

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

DATUM 28 februari 2014
KENMERK CGM/140228-01
ONDERWERP Advies: Inschaling retrovirale vectoren afkomstig van ecotrope muizenretrovirussen

Geachte mevrouw Mansveld,

Gezien de huidige wetenschappelijke kennis over de in cellijnen aanwezige retrovirus-sequenties en de invloed daarvan op de biologische inperking van retrovirale vectoren die afgeleid zijn van ecotrope muizenretrovirussen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

Van oudsher nemen werkzaamheden met retrovirale vectoren die afgeleid zijn van ecotrope muizenretrovirussen een aparte positie in de Regeling ggo in. Dit komt voort uit het feit dat deze retrovirussen alleen muizen- en rattencellen kunnen infecteren en zich alleen in dit type cellen kunnen vermenigvuldigen. Deze retrovirale vectoren worden in combinatie met niet-muizen en niet-ratten cellen als biologische ingeperkt beschouwd waardoor *in vitro* werkzaamheden voor omlaagschaling in aanmerking komen.

In de wetenschappelijke literatuur is de afgelopen jaren een toenemend aantal studies gepubliceerd die er op wijzen dat een substantieel deel van zowel laboratoriumspecifieke cellijnen als commerciële beschikbare cellijnen retrovirus-sequenties bevatten. De aanwezigheid van deze sequenties kan van invloed zijn op de biologische inperking van bovengenoemde retrovirale vectoren.

Met het oog op de veiligheid voor mens en milieu is de COGEM van mening dat de omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met retrovirale vectoren die afgeleid zijn van ecotrope muizenretrovirussen in combinatie met niet-muizen- en niet-rattencellen alleen overwogen dient te worden als aan bepaalde voorwaarden wordt voldaan. Deze voorwaarden zijn nader uiteen gezet in het advies. Indien dit niet het geval is, adviseert de COGEM deze *in vitro* werkzaamheden met betreffende retrovirale vectoren op ML-II in te schalen.

Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met ecotrope muizen retrovirussen

COGEM advies CGM/140228-01

Inleiding

Van oudsher nemen werkzaamheden met ecotrope muizenretrovirussen waarbij genetische modificatie wordt toegepast, een aparte positie in de Regeling ggo in. Dit komt voort uit het feit dat deze retrovirussen alleen muizen- en ratten-cellen kunnen infecteren en zich alleen in dit type cellen kunnen vermenigvuldigen. In de wetenschappelijke literatuur is de afgelopen jaren een toenemend aantal studies gepubliceerd die er op wijzen dat een substantieel deel van zowel laboratoriumspecifieke cellijnen als commercieel beschikbare cellijnen retrovirussequenties bevatten. De aanwezigheid van deze sequenties kan van invloed zijn op de biologische inperking van de retrovirale vectoren die van ecotrope muizenretrovirussen zijn afgeleid. Met het oog op de veiligheid voor mens en milieu is de COGEM van mening dat de aparte positie van deze groep retrovirussen alleen gehandhaafd kan blijven als aan bepaalde voorwaarden wordt voldaan.

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). MLV behoort tot de gammaretrovirussen. De gammaretrovirussen kunnen worden ingedeeld op basis van hun gastheerbereik. Ecotrope retrovirussen zijn retrovirussen die zich alleen vermenigvuldigen in de gastheersoort waaruit ze zijn geïsoleerd. Xenotrope retrovirussen infecteren voornamelijk gastheerssoorten anders dan die waaruit ze zijn geïsoleerd. Een ecotroop muizenretrovirus kan van nature alleen muizen- en ratten-cellen infecteren, en zich in deze cellen vermenigvuldigen.

Bij het gebruik van lentivirale vectoren voor gentherapietoepassingen wordt tegenwoordig vrijwel standaard het gastheerbereik uitgebreid door de vectoren te pseudotyperen met VSV-G. Met een dergelijke techniek is het ook mogelijk om het gastheerbereik van ecotrope muizenretrovirussen uit te breiden naar niet-muizencellen en niet-rattencellen.

Eerder COGEM advies

Conform de Regeling worden *in vitro* werkzaamheden met replicatiecompetente virussen behorend tot pathogeniteitsklasse 2, 3 of 4, ingeschaald op het overeenkomstige inperkingsniveau ML-II, ML-III of ML-IV.¹ In een aantal gevallen is het mogelijk om met replicatiedeficiënte virussen *in vitro* werkzaamheden uit te voeren op een lager inperkingsniveau. Echter, door contaminatie met wildtype virussen kunnen via complementatie of recombinatie de replicatiedeficiënte virussen zich verspreiden of kan replicatiecompetent virus ontstaan. Dit vereist vanuit milieurisico oogpunt een

hoger inperkingsniveau. In deze gevallen acht de COGEM het noodzakelijk dat de cellijnen vrij zijn van dergelijke contaminaties of sequenties.

In dit kader heeft de COGEM in haar generieke advies over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren en in haar advies over de controle van cellijnen voor een mogelijke omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden met lentivirale vectoren aangegeven het noodzakelijke te vinden dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van HIV-1, HIV-2, *Human T-lymphotropic virus* type 1 (HTLV-1), HTLV-2, *Simian immunodeficiency virus* (SIV) en andere relevante lentivirussen.^{2,3}

De mogelijke contaminatie van cellijnen in laboratoria is ook aan de orde gesteld in het COGEM advies over een verzoek tot omlaagschaling van retroviraal getransduceerde humane cellen voor langdurige kweek. In dit advies heeft de COGEM aangegeven dat muizencellijnen in de laboratoria regelmatig geïnfecteerd blijken te zijn met retrovirussen.⁴ Hierdoor kan zij het niet uitsluiten dat onbewust retrovirus ingesleept wordt in een kweek van retroviraal getransduceerde humane cellen. In dit geval kan dit leiden tot mobilisatie van de retrovirale vector uit de getransduceerde humane cellen. Om de kans op mobilisatie te minimaliseren heeft zij geadviseerd de volgende aanvullende maatregelen te hanteren:

- in de kweekruimte waarin met de retroviraal getransduceerde cellen gewerkt wordt, dienen geen werkzaamheden te worden verricht met muizencellen;
- voor de humane cellen die in dezelfde kweekruimte worden gekweekt, moet aangetoond zijn dat ze negatief zijn voor retrovirussen;
- de getransduceerde cellen dienen iedere drie maanden getest te worden op de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR).

Overweging

In de afgelopen jaren is veel onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van retrovirus als oorzaak voor humane ziekten als kanker, neurologische aandoeningen en ontstekingen.⁵ Hoewel de relatie tussen aanwezigheid van een retrovirus en ziekte door verschillende studies is gesuggereerd, zijn gepubliceerde resultaten niet altijd reproduceerbaar gebleken.⁵ Deze publicaties hebben aangetoond dat een substantieel deel van de cellijnen die voor wetenschappelijk onderzoek worden gebruikt retrovirussequenties bevatten.^{6,7,8} Dit is niet beperkt tot laboratoriumspecifieke cellijnen. Retrovirussequenties zijn ook aangetroffen in commercieel verkrijgbare cellijnen, en dit heeft geleid tot de contaminatie van verschillende commerciële 'live-attenuated' vaccins voor huisdieren met het katten endogene retrovirus RD-114.^{9,10} In het merendeel van de gevallen worden er echter slechts delen van het retrovirusgenoom in het genoom van cellijnen aangetroffen.

De COGEM wijst er hierbij op dat veelal niet wordt opgemerkt dat een cellijn retrovirussequenties bevat of infectieuze retrovirusdeeltjes uitscheidt, doordat een infectie met een retrovirus niet leidt tot celdood of morfologische veranderingen van de cellen.

Op basis van bovenstaande kan de COGEM niet uitsluiten dat er in laboratoria cellijnen worden gebruikt die ongemerkt retrovirussequenties bevatten of infectieus retrovirus uitscheiden, als de

cellen hier niet op gecontroleerd worden. Zij voegt daaraan toe dat indien er in de celkweek geen rekening wordt gehouden met de kans op kruiscontaminatie met retrovirussen en de cellen niet standaard worden gecontroleerd op de aanwezigheid hiervan, er de mogelijkheid bestaat op onbewuste aanwezigheid van retrovirussen in de celculturen.

Naar schatting kunnen ongeveer 10% van de muizencellijnen die in de laboratoria gebruikt worden, replicatiecompetente virussen produceren.^{6,7,8} Door de aanwezigheid van endogene retrovirussequenties in muizencellen, kan zij niet uitsluiten dat na infectie van muizencellen met een replicatiedeficiënte retrovirale vector die afgeleid is van muizenretrovirussen, homologe recombinatie optreedt, mobilisatie van de vector plaatsvindt of een replicatiecompetent retrovirus ontstaat. Indien de muizen- of rattencellen niet gecontroleerd worden op de aanwezigheid van replicatiecompetente retrovirussen, kan de COGEM de biologische inperking van een retrovirale vector die afgeleid is van ecotrope muizenretrovirussen, derhalve niet waarborgen.

De COGEM merkt hierbij op dat door enveloppe-pseudotypering van een replicatiedeficiënte retrovirale vector die afgeleid is van een ecotroop muizenretrovirus er ook werkzaamheden uitgevoerd kunnen worden in combinatie met niet-muizen- en niet-rattencellen. Zij wijst er op dat een dergelijk combinatie in theorie biologisch ingeperkt is. Door de mogelijke aanwezigheid van retrovirussequenties in deze gastheercellen, kan zij echter ook in deze situatie niet uitsluiten dat homologe recombinatie optreedt, mobilisatie van de vector plaatsvindt of een replicatiecompetent retrovirus ontstaat.

Advies

Gezien de huidige wetenschappelijke kennis is de COGEM van mening dat er retrovirale sequenties in verschillende typen cellijnen aanwezig kunnen zijn zonder dat de gebruiker zich hiervan bewust is. Hierdoor kan zij na infectie van bijvoorbeeld een humane cellijn met een genetisch gemodificeerd organisme (ggo) gebaseerd op een enveloppe-gepseudotypeerd ecotroop muizenretrovirus niet uitsluiten dat homologe recombinatie optreedt, ongemerkt mobilisatie van de vector plaatsvindt of een replicatiecompetent retrovirus ontstaat. Indien de te gebruiken cellijnen niet worden gecontroleerd op de aanwezigheid van retrovirussequenties, kan de COGEM de biologische inperking van ggo's gebaseerd op ecotrope muizenretrovirussen in combinatie met niet-muizen- of niet-rattencellen niet waarborgen.

Daarom adviseert zij de werkzaamheden met gepseudotypeerde ggo's die gebaseerd zijn op ecotrope muizenretrovirussen die in niet-muizen- en niet-rattencellen worden vervaardigd en waarmee niet-muizen- en niet-rattencellen worden geïnfecteerd alleen voor omlaagschaling in aanmerking te laten komen, als wordt voldaan aan de volgende voorwaarden:

- er vindt een scheiding plaats tussen de werkzaamheden met muizen- en rattencellen en retroviraal getransduceerde cellen in tijd en ruimte zodat de kans op kruiscontaminatie geminimaliseerd wordt. Voor de scheiding van werkzaamheden kan gedacht worden aan gescheiden laboratoriumruimtes of het gescheiden gebruik van veiligheidskabinetten.

- voor de gelijktijdige werkzaamheden met niet-muizen- en niet-rattencellen, moet aangetoond zijn dat deze negatief zijn voor gamma-retrovirussen.

Indien niet wordt voldaan aan deze voorwaarden adviseert zij deze werkzaamheden minimaal in te schalen op inperkingsniveau ML-II.

Referenties

1. VROM (2004). Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen
2. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
3. COGEM (2013). Controle van cellijnen. COGEM advies CGM/131002-01
4. COGEM (2013). Omlaagschaling van retroviraal getransduceerde humane cellen voor langdurige kweek. COGEM advies CGM/131220-01
5. Voisset C *et al.* (2008). Human RNA “rumor” viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:157-196
6. Hempel HA *et al.* (2013). Infection of xenotransplanted human cell lines by murine retroviruses: a lesson brought back to light by XMRV. *Front. Oncol.* doi: 10.3389/fonc.2013.00156
7. Agoni L *et al.* (2013). Detection of human endogenous retrovirus K (HERV-K) transcripts in human prostate cancer cell lines. *Front. Oncol.* doi: 10.3389/fonc.2013.00180
8. Sheperd AJ *et al.* (2003). Characterisation of endogenous retrovirus in rodent cell lines used for production of biologicals. *Biologicals* 31: 251-260
9. Miyazawa T *et al.* (2010). Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets. *J. Virol.* 84:3690-3694
10. Yoshikawa R *et al.* (2011). Contamination of infectious RD-114 virus in vaccines produced using non-feline cell lines. *Biologicals* 39:33-37