zoals het matrixproteïne (p17), capsid (p24), nucleocapsid (p7) en kleinere andere proteïnen zoals p6, p1 en p2 (Milone & O'Doherty, 2018; Arduini et al., 2025; Arrasate et al., 2025).

6.4.3. VSV-G-plasmide

Het VSV-G-plasmide zal coderen voor de envelop. Hiernaast geeft het VSV-G-eiwit een goede stabiliteit aan de vector, wat ervoor zorgt dat concentraties met een hoge titer mogelijk worden. Door het brede celtropisme gebeurt de genoverdracht door de vector niet alleen in de doelcellen (in dit geval T-cellen) (Hu et al., 2019).

6.4.4. REV-plasmide

Het REV-plasmide codeert voor het REV, dit staat voor regulator of expression of virion proteins. Dit staat in voor het controleren van de splicing van de virale eiwitten en het nucleair exporteren hiervan (Arrasate et al., 2025).

6.5. CD70

CD70 is het doelantigeen van de CAR die in dit onderzoek wordt ontwikkeld. CD70 is lid van de TNF-familie en functioneert als een type-2-transmembraan-glycoproteïne (Wu et al., 2025).

CD70 wordt op verschillende kankers geëxprimeerd, zoals alvleesklierkanker, myeloïde leukemie, ccRCC, ... Dit maakt het antigeen ideaal voor het bestrijden van verschillende soorten kankers. Een nadeel van dit antigeen is dat het, naast deze kankers, ook tot expressie komt op geactiveerde immuuncellen zoals T-cellen, B-cellen en dendritische cellen. Hierdoor is het belangrijk om een knock-out te veroorzaken met behulp van CRISPR-Cas, om ervoor te zorgen dat CD70 niet tot expressie komt op CAR-T-cellen en de CAR de eigen immuuncellen niet begint af te breken (De Munter et al., 2024).

7. Experimenten

7.1. Materialen en Methoden

7.1.1. Celcultuur

Opstarten celcultuur

HEK293SF-3F6-suspensiecellen werden ontdooid. De cellen uit de cryovial werden overgebracht naar een 15 mL Falcon-tube en aangevuld tot 10 mL met voorverwarmd medium (37 °C): HyClone™ SFM4Transfx-293 liquid medium with poloxamer 188, sodium bicarbonate, without L-glutamine, phenol red, HEPES (Cytiva, Cat. nr. SH30860.02), aangevuld met HyClone® L-Glutamine, 4 mM Solution (Cytiva, Cat. nr. 87-124H).

Na centrifugeren (5 min, 300 g, KT) werd het supernatant verwijderd en de pellet geresuspendeerd in 20 mL vers voorverwarmd medium. De suspensie werd overgebracht naar een gelabelde 125 mL pre-incubated shake flask. De cultuur werd vervolgens geïncubeerd bij 37 °C, 5 % CO₂ en 120 rpm.

Cellen tellen

Een kleine hoeveelheid celsuspensie werd gemengd met trypan blue stain (1:1) (Thermo Fisher, Cat. nr. T10282). Van dit mengsel werd 15 µL geladen in de Cell Counting Chamber Slide (Thermo Fisher, Cat. nr. C10228). Het totale aantal cellen en de viabiliteit werden bepaald met de Countess™ 3 Automated Cell Counter (Thermo Fisher, Cat. nr. AMQAX2000).

Bij samenklontering van cellen kan Accumax™ Cell Counting Solution in DPBS Sterile-filtered Cell Culture Tested (Merck, Cat. nr. SCR006) (1:1) worden gebruikt.

Medium verversen

Wanneer de cellen onvoldoende gegroeid zijn (densiteit minder dan 1.000.000 cellen/mL), werd het medium verversd. De volledige inhoud van de flask werd overgebracht in een 15 mL Falcon-tube en gecentrifugeerd (300 g, 5 min, KT). Het supernatant werd verwijderd, waarbij 10 mL medium op de pellet achterbleef. Vervolgens werd 10 mL vers medium toegevoegd en werd de pellet geresuspendeerd en overgebracht naar een suspensiecultuurfles. Dit werd geïncubeerd bij 37 °C, 5 % CO₂ en 120 rpm.

Cellen splitsen

Bij voldoende celgroei werden de cellen gesplitst naar een densiteit van 4×10^5 cellen/mL. Na een celtelling werd het volume van de huidige cultuur berekend om de gewenste densiteit te bekomen. De cultuur werd vervolgens aangevuld met vers voorverwarmd medium (37 °C) tot het gewenste eindvolume en geïncubeerd bij 37 °C, 5 % CO₂ en 120 rpm.

7.1.2. Productie van plasmiden

Principe

Vanuit de master cell bank (MCB) van de plasmiden CAR, Gag/Pol, VSV-G en REV worden bacteriën op LB-agarplaten met kanamycine uitgeplaat om individuele kolonies te kunnen isoleren. De geselecteerde kolonie wordt vervolgens opgekweekt tot een startcultuur in vloeibaar LB-soytone-medium met kanamycine. Deze cultuur wordt verder opgeschaald tot een expansiecultuur om voldoende bacteriën te hebben voor de plasmide-isolatie. Het plasmide-DNA wordt opgezuiverd met behulp van een Midiprep, waarna de concentratie spectrofotometrisch wordt bepaald.

Methode

Master cell bank uitplaten

Een aliquot van de master cell bank (MCB) van de plasmiden CAR, Gag/Pol, VSV-G en REV werd ontdooid. Van elk plasmide werd een 10^9 -verdunding gemaakt in LB-soytone-medium (Teknova, Cat. nr. L8950). Hiervan werd 100 μ L uitgeplaat op een LB-agar animal-free soytone + kanamycine 50 μ g/mL (Teknova, Cat. nr. L1096). De platen werden omgekeerd geïncubeerd bij 30 °C gedurende 24 uur.

Startcultuur

Van elke plaat werd één single kolonie geselecteerd en geïnoculeerd in 5 mL LB-soytone-medium met kanamycine 100 $\times$ (Thermo Fisher, Cat. nr. 15160-047) (50 μ g/mL). De culturen werden geïncubeerd gedurende 16–18 uur bij 30 °C en 250 rpm. Na incubatie werden de culturen bewaard bij 4 °C tot de expansiecultuur werd ingezet.

Expansiecultuur

Van elk plasmide werd 120 μ L van de startcultuur geïnoculeerd in 120 mL LB-soytone-medium met 50 μ g/mL kanamycine in een 500 mL Erlenmeyer (1/1000-verdunding). De culturen werden 16 uur geïncubeerd bij 30 °C en 250 rpm.

Midiprep

De Midiprep werd uitgevoerd met de Plasmid Plus Midiprep Kit (Qiagen, Cat. nr. 12943), zie bijlage 1. Vervolgens werden de plasmiden steriel gefiltreerd met behulp van een Millex™-MP Membrane Filter, 0,22 μ m pore size (Millipore, Cat. nr. SLMP025SS). Hierna werd de plasmideconcentratie bepaald met een Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Cat. nr. A51119700DPC).

7.1.3. Productie van lentivirale partikels

Principe

HEK293SF-3F6-cellen worden getransfecteerd met een plasmidemix die bestaat uit het CAR-, REV-, VSV-G- en Gag/Pol-plasmide. De transfectie gebeurt met behulp van PEIpro; dit is een polymeer dat complexen vormt met het plasmide-DNA, waardoor dit makkelijker

wordt opgenomen over het fosfolipide membraan en binnengeraakt in de cellen. Na translatie van de plasmiden in de HEK cellen, worden lentivirale partikels uitgescheiden in het supernatant, dat vervolgens wordt geoogst en gefilterd.

Methode

HEK293SF-3F6-celcultuur

Een dag voor transfectie werden HEK293SF-3F6-suspensiecellen geteld en verdund tot $7,5 \times 10^5$ cellen/mL in voorverwarmd medium (37 °C). Een dag later werden de cellen opnieuw geteld en overgebracht naar 50 mL Falcon-tubes. De suspensie werd gecentrifugeerd (300 g, 5 min, 4 °C). Het supernatant werd verwijderd en de pellets werden geresuspendeerd in vers medium om een finale celdensiteit van 1×10^6 cellen/mL te bekomen, verschillende groottes van cultuurvolumes werden ingezet (20 mL, 100 mL, 200 mL en 500 mL).

Transfectie

Transfectie gebeurde met PEIpro® Transfection Reagent (Sartorius, Cat. nr. 101000033) in een DNA:reagens-verhouding van 1:2. Per mL celcultuur werd 0,4 µg plasmide-DNA toegevoegd. De plasmiden CAR, REV, VSV-G en Gag/Pol werden in een verhouding van respectievelijk 0,5 : 0,10 : 0,15 : 0,25 gemengd.

Voor elke conditie werd een DNA-mix bereid in Gibco™ PBS, pH 7.4 (Fisher Scientific, Cat. nr. 10010015) en werd verdund PEIpro (1 mg/mL) toegevoegd. Het mengsel werd 10 min geïncubeerd op kamertemperatuur en toegevoegd aan de celculturen.

Tabel 1. Overzicht van het experimentele opzet per conditie.

Conditie	Volume (mL)	Plasmide DNA: PEIpro (mL)	Grootte Cultuurfles (mL)
A&B	20	1	125
C	100	5	500
D	200	10	500
E	500	25	2000
F	NVT	NVT	NVT

Na toevoeging werden de culturen geïncubeerd bij 37 °C, 5 % CO₂ en 120 rpm.

Sodium Butyraat

Na 24 uur werd sodium butyraat, 98% (Sigma-Aldrich, Cat. nr. 303410-5G) toegevoegd aan alle transfectiecondities, zodat een finale concentratie van 7 mM werd bekomen, uitgezonderd de niet-getransfecteerde controle.

Oogsten van lentivirale partikels

48 uur na transfectie werden de culturen gecentrifugeerd (300 g, 5 min, 4 °C). Het supernatant werd gefilterd over een 0,45 µm PVDF-membraan (Steriflip 50 mL Sterile

Vacuum Filtration System, Millipore-Sigma, Cat. nr. SE1M003M00). Het gefilterde supernatant werd vervolgens verdeeld in aliquots van 1 mL en ingevroren bij -80°C .

7.1.4. Fysieke titer bepaling

Principe



Figuur 4. Schematische voorstelling van de ELISA-procedure voor de bepaling van de fysieke titer.

De fysieke titer van lentivirale partikels wordt bepaald met een sandwich-ELISA tegen het HIV-1 p24-capside. ELISA staat voor enzyme-linked immunosorbent assay. Het primair gecoate antilichaam in de wells bindt de p24 die vrijkomt bij het lyseren van de lentivirale partikels. Het biotine-gelabelde antilichaam bindt vervolgens aan het gebonden p24. Het streptavidine-HRP koppelt aan het biotinegedeelte. Door het toevoegen van het substraat ontstaat een kleurreactie (figuur 4). Deze OD-waarde is evenredig met de p24-concentratie.

Methode

De fysieke titer van de lentivirale partikels werd bepaald met behulp van een HIV-1 p24-ELISA (resDetect™ HIV-1 p24 Antigen ELISA Kit, Acro Biosystems, Cat. nr. RES-A050), zie bijlage 2. Het experiment werd uitgevoerd volgens het protocol van de fabrikant. De optische densiteit werd gemeten bij 450 nm met de Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Cat. nr. A51119700DPC), en de p24-concentratie werd berekend op basis van een standaardcurve.

De concentratie van het p24-eiwit werd berekend vanuit de standaardvergelijking van de standaardcurve en kon worden omgerekend naar het aantal virale partikels met behulp van de constante: $1\text{ ng p24} = 1,25 \times 10^7\text{ LVP's}$.

7.1.5. Optimalisatie benzonasebehandeling

Principe

Benzonase is een endonuclease dat zowel enkelstrengige als dubbelstrengige DNA- en RNA-fragmenten afbreekt. Het enzym heeft Mg^{2+} -ionen nodig als cofactor en een licht basische omgeving (pH 8,0). Met deze behandeling worden alle vrije nucleïnezuren verwijderd. De reactie wordt gestopt met EDTA, aangezien dit de Mg^{2+} bindt en zo de enzymactiviteit inactieveert.

De agarosegelelektroforese scheidt nucleïnezuren op basis van hun grootte. In een elektrisch veld migreren kleine negatief geladen DNA-fragmenten sneller dan grotere fragmenten richting de positieve elektrode, waardoor een scheiding op basis van grootte ontstaat.

Methode

Voorbereiding van reagentia

Voor de benzonasebehandeling werd een 10× benzonasebuffer bereid, bestaande uit 500 mM Tris-HCl en 20 mM Mg²⁺. De pH werd ingesteld op 8,0. Daarnaast werd ethyleendiaminetetra-azijnzuur dinatriumzoutoplossing (Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt solution; Sigma-Aldrich, Cat. nr. E7889-1L) verdund tot 12 mM en gebruikt als 6× stopoplossing. De Benzonase® Purity Grade II (>90%) for Biotechnology, 100 KU (Sigma-Aldrich, Cat. nr. 1.01654.0001), werd verdund om een werkoplossing van 1000 U/mL te verkrijgen.

Voor elke conditie werd 45 µL virusstaal ontdooid, waarna 5 µL 10× benzonasebuffer werd toegevoegd. Vervolgens werd benzonase toegevoegd tot een eindconcentratie van 50 U/mL. De stalen werden geïncubeerd onder verschillende tijd- en temperatuurcondities.

Tabel 2. Overzicht van de temperatuur- en incubatiecondities voor de benzonasebehandeling.

Conditie	Temperatuur (°C)	Aantal uren (h)
A	4	2
B	37	2
C (ontrole)	4	2
D	37	1
E	37	0,5
F	4	Over Night (O/N)

Na incubatie werd de reactie gestopt met 10 µL 6× ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt solution (Sigma-Aldrich, Cat. nr. E7889-1L). De behandelde stalen werden vervolgens ingevroren bij –20 °C tot de agarosegelelektroforese.

Agarosegelelektroforese

De behandelde stalen werden geanalyseerd met een agarosegelelektroforese. Hiervoor werd een 2%-agarosegel bereid door 6 g agarose op te lossen in 200 mL 1× TAE-buffer. Na het oplossen van de agarose werd ethidiumbromide 10 mg/mL (Merck, Cat. nr. E1510-10ML) toegevoegd, waarna de gel werd gegoten en gestold gedurende 0,5–1 uur.

Van elk staal werd 600 ng geladen, aangevuld tot 20 μ L, waaraan 4 μ L 6 $\times$ Gel Loading Dye, Purple (NEB, Cat. nr. B7024S) werd toegevoegd. Vervolgens werden de stalen, de E-Gel™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, Cat. nr. 10488090) en de GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Cat. nr. SM0321) in de gel geladen.

De gel werd gelopen op 120 V gedurende 3 uur en gevisualiseerd met het ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad).

7.1.6. Steriele filtratie

Principe

De filtratiestap heeft als doel om deeltjes op basis van hun grootte te scheiden. In dit geval zal het virus door het 0,22 μ m-membraan lopen. De poriëgrootte is te klein om bacteriën en andere grotere contaminanten door te laten, waardoor deze achterblijven in het membraan. Hierdoor wordt deze filtratie gebruikt om het virusstaal steriel te maken. Door toevoeging van benzonase wordt onderzocht of dit de doorlaatbaarheid van de filter positief beïnvloedt.

Methode

Niet-behandelde conditie

Van het oorspronkelijke virusstaal werd 1300 μ L staal genomen. Dit staal werd gedurende 2 uur bij 4 °C bewaard.

Benzonase-behandelde conditie

Voor de benzonasebehandeling werd 975 μ L van het oorspronkelijke virusstaal genomen. Aan dit volume werden 10 $\times$ benzonasebuffer en benzonase toegevoegd tot een eindconcentratie van 1000 U/mL. Het staal werd gedurende 2 uur bij 4 °C geïncubeerd. Na incubatie werd de enzymreactie gestopt door toevoeging van 10 $\times$ EDTA. Dit resulteerde in een eindvolume van 1300 μ L.

Filtratie van lentivirale partikels

De Millex™-PES Membrane Filter, 0,22 μ m pore size (Millipore, Cat. nr. GPWP02500), de Millex™-MP Membrane Filter, 0,22 μ m pore size (Millipore, Cat. nr. SLMP025SS) en de Whatman® Puradisc 30 syringe filters, celluloseacetaat, 0,22 μ m pore size (Merck, Cat. nr. WHA10462200) werden vooraf bevochtigd met 500 μ L steriel water.

Van zowel de niet-behandelde als de benzonase-behandelde conditie werd een aliquot van 150 μ L genomen voor filtratie. Per filtertype werd 350 μ L van elke conditie door de filters gebracht met behulp van een steriele spuit (3 mL). Het gefilterde staal werd opgevangen in gelabelde 2 mL-cryovials. Het gefiltreerde volume werd genoteerd.

Alle aliquots werden bij 4 °C bewaard tot verdere analyse met behulp van een HIV-1 p24-ELISA (resDetect™ HIV-1 p24 Antigen ELISA Kit, Acro Biosystems, Cat. nr.

RES-A050). Het experiment werd uitgevoerd zoals hierboven beschreven. De optische densiteit werd gemeten bij 450 nm met de Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Cat. nr. A51119700DPC), en de p24-concentratie werd berekend op basis van een standaardcurve.

7.2. Resultaten & Discussie

7.2.1. Plasmiden

Tabel 3. Overzicht van de gemeten plasmideconcentraties.

Plasmide	Concentratie (ng/μL)
CAR	939
Gag/pol	758
VSV-G	727
REV	598

De vier plasmiden die nodig zijn voor lentivirale productie werden afzonderlijk opgekweekt in *Escherichia coli*-bacteriën en opgezuiverd via midiprep. De bekomen hoeveelheid plasmide (tabel 3) ligt in lijn met de verwachte opbrengst. Er werden hoge plasmideconcentraties gemeten.

7.2.2. Lentivirale partikel productie

7.2.2.1. Productie van lentivirale partikels

De virusproductie verliep vlot. De HEK-cellen vertoonden bij geen van de condities onverwachte celdood, wat wijst op een stabiele celkwaliteit gedurende het volledige productieproces. Voor alle condities (tabel 4) konden lentivirale partikels worden geoogst en succesvol opgezuiverd.

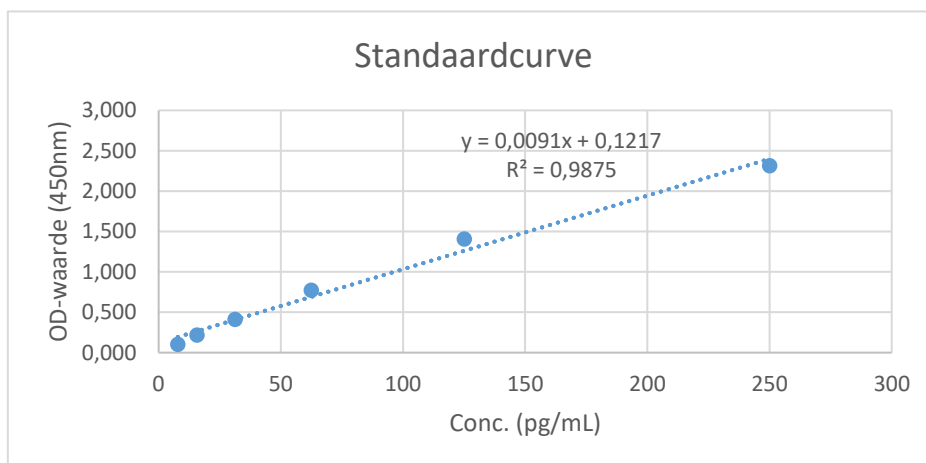
Tabel 4. Overzicht van de experimentele parameters van de virusproductie per conditie.

Conditie	Volume (mL)	Plasmide DNA: PEIpro mix (mL)	Grootte Cultuurfles (mL)
A&B	20	1	125
C	100	5	500
D	200	10	500
E	500	25	2000
F	NVT	NVT	NVT

7.2.2.2. Optimalisatie ELISA

In een eerste test werden verschillende verdunningen van een virusstaal, afkomstig van een eerder geproduceerde productie-batch, getest om tot een verdunning te komen die het best binnen de range van de standaardcurve valt.

Standaardcurve



Figuur 5. Standaardcurve voor de bepaling van de p24-concentratie.

Tabel 5. Waarden van de standaardreeks voor de bepaling van de p24-concentratie.

	Concentratie (pg/mL)	OD-waarde (450 nm)
Standaard 1	250	2,314
Standaard 2	125	1,405
Standaard 3	62,5	0,7698
Standaard 4	31,25	0,4094
Standaard 5	15,63	0,2164
Standaard 6	7,81	0,10133

Verdunningen

Tabel 6. Resultaten van de bepaling van de fysieke titer van de LVP's.

	OD-waarde	Concentratie (pg/mL)	VF	Concentratie (pg/mL)	Concentratie (ng/mL)	#LVP's	#LVP's
1/10 verd.	/	/	/	/	/	/	/
1/100 Verd.	3,577	379,7032967	/	/	/	/	/
1/500 Verd.	1,672	170,3626374	500	85181,31868	85,1813868	1064766484	1,06 x 10⁹
1/1000 Verd.	0,9326	89,10989011	1000	89109,89011	89,10989011	1113873626	1,11 x 10⁹
1/10000 Verd.	0,10918	-1,37637626	/	/	/	/	/

De standaardcurve vertoont een goede lineariteit met een R^2 -waarde van 0,9875 (Figuur 5). Dit wijst op een goede correlatie tussen de gekende concentraties en de gemeten concentraties (tabel 5) en bevestigt dat de standaardreeks geschikt is voor een nauwkeurige kwantificatie.

Bij de verdunningsreeks met lentivirale partikels traden meetproblemen op bij bepaalde verdunningen. De 1/10-verdunning gaf een OD die het meetbereik van het toestel overschreed. De 1/100- en 1/10.000-verdunning vielen buiten het bereik van de standaardcurve. De 1/500- en 1/1000-verdunning vielen binnen het lineaire bereik van de standaardcurve, met waarden van respectievelijk $1,06 \times 10^9$ en $1,11 \times 10^9$ lentivirale partikels (tabel 6).

Hieruit kan worden afgeleid dat te lage verdunningen leiden tot een overschrijding van het meetbereik van het meettoestel, zoals bij de 1/10-verdunning. Te hoge verdunningen (zoals 1/10.000) leiden tot een te lage concentratie, wat resulteert in een waarde onder de laagste standaard en dus niet kwantificeerbaar is. De 1/500- en 1/1000-verdunning vielen binnen het lineaire bereik van de standaardcurve en leveren betrouwbare OD-waarden op die met de constante ($1 \text{ ng p24} = 1,25 \times 10^7 \text{ LVP's}$) kunnen worden omgerekend naar het aantal lentivirale partikels (tabel 6).

Op basis van deze resultaten lijken de verdunningen 1/500 en 1/1000 het meest geschikt voor een nauwkeurige bepaling van de fysieke titer bij de ELISA. Een voorafgaande redenering over de verwachte hoeveelheid LVP's in het staal blijft echter noodzakelijk om een geschikte verdunning te kiezen, zodat het gemeten signaal binnen de standaardcurve valt.

7.2.2.3. Bepaling van fysieke titer van virusconditie

Voor de bepaling van de fysieke titer van de verschillende viruscondities (tabel 4) werd gebruikgemaakt van de vergelijking van de ijklijn van de standaardreeks om het aantal LVP's te berekenen van de verschillende gebruikte condities (extra details van de resultaten worden weergegeven in bijlage 3 – Resultaten fysieke titerbepaling, figuur 7 en tabel 10 – 11).

Tabel 7. Fysieke titerwaarden van de LVP's voor de verschillende virusconditie. De experimentele omstandigheden per condities zijn weergegeven in tabel 4.

	OD-waarde	#LVP's
Conditie A	0,682	2,30 x 10⁹
Conditie B	0,450	1,47 x 10⁹
Conditie C	0,6915	2,33x 10⁹
Conditie D	0,5057	1,67 x 10⁹
Conditie E	0,77155	2,62 x 10⁹

De standaardcurve vertoonde een uitstekende lineariteit met een R²-waarde van 0,9992 (Figuur7). Dit wijst op een goede correlatie tussen de gekende concentraties en de gemeten OD-waarden (tabel 10). Dit bevestigt dat de ELISA geschikt is voor een betrouwbare kwantificatie van lentivirale partikels.

Na correctie met de verdunningsfactor en omzetting met behulp van de constante (1 ng p24 = 1,25 × 10⁷ LVP's) naar het aantal lentivirale partikels kon een duidelijk verschil tussen de vijf condities worden waargenomen (tabel 11). De bekomen titers variëren tussen 1,47 × 10⁹ en 2,62 × 10⁹ LVP's (tabel 7).

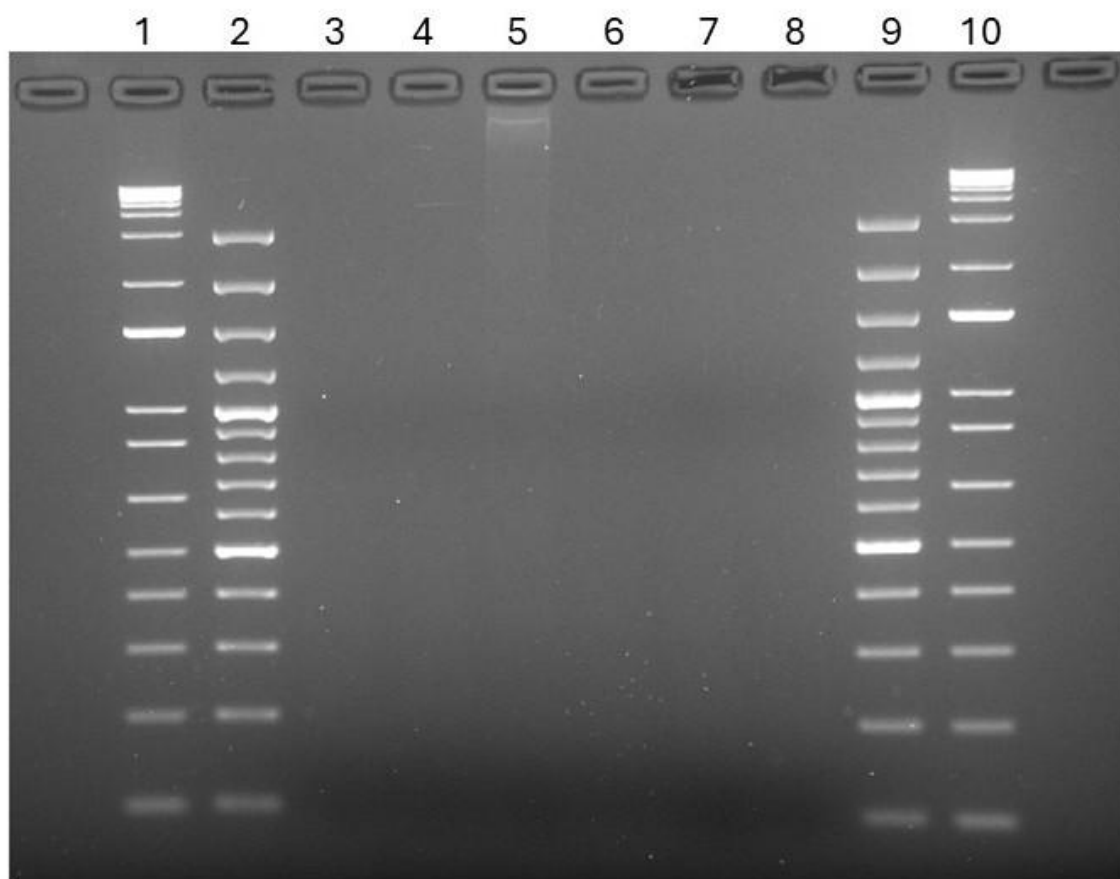
De conditie met een volume van 500 mL en 25 mL plasmide-DNA:PEIpro mix leverde de hoogste fysieke titer op. Dit suggereert dat de omstandigheden van deze conditie (een cultuurvolume van 500 mL, gekweekt in een 2000 mL suspensiefles, met een startdensiteit van 1 × 10⁶ cellen/mL) het meest gunstig waren voor een goede productie van lentivirale partikels. Hieruit kan worden afgeleid dat een groter productievolume zorgt voor gunstigere productieomstandigheden dan kleinere productievolumes.

7.2.3. Benzonase behandeling

De benzonase behandeling werd uitgevoerd om het resterende vrije DNA in de virusstalen af te breken. Hierbij werden verschillende incubatiecondities getest (tabel 8). Na behandeling werden de stalen geanalyseerd via agarosegelelektroforese om de doeltreffendheid van de DNA-degradatie te evalueren (figuur 6).

Tabel 8. Overzicht van de temperatuur- en incubatiecondities voor de benzonasebehandeling.

Conditie	Temperatuur (°C)	Aantal uren (h)
A	4	2
B	37	2
C (ontrole)	4	2
D	37	1
E	37	0,5
F	4	Over Night (O/N)



Figuur 6. Resultaat van de agarosegelelektroforese.

Laan 1: 1kb-ladder, Laan 2: 100bp-ladder, Laan 3: Conditie A, Laan 4: Conditie B, Laan 5: Conditie C, Laan 6: Conditie D, Laan 7: Conditie E, Laan 8: Conditie F, Laan 9: 100bp-ladder, Laan 10: 1kb-ladder.

In het controlestaal (laan 5), waaraan geen benzonase werd toegevoegd, is een duidelijk DNA-sigitaal zichtbaar op de agarosegel met een grootte groter dan 1 kb. In alle met benzonase behandelde stalen (laan 3, 4, 6, 7, 8) verdween dit DNA-bandje. De correcte scheiding van zowel de 100 bp- als de 1 kb-ladder (laan 1, 9 en laan 2, 10) bevestigt dat de elektroforese correct is verlopen. De resultaten kunnen dus als betrouwbaar worden beschouwd.

De aanwezigheid van een duidelijke DNA-band groter dan 1 kb in het controlestaal (figuur 6) wijst op de aanwezigheid van residueel plasmide in het virusstaal, afkomstig van de eerder beschreven productie-batch. Het niet detecteren van het DNA-bandje in alle behandelde condities (figuur 6) toont aan dat de gebruikte benzonaseconcentratie (50 U/mL) en incubatietijden voldoende waren om vrije nucleïnezuren volledig af te breken.

Benzonase vertoont een maximale enzymactiviteit bij 37 °C, bij lage temperatuur blijft het enzym wel actief, maar met een lagere reactiesnelheid. Hierdoor zijn langere incubatietijden nodig bij 4 °C. We zouden dus verwachten dat de benzonasebehandeling bij 4 °C minder efficiënt verloopt, aangezien de enzymactiviteit bij deze temperatuur daalt. (Benzonase Endonuclease Balancing Efficiency and Regulatory Compliance-the Smart Solution for DNA Removal in Biopharmaceutical Production, n.d.)

Aangezien alle condities een volledige afbraak van het vrije DNA opleverden, zoals bevestigd met AGE (figuur 6), kan de behandeling van 2 uur bij 4 °C worden aanbevolen voor het uiteindelijke productieproces. Binnen deze conditie is er een effectieve benzonaseactiviteit en, op basis van voorafgaande ELISA-experimenten die de stabiliteit van de lentivirale partikels evalueerden, een minimale afbraak van de lentivirale partikels, waardoor het staal het stabielst blijft en al het aanwezige residuele plasmide wordt afgebroken.

Hoewel uit literatuur blijkt dat een benzonasebehandeling voornamelijk wordt toegepast bij 37 °C (Sastry et al., 2004), tonen deze resultaten aan dat een benzonasebehandeling met een effectieve degradatie van het residuele plasmide-DNA ook kan plaatsvinden bij 4 °C met een incubatie van 2 uur.

7.2.4. Steriele filtratie

Met behulp van de p24 ELISA werden de fysieke titers van het virusstaal vóór en na filtratie met de verschillende filters berekend. Op basis van deze fysieke titer kon de opbrengst worden bepaald. Om de resultaten nauwkeurig te berekenen, werden de volumes vóór en na filtratie in rekening gebracht (extra details van de resultaten worden weergegeven in bijlage 4 – Resultaten steriele filtratie, figuur 8 en tabel 12 – 16).

Tabel 9. Opbrengst van de steriele filtratie voor PES-, MPES en Celluloseacetaatfilter.

	Zonder benzonasebehandeling	Met benzonasebehandeling
PES-filter	54,42 %	17,22 %
MPES-filter	36,99 %	22,64 %
Celluloseacetaat-filter	≤ 16,16 %	≤ 9,67 %

Bij de PES-filter werd een opbrengst van 54,42 % zonder benzonasebehandeling gemeten (tabel 9). Dit is de hoogste opbrengst van alle geteste filters. Na de benzonasebehandeling daalt de opbrengst tot 17,22 % (tabel 10). In de literatuur wordt beschreven dat de PES-filter de beste opbrengst heeft voor steriele filtratie van LVP's (Vogel et al., 2024; Labisch et al., 2025).

Bij de MPES-filter werd een opbrengst van 36,99 % zonder benzonasebehandeling berekend (tabel 9). Dit is lager dan bij de PES-filter, wat erop wijst dat er meer virusdeeltjes in het membraan achterbleven.

Bij de celluloseacetaat-filter lagen alle waarden na filtratie onder de detectielimiet, zowel met als zonder benzonasebehandeling (tabel 9). De opbrengst kon hierdoor niet exact worden bepaald. Deze waarden zijn dus lager dan ≤ 16,16 % (zonder benzonasebehandeling) en ≤ 9,67 % (met benzonasebehandeling), wat erop wijst dat er een sterke binding is tussen de LVP's en celluloseacetaat.

Uit de resultaten blijkt dat de benzonasebehandeling een negatief effect heeft op de opbrengst van lentivirale partikels na filtratie. Bij zowel de PES-, MPES- als de celluloseacetaatfilters werd een lagere opbrengst waargenomen wanneer het staal vooraf met benzonase werd behandeld. Dit strookt niet met de literatuur, die aangeeft dat een benzonasebehandeling vóór steriele filtratie de filtratiecapaciteit verbetert en verlies vermindert. Benzonase degradeert vrij DNA, waardoor filters minder snel verstoppert en er meer virus door de filter kan gaan (Vogel et al., 2024; Labisch et al., 2025). Dit komt niet overeen met de waargenomen resultaten.

8. Besluit

In deze bachelorproef werd onderzocht wat het effect is van de benzonasebehandeling en steriele filtratie op de fysieke titer van lentivirale vectoren voor CD70-gerichte CAR-T-celtherapie. Daarnaast werd ook het productieproces van lentivirale partikels opgezet en geëvalueerd.

De productie van lentivirale partikels in HEK293SF-3F6-cellen resulteerde in fysieke titers tussen $1,47 \times 10^9$ en $2,62 \times 10^9$ LVP's, wat wijst op een goede virusproductie. De hoogste titer werd bekomen bij de grootste productieconditie (500 mL), wat erop wijst dat een groter productievolume (een cultuurvolume van 500 mL, gekweekt in een 2000 mL suspensiefles, met een startdensiteit van 1×10^6 cellen/mL) gunstige omstandigheden creëert voor de aanmaak van lentivirale partikels. De gebruikte HIV-1 p24-ELISA bleek een betrouwbare methode voor de bepaling van de fysieke titer, aangezien de standaardcurves een sterk lineair verband vertoonden.

Uit de resultaten van de steriele filtratie blijkt dat het type filter een belangrijke invloed heeft op de recovery van lentivirale partikels. De PES-filter behaalde de hoogste opbrengst en bleek daardoor het meest geschikt voor de steriele filtratie van lentivirale vectoren. De MPES-filter gaf lagere opbrengsten, terwijl de celluloseacetaatfilter zo goed als geen lentivirale partikels doorliet. Daarnaast werd vastgesteld dat een voorafgaande benzonasebehandeling in alle gevallen leidde tot een lagere opbrengst na filtratie. Dit resultaat komt niet overeen met de bevindingen uit de literatuur, waar vaak wordt beschreven dat benzonase de filtercapaciteit zou verbeteren.

Op basis van deze resultaten kan een antwoord worden geformuleerd op de onderzoeksvraag: de benzonasebehandeling veroorzaakt een daling van de opbrengst van lentivirale partikels tijdens de steriele filtratie. Het effect van de steriele filtratie op de fysieke titer is afhankelijk van het gebruikte filtertype, waarbij de PES-filter de beste resultaten opleverde.

9. Bronnen

Arduini, A., Katiyar, H., & Liang, C. (2025). Progress in Pseudotyping Lentiviral Vectors Towards Cell-Specific Gene Delivery In Vivo. In *Viruses* (Vol. 17, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v17060802>

Arrasate, A., Lopez-Robles, C., Zuazo, M., Banos-Mateos, S., Martin, C., Lamsfus-Calle, A., & Fertin, M. J. (2025). Lentiviral Vectors: From Wild-Type Viruses to Efficient Multi-Functional Delivery Vectors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 26, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms26178497>

Benzonase endonuclease Balancing efficiency and regulatory compliance-the smart solution for DNA removal in biopharmaceutical production. (n.d.). <https://www.merckmillipore.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/267/346/benzonase-endonuclease-solution-br2754en-mk.pdf>

CAR-T-celtherapie | UZ Gent. (z.d.). <https://www.uzgent.be/nl/patient/zoek-een-arts-of-dienst/hematologie/aandoeningen-en-behandelingen/behandelingen/immunotherapie/car-t-celtherapie>

De Munter, S., Buhl, J. L., De Cock, L., Van Parys, A., Daneels, W., Pascal, E., Deseins, L., Ingels, J., Goetgeluk, G., Jansen, H., Billiet, L., Pille, M., Van Duyse, J., Bonte, S., Vandamme, N., Van Dorpe, J., Offner, F., Leclercq, G., Taghon, T., American Association for Cancer Research. (2024). Knocking Out CD70 Rescues CD70-Specific NanoCAR T Cells from Antigen-Induced Exhaustion. In *Cancer Immunology Research* (pp. 1236–1251) [Journal-article]. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-23-0677>

Hu, S., Li, M., & Akkina, R. (2019). Generation of High-Titer Pseudotyped Lentiviral Vectors. *Methods in Molecular Biology*, 1937, 125–134. https://www.researchgate.net/publication/330767112_Generation_of_High-Titer_Pseudotyped_Lentiviral_Vectors_Universitatsfrauenklinik_Heidelberg

Jargalsaikhan, B. E., Muto, M., & Ema, M. (2025). The Era of Gene Therapy: The Advancement of Lentiviral Vectors and Their Pseudotyping. In *Viruses* (Vol. 17, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v17081036>

Labisch, J. J., Evangelopoulou, M., Schleuß, T., & Pickl, A. (2025). Investigating Ultrafiltration Membranes and Operation Modes for Improved Lentiviral Vector

Processing. Engineering in Life Sciences, 25(1).
<https://doi.org/10.1002/elsc.202400057>

Milone, M. C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529–1541. <https://www.nature.com/articles/s41375-018-0106-0>

Mitra, A., Barua, A., Huang, L., Ganguly, S., Feng, Q., & He, B. (2023). From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188049>

Najafi, S., Rahimpour, A., Ahmadi, H., Tehrani, M. M., Khalilzad, M. A., Suri, F., & Ranjbari, J. (2024). The significance of chemical transfection/transduction enhancers in promoting the viral vectors-assisted gene delivery approaches: A focus on potentials for inherited retinal diseases. In *Electronic Journal of Biotechnology* (Vol. 72, pp. 29–40). Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2024.07.005>

Pu, J., Liu, T., Zhou, Y., Chen, M., Fu, X., Wan, Y., Wang, J., Chen, B., Sharma, A., Lukacs-Kornek, V., Schmidt-Wolf, I. G. H., & Hou, J. (2025). T cells in cancer: mechanistic insights and therapeutic advances. In *Biomarker Research* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00807-w>

Sastry, L., Xu, Y., Cooper, R., Pollok, K., & Cornetta, K. (2004). Evaluation of plasmid DNA removal from lentiviral vectors by benzonase treatment. *Human gene therapy*, 15(2), 221–226. <https://doi.org/10.1089/104303404772680029>

Vogel, J. E., Terrao, M., Schwingal, S., Kapitza, L., Brigulla, D., Pirzas, V., Laux, H., & Brandt, T. (2024). High yield sterile filtration process for highly concentrated lentiviral vectors. *Biotechnology Journal*, 19(3). <https://doi.org/10.1002/biot.202300348>

Voor deze tekst heb ik gebruikgemaakt van Microsoft Copilot als ondersteuning bij taken zoals het herformuleren van tekst en het verbeteren van de schrijfkwaliteit. Alle inhoudelijke beslissingen, conclusies en analyses zijn door mijzelf gemaakt. De door Copilot gegenereerde suggesties werden steeds kritisch beoordeeld en waar nodig aangepast. *De gebruikte sessie is beschikbaar via:*

<https://copilot.microsoft.com/shares/XSmZf29LG3QdRFMpty1F9>

10. Bijlage

10.1. Bijlage 1 - *Plasmid plus Midiprep kit*

De centrifuge werd vooraf gekoeld tot 4 °C. De PE-buffer werd verdund in een 1:5-verhouding. Uit elke expensiecultuur werd 25 mL overgebracht in een 50 mL-tube en gecentrifugeerd (3428 rcf, 15 min, 4 °C). Het supernatant werd verwijderd en de pellet werd geresuspendeerd in 2 mL P1-buffer, waarna 2 mL P2-buffer werd toegevoegd en het mengsel gedurende 5 min op kamertemperatuur al kantelend werd geïncubeerd. Vervolgens werd 2 mL S3-buffer toegevoegd en gemengd tot de oplossing kleurloos was.

Het lysaat werd gecentrifugeerd (3428 rcf, 5 min, kamertemperatuur) en het supernatant werd overgebracht naar een QIAfilter-cartridge. Na filtratie werd 2 mL BB-buffer toegevoegd en werd het mengsel geladen op een QIAGEN Plasmid Plus spin-kolom op de QIAvac 24 Plus. Na vacuümfiltratie werd de kolom gewassen met 0,7 mL washbuffer.

De kolom werd overgebracht naar een 1,5 mL Eppendorf-tube en gecentrifugeerd (10 000 g, 1 min) om resterende washbuffer te verwijderen. Voor elutie werd 50 µL water op het membraan aangebracht, 1 min geïncubeerd en gecentrifugeerd. De plasmideconcentratie werd bepaald met een Nanodrop-spectrofotometer.

10.2. Bijlage 2 - *resDetect™ HIV-1 p24 Antigen ELISA*

Voor het starten van de ELISA werden de washbuffer, dilutionbuffer, calibrator en lysisbuffer op kamertemperatuur gebracht. Bij de eerste analyse werden zowel de HIV-1 p24-standard als de biotin-anti-HIV-1-p24-antibody opgelost in 200 µL Aqua purificata. Vervolgens werden deze gedurende 15–30 min opgelost door op en neer te pipetteren. Deze oplossingen werden daarna gealiquoteerd per 25 µL in Eppendorf-tubes en bewaard bij –80 °C.

Voor de lysis van de lentivirale vectoren werden de stalen 1:1 verdund met lysisbuffer en gedurende 30 min op kamertemperatuur geïncubeerd. Na de lysis werd elk staal 1/10 verdund met dilutionbuffer om de lysis te stoppen.

Vervolgens werd de 1× washbuffer bereid vanuit de 10× washbuffer en de 1× dilutionbuffer vanuit de 2× dilutionbuffer. Hierna werd de standaardreeks aangemaakt zoals beschreven in het protocol. De stalen werden verder verdund zodat ze binnen de grenswaarden van de standaardreeks vielen.

In de ELISA-plaat werd elke calibrator, blank en elk staal in duplicaat gepipetteerd in de wells van de microtiterplaat. Dit werd gedurende één uur op kamertemperatuur geïncubeerd zodat de p24-eiwitten van de lentivirale partikels konden binden aan het primair gecoate antilichaam in de wells. Tijdens de incubatie werd de

biotine-anti-HIV-1-p24-antibody verdund tot een concentratie van 1/1000. Na de incubatie werd de plaat driemaal gewassen met washbuffer om niet-gebonden componenten te verwijderen.

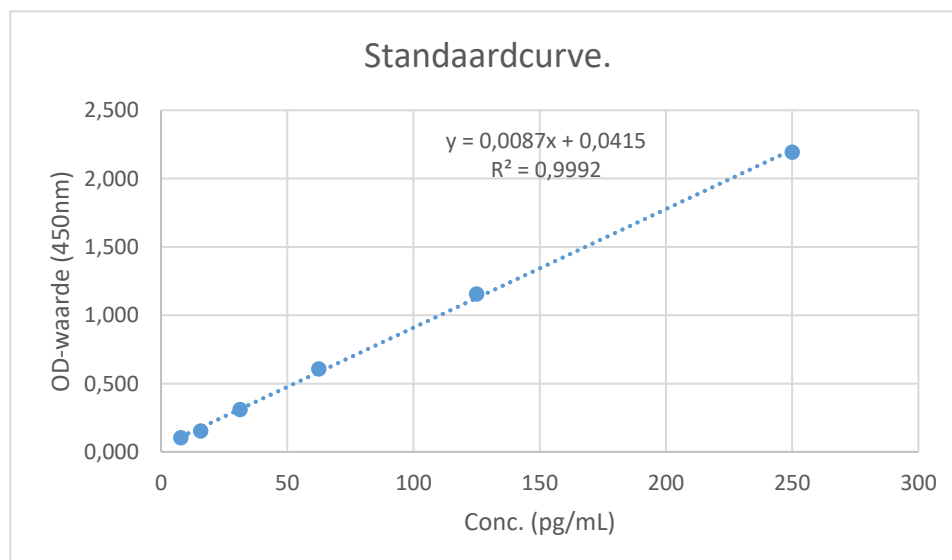
Vervolgens werd het verdunde antibody in elke well gepipetteerd. Dit antibody bindt p24 dat gebonden is aan het gecoate antilichaam in de wells. De plaat werd opnieuw gedurende 1 uur op kamertemperatuur geïncubeerd. Tijdens deze incubatiestap werd de streptavidine-HRP verdund tot 1/200. Deze oplossing werd tegen licht beschermd en op kamertemperatuur bewaard.

Na de incubatie werd de plaat opnieuw driemaal gewassen met washbuffer. Vervolgens werd de streptavidine-HRP in elke well gepipetteerd. Dit enzym bestaat uit een eiwit dat bindt aan het biotinegedeelte van het antilichaam en een peroxidase. De plaat werd opnieuw gedurende 1 uur op kamertemperatuur geïncubeerd, afgeschermd van licht.

De stop-solution en substrate-solution werden op kamertemperatuur gebracht. Na de incubatie werd de plaat opnieuw driemaal gewassen met washbuffer. Vervolgens werd de substrate-solution toegevoegd met behulp van reverse pipetting om luchtballen te vermijden. Dit substraat wordt omgezet door HRP, wat resulteert in een blauwe kleur. Dit werd 20 min geïncubeerd op kamertemperatuur, afgeschermd van licht. Na 20 min werd de stop-solution toegevoegd, waardoor de enzymatische reactie wordt stopgezet en een kleuromslag van blauw naar geel optreedt.

10.3. Bijlage 3 – Resultaten Fysieke titer bepaling

Standaardcurve



Figuur 7. Standaardcurve voor de bepaling van de p24-concentratie.

Tabel 10. Waarden van de standaardreeks voor de bepaling van de p24-concentratie.

	Concentratie (pg/mL)	OD-waarde (450nm)
Standaard 1	250	2,192
Standaard 2	125	1,156
Standaard 3	62,5	0,6071
Standaard 4	31,25	0,3094
Standaard 5	15,63	0,1517

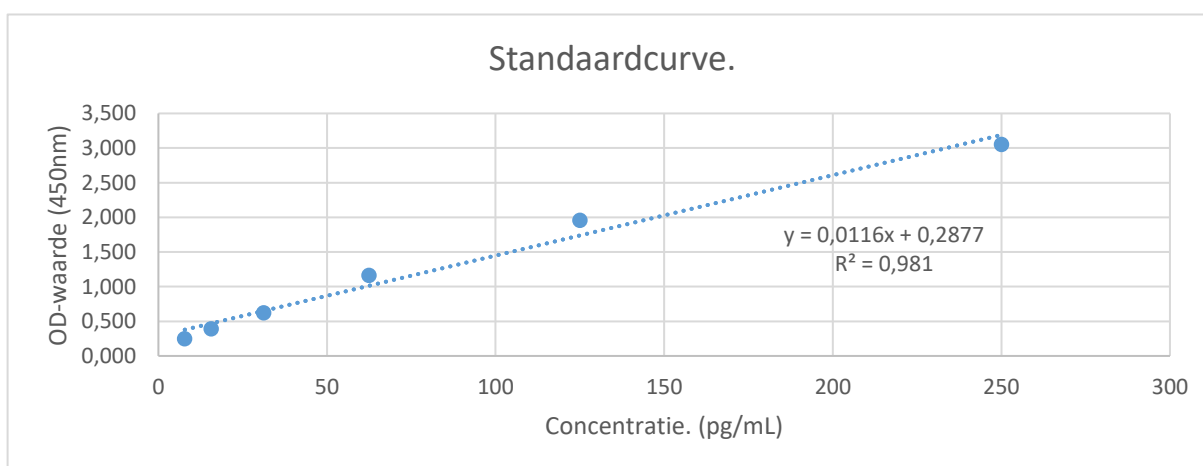
Viruscondities

Tabel 11. Resultaten van de bepaling van de fysieke titer van de LVP's.

	OD-waarde	Concentratie (pg/mL)	Verdunningsfactor!	Concentratie (pg/mL)	Concentratie (ng/mL)	#LVP's	#LVP's
Conditie A	0,682	73,59195402	2500	183979,8851	183,9798851	2299748563	2,30 x 10⁹
Conditie B	0,450	46,99425287	2500	117485,6322	117,4856322	1468570402	1,47 x 10⁹
Conditie C	0,6915	74,71264368	2500	186781,6092	186,7816092	2334770115	2,33 x 10⁹
Conditie D	0,5057	53,35632184	2500	133390,8046	133,3908046	1667385057	1,67 x 10⁹
Conditie E	0,77155	83,9137931	2500	209784,4828	209,7844828	2622306034	2,62 x 10⁹

10.4. Bijlage 4 – Resultaten steriele filtratie

10.4.1. ELISA



Figuur 8. Standaardcurve voor de bepaling van de p24-concentratie.

Tabel 12. Waarden van de standaardreeks voor de bepaling van de p24-concentratie.

	Concentratie (pg/mL)	OD-waarde (450nm)
Standaard 1	250	3,054
Standaard 2	125	1,958
Standaard 3	62,5	1,1619
Standaard 4	31,25	0,6230
Standaard 5	15,63	0,3907
Standaard 6	7,81	0,25040

Tabel 13. Resultaten van de bepaling van de fysieke titer van de LVP's.

	OD-waarde	Concentratie (pg/mL)	Verdunningsfactor	Concentratie (pg/mL)	Concentratie (ng/mL)	#LVPs	#LVPs
Conditie A1	0,464	15,17672414	1000	15176,72414	15,17672414	189709051,7	1,90 x 10⁸
Conditie A2	0,405	10,12931034	1000	10129,31034	10,12931034	126616379,3	1,27 x 10⁸
Conditie A3	0,0684	-18,90517241	1000	-	-18,90517241	-236314655,2	-2,36 x 10⁸
Conditie A4	0,8904	51,95258621	1000	51952,58621	51,95258621	649407327,6	6,49 x 10⁸
Conditie B1	0,38080	8,025862069	1000	8025,862069	8,025862069	100323275,9	1,00 x 10⁸
Conditie B2	0,40975	10,52155172	1000	10521,55172	10,52155172	131519396,6	1,32 x 10⁸
Conditie B3	0,08285	-17,65948276	1000	-	-17,65948276	-220743534,5	-2,21 x 10⁸
Conditie B4	0,79600	43,81896552	1000	43818,96552	43,81896552	547737069	5,48 x 10⁸

Tabel 14. Berekening van de fysieke titer op basis van laagst detecteerbare waarde in de p24-ELISA.

	OD-waarde	Concentratie (pg/mL)	Verdunningsfactor	Concentratie (pg/mL)	Concentratie (ng/mL)	#LVPs	#LVPs
Laagst detecteerbare waarde	0,391	8,879310345	1000	8879,310345	8,879310345	110991379,3	1,11 x 10⁸

Tabel 15. Gemeten volumes voor en na filtratie, met en zonder benzonasebehandeling.

	Zonder benzonase (mL)	Met benzonase (mL)
Voor filtratie	0,350	0,350
PES-filter	0,326	0,329
MPES-filter	0,332	0,330
Cellulose Acetaat-filter	0,331	0,334

Tabel 16. Fysieke titerwaarden voor en na filtratie, met en zonder benzonasebehandeling.

	Zonder benzonase	Met benzonase
Voor filtratie	$2,27 \times 10^8$	$3,83 \times 10^8$
PES-filter	$1,24 \times 10^8$	$6,60 \times 10^7$
MPES-filter	$8,41 \times 10^7$	$8,68 \times 10^7$
Cellulose Acetaat-filter	$3,67 \times 10^7$	$3,71 \times 10^7$

10.5. Bijlage 5 - Logboek

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	5/01	6/01	7/01	8/01	9/01
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Inleiding lopende projecten. + Opstarten celkweek.	Literatuur onderzoek	Cellen tellen. + ELISA.	Cellen tellen. + LAL-assay.	Cellen tellen. + Literatuur onderzoek.
Uitgevoerde taken in de namiddag	Literatuur onderzoek.	Literatuur onderzoek.	Cellen tellen. + ELISA.	Literatuur onderzoek.	Literatuur onderzoek.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	12/01	13/01	14/01	15/01	16/01
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Cellen tellen. + Cellen splitsen.	Literatuur onderzoek.	Cellen tellen. + Buffers maken in Cleanroom.	Meevolgen functionele titerbepaling van lentiviralepartikels.	Benzonasebehandeling. + ELISA.
Uitgevoerde taken in de namiddag	Meevolgen functionele titerbepaling van lentiviralepartikels.	Literatuur onderzoek.	Literatuur Onderzoek.	Flowcytometrie. + Benzonasebehandeling.	ELISA.

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celtherapie.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	19/01	20/01	21/01	22/01	23/01
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Cellen tellen + Cellen splitsen. + Benzonase stalen voorbereiden	Cellen tellen. + gelelektroforese.	Literatuurstudie	ELISA	Cellen tellen + Cellen splitsen.
Uitgevoerde taken in de namiddag	Nieuwe cellen opstarten. + Cellen tellen.	Gelelektroforese.	Literatuurstudie	ELISA	Flowcytometrie

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	26/01	27/01	28/01	29/01	30/01
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Literatuurstudie.	Literatuurstudie.	Cellen tellen	Midiprep + Gelelektroforese	Meeting onderzoeksproject + Cellen tellen
Uitgevoerde taken in de namiddag	Uitplaten Bacteriën met plasmiden	Inzetten startcultuur van plasmiden.	Logistieke voorbereiding J&J + Inzetten expansie cultuur.	Gelelektroforese + Sterilisatie van plasmiden.	Logistieke voorbereiding J&J.

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celtherapie.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	02/02	03/02	04/02	05/02	06/02
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Cellen Manueel tellen	Cellen Manueel tellen + Splitsen + Productie van Lentivirale partikels.	Literatuurstudie	Midiprep gag/pol plasmide	Cellen tellen.
Uitgevoerde taken in de namiddag	Literatuurstudie.	Literatuurstudie.	Productie van Lentivirale partikels.	Sterilisatie lentivirale partikels.	Overleg Hanne

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	09/02	10/02	11/02	12/02	13/02
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Nieuwe cellen opstarten + Oude cellen onderhouden en tellen.	Mimicken productieproces + Mimicken benzonasebehandeling + Cellen tellen.	Cellen tellen + Oude cellen onderhouden. + Mimicken van productieproces	Cellen tellen + Voorbereiding stalen AGE.	Resultaten bekijken AGE + Cellen tellen + Oude cellen onderhouden.
Uitgevoerde taken in de namiddag	Literatuurstudie.	Literatuurstudie + Mimicken productieproces	Literatuurstudie + Mimicken productieproces	AGE.	Literatuurstudie.

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celtherapie.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	16/02	17/02	18/02	19/02	20/02
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Stalen naar Robrecht brengen + HEK-cellen onderhouden.	ELISA	HEK-cellen onderhouden.	Benzonasebehandeling optimaliseren.	HEK-cellen onderhouden. + Vervolg benzonasebehandeling + AGE
Uitgevoerde taken in de namiddag	ELISA voorbereiden + Resultaten AGE.	ELISA + Resultatenanalyse ELISA	Benzonasebehandeling voorbereiden	Benzonasebehandeling optimaliseren.	AGE.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	23/02	24/02	25/02	26/02	27/02
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Labmeeting + Resultaten bespreken.	Benzonasebehandeling	HEK-cellen onderhouden.	ELISA	Stagebezoek Mevr. Crabbe
Uitgevoerde taken in de namiddag	HEK-cellen Onderhouden.	Freezings HEK293-cellen maken.	Benzonasebehandeling voorbereiden	ELISA + Resultatenanalyse ELISA.	Literatuurstudie.

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celtherapie.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	02/03	03/03	04/03	05/03	06/03
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Labmeeting + Voorbereiden benzonasebe handeling	Benzonasebe handeling	Cellen tellen + ELISA	Literatuurstudie	Gel gieten.
Uitgevoerde taken in de namiddag	Infosessie Photo51 + ELISA voorbereiden	/	ELISA + analyse resultaten ELISA.	Literatuurstudie	Gel lopen.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	09/03	10/03	11/03	12/03	13/03
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Labmeeting + Voorbereiden benzonasebe handeling	Benzonasebe handeling + Chromatografie + Steriele filtratie	qPCR	ELISA	Literatuurstudie (Thuis)
Uitgevoerde taken in de namiddag	Literatuurstudie	Literatuurstudie	Steriele filtratie	ELISA	Literatuurstudie (Thuis)

Het gebruik van lentivirale partikels in CAR-T-Celltherapie.

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	16/03	17/03	18/03	19/03	20/03
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Labmeeting	Literatuur studie	Cellen tellen	Literatuurstudie.	Analyse AGE + Cellen tellen
Uitgevoerde taken in de namiddag	Verwerking resultaten	Literatuur studie	Verwerking resultaten	Stalen verdunnen + AGE	Literatuur studie

Dag	Maandag	Dinsdag	Woensdag	Donderdag	Vrijdag
Datum	23/03	24/03	25/03	26/03	27/03
Uitgevoerde taken in de voormiddag	Labmeeting + Cellen tellen + Opstarten van cellen	Ziek	Ziek	Literatuurstudie	ELISA
Uitgevoerde taken in de namiddag	benzonasebehandeling	Ziek	Ziek	Benzonase behandeling	ELISA

10.6. Bijlage 6 – Prestatieformulier

Prestatieformulier Bachelorproefstage 12 weken FBT

(ingevuld te ondertekenen door de (co)promotor en te overhandigen aan de student voor zijn stagedossier – student dient dit op te laden in de opdrachtentool van OnStage)

Naam student: **Tiebe Kestelyn.**

Naam en adres stageplaats: **GMP-unit CellGENtherapies. C. Heymanslaan 10, 9000 Gent.**

Naam (co)promotor: **Hanne Vershuere.**

Datum	Aantal uren
5/01/2026	8
6/01/2026	8
7/01/2026	8
8/01/2026	8
9/01/2026	8
12/01/2026	8
13/01/2026	8
14/01/2026	8
15/01/2026	8.5
16/01/2026	8.5
19/01/2026	8
20/01/2026	8
21/01/2026	8
22/01/2026	8
23/01/2026	8
26/01/2026	8
27/01/2026	8
28/01/2026	9
29/01/2026	8
30/01/2026	8
02/02/2026	8
03/02/2026	8
04/02/2026	8
05/02/2026	8
06/02/2026	6.5
09/02/2026	8
10/02/2026	8
11/02/2026	8
12/02/2026	9
13/02/2026	8

Datum	Aantal
16/02/2026	8
17/02/2026	8
18/02/2026	8
19/02/2026	8
20/02/2026	8
23/02/2026	8
24/02/2026	8
25/02/2026	7
26/02/2026	8
27/02/2026	8
02/03/2026	8
03/03/2026	5
04/03/2026	8
05/03/2026	8
06/03/2026	8
09/03/2026	8
10/03/2026	8
11/03/2026	8
12/03/2026	8
13/03/2026	8
16/03/2026	8
17/03/2026	8
18/03/2026	7
19/03/2026	8
20/03/2026	7
23/03/2026	8
24/03/2026	0 (Ziek)
25/03/2026	0 (Ziek)
26/03/2026	8
27/03/2026	8

