



Commissie Genetische Modificatie

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
GGO 01-181/02.co1	28 februari 2006	CGM/060313-06	13 maart 2006

Onderwerp
Advies IG 01-181/02

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag over kennisgeving IG 01-181/02, getiteld 'Productie van recombinante adenovirus vectoren' van het Academisch Ziekenhuis Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over omlaagschaling van werkzaamheden met zoogdiercellen waarin een replicatiedeficiënte adenovirale vector is gebracht. Het betreft open handelingen (metingen) met deze getransduceerde cellen en werkzaamheden met proefdieren die geïnjecteerd zijn met de cellen. Er wordt gebruik gemaakt van specifieke meetapparatuur welke is gesitueerd in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor de beoogde werkzaamheden.

Risico's bij werkzaamheden met adenovirale vectoren kunnen ontstaan door aanwezigheid van replicatiecompetent adenovirus (RCA) welke zouden kunnen leiden tot verspreiding van het genetisch gemodificeerde organisme in het milieu. Daarnaast zouden risico's voor laboratoriummedewerkers kunnen optreden door aanwezigheid van replicatiedeficiënte vectordeeltjes in de celkweek.

De COGEM acht de kans op RCA vorming tijdens vectorproductie verwaarloosbaar klein gezien het gehanteerde productiesysteem. Tijdens handelingen met getransduceerde cellen zouden deze van buitenaf besmet kunnen raken met adenovirussen, met eventueel mobilisatie van de vector als gevolg. Met in acht name van de gehanteerde werkprocedure en de aanvullende maatregelen is de COGEM van mening dat de kans hierop verwaarloosbaar klein is. Hierbij adviseert de COGEM onder andere dat om open handelingen buiten inperking te kunnen uitvoeren zonder risico's voor mens en milieu, de primaire cellen na isolatie getest moeten worden op afwezigheid van adenovirussen.

Verder is de commissie van mening dat de hoeveelheid nog eventueel aanwezig replicatiedeficiënte vectordeeltjes, afkomstig van het inoculum, verwaarloosbaar klein zijn gezien de kweek- en wasprocedure van de getransduceerde cellen.

De COGEM is van mening dat met het hanteren van de door de aanvrager voorgestelde werkwijze én de aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij de omlaagschaling van de werkzaamheden 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 black ink, consisting of a stylized loop followed by a horizontal line with a small dash underneath.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. R.C. Zwart

Omlaagschaling van werkzaamheden met adenoviraal getransduceerde zoogdiercellen

COGEM advies CGM/060313-06

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu bij omlaagschaling van handelingen met eerste generatie adenoviraal getransduceerde zoogdiercellen. Het doel van het onderzoek is het bestuderen van hartcellen. Hiertoe zullen een groot aantal verschillende genen met behulp van adenovirale vectoren in zoogdiercellen tot expressie worden gebracht. De aanvrager is voornemens om de volgende werkzaamheden uit te voeren:

- a) elektrofysiologische metingen aan getransduceerde cellen in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking).
- b) metingen aan het hart van muizen (geïnjecteerd met getransduceerde cellen) met behulp van een 'magnetic resonance imager' (MRI). De MRI bevindt zich in een ruimte met inperkingsniveau D-I.

Adenovirale vector

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem. Er zijn 51 verschillende serotypes humane adenovirussen, welke geclassificeerd kunnen worden in zes groepen (A tot en met F). In de onderhavige adviesvraag wordt groep C serotype 5 adenovirus (hAd5) als basis gebruikt voor de adenovirale vector. Infectie met type 5 adenovirus kan leiden tot verkoudheidsverschijnselen. Immungecompromitteerde patiënten kunnen ernstig ziek worden, zoals nier- en longonsteking met eventueel fatale gevolgen. Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één soort of nauw verwante soorten (1;2;3).

Adenovirussen bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel (1;2). Het genoom van hAd5 is onderverdeeld in een vroege en late regio. De vroege regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie. De late regio komt pas tot expressie als de DNA replicatie gestart is. De vroege regio bevat onder andere het gen *E1*. De E1 eiwitten zijn betrokken bij de activering van de overige vroege en late genen en induceert DNA synthese van de gastheercel. In de gastheercel blokkeert E1 tevens de synthese van eiwitten en induceert het de expressie

van virale genen. Bovendien remt E1 apoptose (geprogrammeerde celdood) van de gastheercel (1;2;4).

Voor de vervaardiging van de eerste generatie adenovirale vectoren wordt de *E1* regio uit het adenovirusgenoom uitgewisseld met het gen van interesse (1). Aangezien het virus na verwijdering van *E1* (E1-hAd5) niet meer in staat is tot replicatie, is een helpercellijn noodzakelijk voor productie van de vector.

PER.C6 cellijn

De helpercellijn is tot stand gekomen door de *E1* regio uit hAd5 te plaatsen in het genoom van primaire humane embryonale retinoblasten. Dit leidt tot de E1 producerende helpercellijn PER.C6 (4).

Indien de E1 regio van de helpercellijn via homologe recombinatie terecht zou komen in de vector, zou een replicatiecompetent adenovirus (RCA) het gevolg kunnen zijn. Om dit tegen te gaan is de E1 regio van de cellijn dusdanig geconstrueerd dat er geen overlappende sequenties met E1-hAd5 aanwezig zijn (4).

De adviesvraag

De aanvrager heeft reeds een vergunning om transductie-experimenten uit te voeren met zoogdiercellen en eerste generatie adenovirale vectoren onder ML-II condities (IG 01-181). Daarnaast is het toegestaan om gesloten handelingen met getransduceerde cellen uit te voeren buiten inperking (IG 01-181/1).

De onderhavige adviesvraag heeft betrekking op omlaagschaling van werkzaamheden met proefdieren en open handelingen met getransduceerde cellen. Er wordt gebruik gemaakt van specifieke meetapparatuur welke is gesitueerd in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor de beoogde werkzaamheden.

De aanvrager geeft aan dat de vector geproduceerd is in de PER.C6 cellijn waardoor het vectorpreparaat geen E1-positieve en replicatiecompetente bijproducten bevat. Hij acht het niet noodzakelijk om de virusbatch te testen op de aanwezigheid van RCA.

Handelingen met getransduceerde cellen

De transductie van primaire zoogdiercellen (afkomstig van de mens en verschillende dieren waaronder muis, kat en koe) met adenovirale vectoren geschiedt in 10 cm² kweeschaaltjes onder ingeperkt gebruik (ML-II). Afhankelijk van het celtype worden 2 x 10⁵ tot 10⁶ cellen uitgezaaid. Vervolgens vindt infectie van de zoogdiercellen plaats met E1-hAd5 vector waarbij de concentratie van 1 tot 100 TCID₅₀/cel (Tissue Culture Infecting Dose: de concentratie viruspartikels nodig om 50% van de cellen te infecteren) gehanteerd wordt in een totaalvolume van 1 ml inoculum. Na zestien uur

incubatie wordt het inoculum verwijderd, waarna de cellen twee maal gedurende één minuut gewassen worden met 2 ml fysiologisch zout. Twee tot drie dagen na infectie wordt deze wasprocedure herhaald. De cellen worden vervolgens twee dagen gekweekt in 1.5 ml kweekmedium waaraan 50 µl (gezuiverd) humaan totaal immunoglobulinepreparaat (IgG) is toegevoegd. Het IgG heeft een hoge titer aan hAd5-neutraliserende antistoffen. Eventueel aanwezige adenovirale deeltjes worden hierdoor geïnactiveerd. Van elk nieuw IgG preparaat wordt de titer aan neutraliserende antistoffen gericht tegen hAd5 bepaald. De cellen worden naar een andere locatie vervoerd conform de wetgeving op het gebied van transport van gevaarlijke stoffen over de weg en bijlage 9 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (5). Vervolgens wordt onderscheid gemaakt tussen de volgende twee metingen.

Metingen aan getransduceerde cellen

Op de nieuwe locatie worden de zoogdiercellen in een ML-II ruimte nogmaals gewassen volgens de gestelde procedure en behandeld met trypsine. De cellen worden overgebracht in nieuwe kweekschaltes, al dan niet in aanwezigheid van rattencardiomyocyten. Kweek geschiedt in medium waaraan humaan totaal IgG is toegevoegd. Na ten minste 16 uur worden de cellen vervoerd naar een ruimte buiten inperking voor de 'patch clamp' analyse.

Met behulp van de zogenaamde 'patch clamping' methodiek worden metingen aan de cellen verricht. Patch clamping heeft als doel om ionenstromen over het membraan van één cel te meten. Hiertoe wordt het kweekschaltesje open onder een microscoop geplaatst, waarna met behulp van een pipet een individuele cel geïsoleerd wordt. Vervolgens vinden de metingen plaats.

Bij het aanzuigen van een cel kan aërosolvorming optreden. Hiertoe is een extra afzuiging geplaatst boven de apparatuur. De aanvrager geeft verder aan dat de apparatuur die eventueel in aanraking kan komen met de cellen (microscopetafel en pipethouder) gereinigd wordt met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol. Daarnaast wordt de omgeving (kast en inhoud) van de meetopstelling gereinigd na afloop van de werkzaamheden. Bovendien wordt de pipet na iedere meting vervangen.

Metingen op proefdieren

De cellen worden onder DM-II niveau geïnjecteerd in proefdieren (muizen) die gehuisvest zijn in filtertopkooien. De dieren zijn niet genetisch gemodificeerd. Naast een DM-II dierverslijf is op dezelfde locatie ook een D-I verblijf aanwezig. In dit verblijf is een veterinaire MRI geplaatst waarmee metingen op de proefdieren worden uitgevoerd. Voorafgaand aan de meting, worden de dieren onder narcose gebracht waarna ze in de MRI geplaatst worden. De dieren zijn volledig gefixeerd en worden gecontroleerd onder narcose gehouden.

Na beëindigen van de metingen worden de genarcotiseerde dieren weer teruggeplaatst in filtertopkooien en overgebracht naar het DM-II verblijf. De veterinaire MRI en de fixatiemiddelen worden na iedere meetsessie gedesinfecteerd met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol.

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

Overweging en advies

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van eerste generatie adenovirale vectoren. Risico's bij werkzaamheden met dergelijke vectoren hebben betrekking op een eventuele aanwezigheid van RCA en van vrije niet-replicerende adenovirale vectordeeltjes.

RCA vorming

RCA vorming zou mogelijk kunnen optreden tijdens de productie van de adenovirale vector, in getransduceerde primaire zoogdiercellen en na injectie van getransduceerde cellen in proefdieren. Hieronder wordt ingegaan op deze drie situaties.

RCA vorming bij de vectorproductie

In hoeverre kan RCA vorming optreden tijdens vectorproductie? De E1 regio die noodzakelijk is voor replicatie ontbreekt in adenovirale vectoren. Hierdoor is E1-hAd5 replicatiedeficiënt. De helpercellijn bevat de coderende sequentie van de E1 regio. Als gevolg van homologe recombinatie van de E1 regio tussen de cellijn en E1-hAd5, zou de vector replicatiecompetent kunnen worden.

De aanvrager geeft aan dat de PER.C6 cellijn de basenparen 459 tot en met 3510 van de E1 regio van het hAd5 genoom bevat. Voor de productie van verschillende adenovirale vectoren worden plasmiden gebruikt. Deze plasmiden bezitten de delen van het adenovirale genoom welke geen overlap vertonen met de E1 regio in de helpercellijn. Daarnaast zijn in de cellijn de promotor en het zogenaamde polyadenyleringssignaal (poly A signaal) van *E1* vervangen door genen welke niet afkomstig zijn van adenovirussen. Deze genen vertonen geen overeenkomst met de promotor en het polyA signaal in de gebruikte plasmiden.

Gezien het bovenstaande is homologe recombinatie van de E1 regio tussen PER.C6 cellen en de hAd5 vector uit te sluiten. Dit wordt ondersteund door een groot aantal

onderzoeken waarbij, ondanks gevoelige detectiemethodes, geen RCA vorming kon worden aangetoond (4;6). De COGEM is daarom van mening dat de kans op RCA vorming door homologe recombinatie, tijdens vectorproductie, verwaarloosbaar klein is. De COGEM stemt in met de door het ministerie gestelde aanvullende maatregel waarbij besmetting van de vector met wildtype virus van buitenaf voorkomen dient te worden. Hierdoor zijn activiteiten met wildtype adenovirussen of RCA bevattende vectorstocks tijdens de vectorproductie niet toegestaan in dezelfde ruimte.

RCA vorming in getransduceerde cellen

Indien in het uitzonderlijke geval primaire zoogdiercellen besmet zijn met wildtype adenovirussen zou recombinatie kunnen optreden, met eventueel replicatiecompetente vectoren als gevolg.

Primaire cellen zouden besmet kunnen zijn met adenovirussen op het moment van isolatie uit mens of dier. De COGEM adviseert daarom dat wanneer niet bekend is of de donor van de cellen vrij is van adenovirussen, de primaire cellen na isolatie getest moeten worden op afwezigheid van adenovirussen. Pas als blijkt dat de zoogdiercellen niet besmet zijn, zijn open handelingen met deze cellen buiten inperking mogelijk zonder risico's voor mens en milieu.

Daarnaast zouden getransduceerde cellen tijdens de kweek van buitenaf besmet kunnen raken via een geïnfecteerde laboratoriummedewerker of via andere werkzaamheden met adenovirussen in het veiligheidskabinet. De kans op besmetting van cellen met adenovirussen van buitenaf lijkt zeer klein aangezien de cellen gekweekt worden in een klasse II veiligheidskabinet. Dit betekent dat de medewerker beschermd is tegen organismen waarmee in het kabinet wordt gewerkt. Tegelijkertijd zijn de cellen in het kabinet beschermd tegen mogelijke organismen van buitenaf. Om de kans op besmetting van zoogdiercellen met adenovirussen verder te minimaliseren heeft het ministerie de volgende aanvullende maatregel opgesteld. Wanneer handelingen met andere virusbevattende kweken in een veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden, is het noodzakelijk om 30 minuten te wachten alvorens werkzaamheden met getransduceerde cellen in dit kabinet uit te voeren. De COGEM stemt in met deze maatregel.

Met de gestelde werkprocedure en de aanvullende maatregelen acht de COGEM de op kans op RCA vorming verwaarloosbaar klein.

RCA vorming tijdens dierproeven

De kans op RCA vorming door recombinatie en mobilisatie van muizen adenovirussen met E1-hAd5, na injectie van getransduceerde cellen in proefdieren, is verwaarloosbaar klein. RCA's kunnen alleen gevormd worden als de proefdieren geïnfecteerd zijn met muizen adenovirussen. Volgens geraadpleegde deskundigen is het nagenoeg uitgesloten dat geregistreerde proefdiercentra in Nederland dieren leveren welke geïnfecteerd zijn met muizen adenovirussen (7). De centra volgen de

aanbevelingen van de Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) over micro-organismen en virussen die aanwezig mogen zijn in proefdieren. Dit orgaan stelt dat proefdieren onder andere vrij moeten zijn van muizen adenovirussen. Om hiervoor zorg te dragen vindt regelmatig screening op aanwezigheid van adenovirussen bij proefdieren plaats.

Indien in het onwaarschijnlijke geval toch dieren besmet zijn geraakt met muizen adenovirussen dan is de COGEM van mening dat de kans op recombinatie zeer klein is. De sequentie homologie tussen muizen adenovirussen en de humane adenovirussen is laag. Indien onverhoopt toch recombinatie optreedt, is de kans dat het *E1* gen uit het muizen adenovirus op de juiste plaats in de vector wordt ingebouwd én daardoor een replicatiecompetent virus met het transgen ontstaat verwaarloosbaar klein.

Verwijderen van vectordeeltjes

Replicatiedeficiënte vectordeeltjes hebben het vermogen tot infectie nog niet verloren. Daarom dienen, alvorens getransduceerde cellen buiten inperking te hanteren, de celkweken vrij te zijn van adenovirale deeltjes om verspreiding via aërosolen te voorkomen. Hiertoe worden getransduceerde cellen een aantal malen gewassen met fysiologisch zout en behandeld met trypsine. De COGEM acht het aannemelijk dat elke wasstap het aantal vrije vectordeeltjes 20 maal reduceert. Na zes wasstappen wordt op deze manier een reductie van $6,4 \times 10^7$ (20^6) behaald. Aangezien de concentratie van het inoculum niet bekend is, kan niet berekend worden of de reductie voldoende is om alle vrije deeltjes weg te wassen. De aanvrager geeft aan dat de eventueel nog aanwezige vrije deeltjes én vectordeeltjes die gehecht zitten aan de buitenzijde van cellen, verwijderd worden door de cellen te kweken in aanwezigheid van IgG. Eerder heeft de COGEM aangegeven dat het wassen met humaan immunoglobuline met een hoge titer aan adenovirus neutraliserende activiteit een efficiënt alternatief is om cellen vrij te krijgen van vectordeeltjes (8). Zij is van mening dat de gehanteerde was- en kweekprocedures het aantal vrije deeltjes terugbrengt naar een verwaarloosbaar kleine hoeveelheid. Tezamen met de voorgestelde aanvullende maatregelen, waaronder het dragen van persoonlijke beschermingsmiddelen, acht de commissie de risico's verwaarloosbaar klein.

De COGEM merkt op dat wanneer de adenovirale partikels worden opgenomen door cellen, de deeltjes hun eiwitmantel verliezen. Hiermee gaat ook het vermogen om andere cellen te infecteren, verloren. Bij een eventuele lysatie (stukgaan) van cellen zullen daarom geen infectieuze adenovirale deeltjes kunnen vrijkomen.

Vrijkomen van proefdieren

De kans dat proefdieren tijdens werkzaamheden met betrekking tot de MRI ontsnappen is verwaarloosbaar klein. De MRI bevindt zich in een D-I verblijf waaruit

ontsnapping niet mogelijk is. Daarnaast worden de dieren onder narcose in de MRI geplaatst alwaar ze gefixeerd worden. De narcose wordt gecontroleerd zodat de dieren tijdens het verblijf buiten de DM-II ruimte onder algehele verdoving zijn.

Aanvullende maatregelen

De aanvrager heeft voor de electrofysiologische metingen aanvullende werk- en desinfectievoorschriften opgesteld. Een voorbeeld hiervan is de desinfectieprocedure waarbij ontsmet wordt met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol. De COGEM acht de door de aanvrager opgestelde voorschriften en werkprocedures adequaat in combinatie met de volgende, door het ministerie voorgestelde, aanvullende maatregelen. Ten eerste zijn activiteiten met wildtype adenovirussen of RCA bevattende stocks niet toegestaan in dezelfde ruimte tijdens productie van en handelingen met E1-hAd5 vectoren. Ten tweede is het niet toegestaan om werkzaamheden met getransduceerde cellen uit te voeren binnen een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met andere virusbevattende kweken in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden. De COGEM voegt hieraan toe dat wanneer niet bekend is of de donor van de primaire cellen vrij is van adenovirussen, deze cellen na isolatie getest moeten worden op afwezigheid van adenovirussen. Pas als blijkt dat de primaire zoogdiercellen niet besmet zijn, zijn open handelingen met deze cellen buiten inperking mogelijk zonder risico's voor mens en milieu.

Ook voor handelingen met proefdieren heeft de aanvrager aanvullende werk- en desinfectievoorschriften opgesteld. Om risico's verder te minimaliseren zijn tevens de volgende door het ministerie opgestelde maatregelen van toepassing:

- de dieren worden gehuisvest in filtertopkooien;
- open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, dienen in een klasse II veiligheidskabinet uitgevoerd te worden;
- het dragen van passende beschermende kleding;
- het dragen van polshorloges en sieraden aan armen en handen is verboden;
- na afloop van de werkzaamheden wordt de kleding in de werkruimte achtergelaten;
- tijdens de werkzaamheden is de deur (voorzien van een biorisicotek en afsluitbaar) van de MRI-ruimte gesloten
- de dieren dienen verdoofd te worden in de DM-II ruimte waarna ze vervoerd worden naar de MRI-ruimte alwaar de dieren tijdens de MRI metingen onder narcose gehouden worden;
- het transport van de dieren van DM-II naar D-I vindt plaats in filtertopkooien;
- na de meting worden de genarcotiseerde dieren teruggeplaatst in een filtertopkooi en naar het DM-II verblijf vervoerd.

Omdat in de onderhavige adviesvraag sprake is van werkzaamheden in een ruimte buiten inperking, wijst de COGEM erop dat de laboranten moeten werken volgens de algemeen aanvaarde 'veilige microbiologische technieken'.

Concluderend is de COGEM van mening dat, met in acht name van de gestelde aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van elektrofysiologische metingen met open kweekschalmpjes in een ruimte buiten inperking, én metingen aan geïnjecteerde proefdieren in een D-I ruimte, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. McConnell, M.J. en Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15:1022-1033.
2. Knipe DM and Howley PM (2001). *Fields virology*, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
3. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
4. Nichols, W.W., Lardenoije, R., Ledwith, B.J. et al. (2002). Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Academic Press, San Diego, USA.
5. VROM; Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2004).
6. Lusky, M. (2005). Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials. *Hum. Gene Ther.* 16: 281-291.
7. Geraadpleegde deskundige: Jan-Bas Prins, Universiteit Leiden.
8. COGEM advies CGM/050831-02. COGEM (2005). Handelingen met adenovirale getransduceerde cellen buiten inperking.