

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 20 december 2013  
**KENMERK** CGM/131220-01  
**ONDERWERP** Advies omlaagschaling van retroviraal getransduceerde humane cellen voor langdurige kweek

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een aanvraag tot wijziging van de vergunning IG 05-020 met de titel 'Retroviraal gemedieerde transductie van hematopoietische stamcellen *ex vivo* en *in vivo*' van het Erasmus Universitair Medisch Centrum, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde humane cellen. Transductie vindt plaats met een vector die gebaseerd is op het *Murine leukemia virus*. De vector is in staat om verschillende soorten cellen te infecteren, waaronder humane cellen. De aanvrager wil de langdurige kweek van de getransduceerde cellen uitvoeren op het laagste inperkingsniveau, ML-I.

Een mogelijk risico bij langdurige kweek is de aanwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR). RCR kan gevormd worden tijdens de productie van de vector, maar ook na insleep van replicatiecompetente retrovirussen bij de kweekwerkzaamheden. De aanvrager wil de product-enhanced reverse transcriptase (PERT) test gebruiken om vast te stellen of er RCR aanwezig is.

De COGEM is van mening dat voordat langdurige kweek op ML-I niveau kan plaatsvinden, de getransduceerde cellen getest moeten worden op afwezigheid van RCR, dit kan middels de PERT test. Daarnaast acht de COGEM een aantal aanvullende voorschriften noodzakelijk om te voorkomen dat tijdens de kweekwerkzaamheden onder ML-I RCR gevormd wordt door insleep van replicatiecompetente virussen.

Met in acht neming van deze voorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenoemde handelingen verwaarloosbaar klein.



# Omlaagschaling van retroviraal getransduceerde humane cellen voor langdurige kweek

## COGEM advies CGM/131220-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen. De transductie van humane cellen met een VSV-G gepseudotyperde retrovirale vector vindt plaats onder inperkingsniveau ML-II. De aanvrager verzoekt de getransduceerde cellen voor langdurige kweek over te mogen brengen naar ML-I inperkingsniveau.

### *De retrovirale vector*

Retrovirussen (*Retroviridae*) zijn RNA virussen die veelvuldig worden toegepast als genoverdrachtsysteem. Een dergelijk systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van een geïnfecteerde cel. Er worden diverse retrovirale vectoren voor dit doel gebruikt, waaronder lentivirale vectoren die afgeleid zijn van het *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) en vectoren gebaseerd op het *Murine leukemia virus* (MLV). In dit wijzigingsverzoek wordt een vector beschreven die gebaseerd is op nauw aan MLV verwante virussen.

De vector SF91 is replicatiedeficiënt door het ontbreken van de *gag*, *pol* en *env* genen. De *gag* eiwitten vormen de matrix- en kapsleiwitten en de nucleoproteïnen van het virus. *Pol* codeert voor enzymen die nodig zijn voor replicatie en integratie van het virale genoom in het DNA van de gastheer. Het gen *env* codeert voor het oppervlakte-eiwit dat nodig is voor herkenning van cellen en daarmee voor de infectie. Deze onderdelen zijn essentieel voor replicatie en virulentie. De vector bevat *Long Terminal Repeat* (LTR) sequenties afkomstig van zowel Spleen focusing-forming virus (SFFV) en Murine embryonic stem cell virus (MESV). Deze LTRs zijn essentieel voor de replicatie van het virus. Al deze virussen behoren tot het *Gammaretrovirus* genus van de familie *Retroviridae*.<sup>1</sup> De COGEM is niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat de genoemde virussen pathogeen zijn voor de mens.

### *Spleen focusing-forming virus*

Het SFFV is een replicatiedeficiënt virus dat afkomstig is van een recombinatie tussen het Friend murine leukemia virus (FrMLV) en sequenties die coderen voor een *env* gen die endogeen in de muis aanwezig is. Het virus is betrokken bij de ontwikkeling van acute erythroleukemie in muizen.<sup>2</sup> De ontwikkeling van dit ziektebeeld door het virus wordt gebruikt als model voor het bestuderen van de moleculaire basis van bepaalde vormen van bloedkanker in mensen.<sup>2</sup>

### *Murine embryonic stem cell virus*

MESV is een retrovirale vector die is afgeleid van een mutant van het Myeloproliferative sarcoma virus, genaamd PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV).<sup>3</sup> Dit virus komt tot expressie in embryonale carcinoma's, maar niet in embryonale stamcellen. Doordat bepaalde sequenties in de 5' untranslated regions vervangen zijn met sequenties afkomstig van een mutant van

Moloney murine leukemia (MoMLV) virus, is MESV zowel actief in embryonale carcinoma's als in embryonale stamcellen van de muis.<sup>3</sup>

### **Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is van plan om retrovirale deeltjes te produceren door humane 293T cellen te co-transfecteren met drie verschillende plasmiden. Het eerste plasmide is de transfervector, SF91.LoxP.eGFP.LoxP.eBFPco.bPRE dat coderende sequenties bevat voor de marker-eiwitten 'green fluorescent protein' (GFP) en 'blue fluorescent protein' (BFP) en voor het Cre recombinase. Het tweede plasmide betreft een packagingconstruct dat zorgt voor de expressie van de structurele eiwitten Gag en Pol. Het derde plasmide is een expressieconstruct voor VSV-G, waarmee het retrovirusdeeltje gepseudotypeerd wordt. De geproduceerde deeltjes zullen gebruikt worden om humane acute myelocytic leukemie K562 cellen te infecteren. De aanvrager wil de getransduceerde cellen langdurig in kweek houden. Daarom verzoekt hij de getransduceerde cellen over te mogen brengen naar ML-I inperkingsniveau, als er een reductiefactor gerealiseerd is die minimaal 100 maal hoger is dan het aantal deeltjes in het inoculum, en de cellen negatief getest zijn op de aanwezigheid van RCR.

De aanwezigheid van RCR wil de aanvrager analyseren met behulp van de 'product-enhanced reverse transcriptase' (PERT) test. In deze testmethode wordt gebruik gemaakt van het 'reverse transcriptase (RT)' van het virus zelf om een RNA substraat om te zetten in cDNA.<sup>4</sup> Dit cDNA wordt geamplificeerd en gemeten d.m.v. real-time PCR.<sup>5</sup> De aanvrager heeft de PERT test laten uitvoeren bij het 'Institut für Medizinische Virologie' van de universiteit van Zurich om aan te tonen dat de monsters geen RCR bevatten. De PERT test heeft een gevoeligheid van 1 RCR deeltje in een reactievolume van 40 µl.

### **Adviesvraag**

De COGEM is verzocht advies uit te brengen over het omlaagschalen van humane cellijn die getransduceerd is met een genetisch gemodificeerd VSV-G gepseudotypeerd retrovirus. De afwezigheid van RCR vormt een belangrijke voorwaarde voor een dergelijke omlaagschaling. De aanvrager is voornemens dit te testen met de PERT test. De COGEM is gevraagd of de PERT test geschikt is om de aanwezigheid van RCR te testen.

Daarnaast is zij gevraagd of het te analyseren monster voorafgaand aan de PERT test geamplificeerd moet worden op permissieve cellen om de aanwezigheid van RCR met een nog hogere gevoeligheid te kunnen detecteren.

Ook is de COGEM gevraagd of de PERT test algemeen gebruikt kan worden voor de detectie van RCR in andere humane cellijnen die getransduceerd zijn met een VSV-G gepseudotyperde retrovirale vector.

### **Eerder COGEM advies**

In het verleden heeft de COGEM adviezen uitgebracht over de omlaagschaling van handelingen met cellen die met een op MoMLV gebaseerde vector getransduceerd waren.<sup>6,7,8</sup> In deze adviezen betrof het een tijdelijke omlaagschaling voor specifieke werkzaamheden. Op grond van de volgende argumenten heeft de COGEM in twee adviezen positief geadviseerd over het uitvoeren van de

voorgenomen werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau.<sup>6,7</sup> Ten eerste omdat de cellen middels een gevalideerde RT-PCR werden getest op afwezigheid van RCR. Ten tweede, waren de cellen tijdens de langdurige kweekperiode vaak doorgezet, waardoor eventuele vrije virusdeeltjes van de infectie gereduceerd waren tot niet-detecteerbare hoeveelheden. Om eventuele risico's als gevolg van de werkzaamheden verder te minimaliseren, heeft de COGEM destijds aanvullende voorschriften opgesteld. In een derde advies stelde de COGEM dat zij de aanwezigheid van RCR niet uit kon sluiten en heeft de COGEM geadviseerd de voorgenomen flow cytometrie analyse van de retroviraal getransduceerde muizencellen op ML-II in te schalen.<sup>8</sup>

## **Overweging en advies**

### *Productiesysteem*

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van een humane cellijn die getransduceerd is met een VSV-G gepseudotyperde retrovirale vector. Een risico bij de productie van dit soort vectoren is het ontstaan van RCR. Door gebruik te maken van een productiesysteem waarbij de benodigde virale genen en de transgenen verdeeld zijn over meerdere plasmiden kan de kans op RCR worden gereduceerd. Wanneer er een grote sequentieovereenkomst is tussen de gebruikte plasmiden kan er homologe recombinatie plaatsvinden. Uit de aangeleverde informatie is het onduidelijk hoeveel sequentieovereenkomst bestaat tussen de gebruikte plasmiden, waardoor homologe recombinatie niet uitgesloten kan worden. Hierdoor kan de COGEM niet uitsluiten dat RCR ontstaat tijdens de productie.

Gezien de aard van de gebruikte transfervector bestaat het risico dat na superinfectie met een wildtype retrovirus mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheercel plaatsvindt. Gezien het beschreven productiesysteem is de COGEM van mening dat er getest moet worden op de afwezigheid van RCR voor het omlaagschalen van langdurige kweek naar ML-I inperkingsniveau.

### *RCR testen en vrije vectordeeltjes*

De aanvrager wil de retroviraal getransduceerde cellen van ML-II inperkingsniveau overbrengen naar ML-I voor langdurige kweek. Om de eventuele aanwezigheid van RCR te detecteren wil de aanvrager gebruik maken van de PERT test die een gevoeligheid heeft van 1 viruspartikel per reactievolume van 40 µl. Volgens de aanvrager zijn de cellen voordat ze overgebracht worden naar ML-I dusdanig vaak gewassen dat een reductiefactor van >100 bereikt is.

De COGEM acht voorgestelde PERT test een voldoende gevoelige en adequate methode om de aanwezigheid van RCR te detecteren. Zij is daarbij van mening dat de kwaliteit van de PERT test onafhankelijk is van de gebruikte cellijn en daarom ook voor de analyse van RCR in andere humane retroviraal getransduceerde cellen gebruikt kan worden. Zij merkt daarbij op dat de gevoeligheid van de test vergelijkbaar is met de standaard RT-PCR test en acht een amplificatieronde op een gevoelige cellijn niet noodzakelijk. Omdat de PERT test gebaseerd is op de detectie van RT activiteit, is deze test ook geschikt voor het detecteren van andere retrovirussen dan MLV.

### *Insleep van retrovirussen*

De COGEM wijst erop dat 10% van de muizencellijnen die in de laboratoria gebruikt worden, geïnfecteerd zijn met retrovirussen. Dit wordt mede veroorzaakt door het feit dat infectie niet leidt tot morfologische veranderingen van de cellen en daardoor niet opgemerkt wordt. Indien niet gecontroleerd wordt op de aanwezigheid van retrovirussen, kan de COGEM niet uitsluiten dat onbewust retrovirus ingesleept wordt in de kweek van de retroviraal getransduceerde cellen.

Gezien de aard van de vector kan een superinfectie van de getransduceerde cellijn met een retrovirus leiden tot mobilisatie van de vector uit de getransduceerde cellen. Om de kans op mobilisatie van de vector op ML-I inperkingsniveau te minimaliseren, acht de COGEM de volgende aanvullende maatregelen noodzakelijk. Ten eerste mogen in de kweekruimte waarin met de retroviraal getransduceerde cellen gewerkt wordt, geen werkzaamheden worden verricht met muizencellen. Tevens moet voor de humane cellen die in dezelfde kweekruimte worden gekweekt, zijn aangetoond dat ze negatief zijn voor retrovirussen. Om de kans op mobilisatie verder te reduceren, acht de COGEM het noodzakelijk dat de getransduceerde cellen iedere drie maanden getest moeten worden op de afwezigheid van RCR.

### **Conclusie**

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn indien de langdurige kweek van de beschreven retroviraal getransduceerde cellen plaatsvindt op ML-I niveau met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- de getransduceerde cellen dienen met de voorgestelde gevalideerde methode (PERT test) getest te zijn op afwezigheid van RCR,
- het transport van de genetisch gemodificeerde cellen van het ML-II naar het ML-I laboratorium dient plaats te vinden in een gesloten, breukvaste, lekdichte houder, die voor vervoer uitwendig wordt ontsmet,
- open werkzaamheden op ML-I inperkingsniveau moeten plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse 2,
- in de kweekruimte mogen geen muizencellen gekweekt te worden, en humane cellen moeten getest zijn op de afwezigheid van retrovirussen,
- de retroviraal getransduceerde cellen moeten iedere drie maanden met een gevalideerde methode (PERT test) getest worden op de afwezigheid van RCR.

### **Referenties**

1. Goff SP (2007). Retroviridae: The retroviruses and their replication. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1401-1441
2. Cmarik J & Ruscetti S (2010). Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase sf-Stk and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. *Viruses* 2:2235-2257

3. Grez M *et al.* (1990). Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 87:9202-9206
4. Pyra H *et al.* (1994). Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(4):1544-8
5. Bürgisser P *et al.* (2000). Performance of five different assays for the quantification of viral load in persons infected with various subtypes of HIV-1. Swiss HIV Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 23(2):138-44
6. COGEM (2005). Handelingen met langdurig gekweekte retroviraal getransduceerde humane cellen in een ML-I ruimte. COGEM advies CGM/050623-01
7. COGEM (2007). Omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/070405-02
8. COGEM (2009). Inschaling van flow cytometrie analyse van retroviraal getransduceerde muizencellen. COGEM advies CGM/090731-01