

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 10 juli 2006
KENMERK CGM/060710-01
ONDERWERP Advies handelingen met lentiviraal getransduceerde cellen in apen (IG 05-020/03)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag “Lentiviraal gemedieerde transductie van hematopoietische stam/voorlopercellen” van het Erasmus Universitair Medisch Centrum te Rotterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met beenmergcellen die geïnfecteerd zijn met derde generatie lentivirale vectoren. Deze cellen worden getransplanteerd in bestraalde apen. De aanvrager heeft verzocht de werkzaamheden met de apen te mogen uitvoeren op DM-II in plaats van DM-III inperkingsniveau.

De COGEM heeft driemaal eerder deels negatief geadviseerd over deze aanvraag. Onder andere was niet uit te sluiten dat vrije replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes afkomstig uit het oorspronkelijke inoculum in het transplantaat aanwezig zouden zijn op het moment van toediening aan de apen. Naar aanleiding hiervan heeft de aanvrager nieuwe informatie aangeleverd. Hieruit concludeert de COGEM dat de gehanteerde methode waarmee de reductie van vrije lentivirale vectordeeltjes bewerkstelligd wordt, adequaat is wanneer de te transplanteren stamcellen met een inoculumdosis van maximaal $3,4 \times 10^7$ vectordeeltjes getransduceerd worden. In deze situatie adviseert de COGEM dat handelingen met apen op DM-II niveau kunnen plaatsvinden. Indien de inoculumdosis hoger is, dienen de werkzaamheden, bij de beschreven kweek- en wasprocedure, in een DM-III verblijf plaats te vinden.

Daarnaast heeft de aanvrager aangevraagd om bepaalde analyses (flow cytometrie) met cellen afkomstig van de apen niet op ML-II niveau maar buiten inperking uit te voeren. Hierover adviseert de COGEM dat handelingen met cellen die gefixeerd zijn in een 4% paraformaldehyde oplossing buiten inperking kunnen plaatsvinden aangezien deze oplossing (getransduceerde) cellen inactiveert.

Verder acht de COGEM de door Bureau GGO opgestelde aanvullende voorschriften voldoende om eventuele risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein te maken.

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 large, stylized initial 'Z' followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

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

Inschaling van handelingen met lentiviraal getransduceerde stamcellen in associatie met apen

COGEM advies CGM/060710-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de omlaagschaling van handelingen met lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen. Op 30 maart en 27 mei 2005 en op 2 mei jl. heeft de COGEM advies uitgebracht over deze omlaagschaling (CGM/050330-01, CGM/050527-01 en CGM/060502-05) (1;2;3).

De aanvrager was voornemens om uit resusapen (*Macaca mulatta*) geïsoleerde hematopoietische stamcellen te infecteren met derde generatie 'self-inactivating' (SIN) lentivirale vectoren. Middels transfectie met lentivirale vectoren worden een reporter gen (GFP), of signaaltransductiegenen in combinatie met een reporter gen (STAT5a-GFP, STAT5b-GFP), in de stamcellen tot expressie gebracht. Vervolgens worden de getransduceerde stamcellen in apen teruggeplaatst. Deze apen zijn voorafgaand aan de transplantatie sublethaal bestraald waardoor onder andere beenmergstamcellen en cellen van het afweersysteem sterk verzwakt of afgedood zijn. De aanvrager heeft verzocht om deze dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau te mogen uitvoeren. Volgens de regels worden handelingen met apen in associatie met lentivirale vectoren ingeschaald op DM-III in een isolator of onder DM-III met aanvullende voorschriften die gelden voor apen in associatie met volvirulent HIV-1. Verder heeft de aanvrager verzocht om handelingen (flow cytometrie) met cellen afkomstig van de (getransplanteerde) apen uit te voeren in een ruimte die niet gekwalificeerd was voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (buiten inperking) in plaats van op ML-II niveau.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2005 tweemaal geadviseerd over de beschreven werkzaamheden (CGM/050330-01 en CGM/050527-01). De COGEM was van mening dat na transductie van de stamcellen nog vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes, afkomstig uit het oorspronkelijk inoculum, in het transplantaat aanwezig zouden kunnen zijn. Hierdoor bestaat de kans dat na transplantatie recombinatie optreedt tussen de toegediende infectieuze lentivirale vectordeeltjes en de in de aap aanwezige (onbekende) wildtype lentivirussen, waardoor recombinante virussen met andere (virulente) eigenschappen gevormd zouden kunnen worden. De COGEM was daarom van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gewaarborgd was wanneer de aangevraagde dierexperimenten op DM-II inperkingsniveau uitgevoerd werden. Tevens adviseerde de COGEM om

handelingen met getransduceerde cellen uit te voeren op minimaal ML-II niveau (1). Een uitzondering hierop vormen analyses met FACS en fluorescentiemicroscopie waarbij de cellen geïnactiveerd zijn middels een 4% paraformaldehyde oplossing. Deze werkzaamheden kunnen buiten inperking plaatsvinden (2).

Hoewel de COGEM een RCL test niet noodzakelijk acht, heeft de aanvrager aangegeven de apen te testen op eventueel aanwezige RCL's na transplantatie van de getransduceerde cellen met behulp van de zogenaamde Amplicor monitor test. In haar advies van mei jl. stelt de COGEM dat deze test geschikt is voor het doeleinde (3).

Verder was de aanvrager voornemens om in de getransduceerde cellen de aanwezigheid van vrije infectieuze replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes te testen met behulp van een p24 ELISA en een HIV-gag PCR. De COGEM achtte de testen ongeschikt aangezien deze gericht zijn op het aantonen van RCL's en niet op het aantonen van vrije lentivirale vectordeeltjes. Testen op afwezigheid van vrije vectordeeltjes was noodzakelijk omdat de aangeleverde informatie over het transductie-experiment geen uitsluitsel hierover gaf (2;3).

Adviesvraag

De aanvrager heeft naar aanleiding van de voorgaande COGEM adviezen informatie aangeleverd met betrekking tot de afwezigheid van vrije replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes in het transplantaat. De aanvrager geeft aan dat hij de uit de apen geïsoleerde stamcellen gedurende minimaal 24 uur bloot wil stellen aan lentivirale vectoren met een 'multiplicity of infection' (MOI) van 1. Om de hoeveelheid vrije lentivirale vectordeeltjes na transductie te reduceren, worden de getransduceerde cellen vijf maal gewassen met een fysiologische zoutoplossing waarna de cellen vijf minuten worden blootgesteld aan een trypsine oplossing. Hierna worden de cellen getransplanteerd in de aap. De COGEM is verzocht om te adviseren of deze kweek- en wasprocedure de eventueel aanwezige vrije infectieuze vectordeeltjes voldoende reduceert zodat werkzaamheden met apen kunnen worden uitgevoerd op DM-II niveau.

Verder heeft de aanvrager verzocht om bepaalde handelingen met cellen en weefsels afkomstig van de apen voor en na transplantatie buiten inperking te mogen uitvoeren in plaats van op ML-II niveau. Het betreft hier de analyse met behulp van flow cytometrie met ondermeer getransduceerde hematopoietische cellen vóórdát ze getransplanteerd worden en bloed en beenmergcellen van getransplanteerde apen. Alvorens de cellen buiten inperking te brengen, worden deze gefixeerd in een 4% paraformaldehyde oplossing.

Overweging en advies

Na transductie van de uit apen geïsoleerde stamcellen zouden vrije infectieuze replicatiedeficiënte vectordeeltjes, afkomstig uit overgebleven oorspronkelijke inoculum, achter kunnen blijven in het kweekmedium. Reductie van deze deeltjes wordt bewerkstelligd door na transductie de cellen 24 uur te kweken en vervolgens vijf maal te wassen. Tenslotte ondergaan de cellen een behandeling met trypsine alvorens transplantatie in de apen plaatsvindt.

De kweekprocedure reduceert het aantal vrije lentivirale deeltjes aanzienlijk. De stabiliteit van virale vectoren is onder andere afhankelijk van de temperatuur. Bij 37°C is de halfwaardetijd circa 10 uur (4). Wanneer de getransduceerde humane cellen worden gekweekt bij 37°C, zal de oorspronkelijke hoeveelheid lentivirale vectoren na 24 uur met een factor 5,3 afgenomen zijn.

De afname van vrije lentivirale deeltjes wordt versterkt door de cellen tijdens het kweken een aantal malen te wassen. Elke wasstap reduceert het aantal aanwezige deeltjes met een factor 20. Dit betekent voor de onderhavige situatie een verdere reductie van 20^5 ($=3 \times 10^6$).

Ten slotte worden de cellen blootgesteld aan een trypsine-oplossing waarvan bekend is dat het HIV-1 inactieveert. De behandeling reduceert het aantal aanwezige lentivirale deeltjes met een factor 200 (5).

De COGEM heeft in 2005 een generiek advies uitgebracht over handelingen met lentiviraal getransduceerde cellen (6). Hierin heeft de COGEM twee formules opgesteld om te bepalen of de kweek- en wasprocedure de gewenste reductie van vrije lentivirale vectordeeltjes teweegbrengt. Deze formules hebben respectievelijk betrekking op open en gesloten handelingen. Voor open handelingen dient de reductie van vrije deeltjes hoger te zijn dan voor gesloten handelingen. Het generieke advies is opgesteld voor laboratoriumhandelingen en niet voor proefdieren. Hoewel gesteld kan worden dat de onderhavige experimenten onder de categorie gesloten handelingen vallen, betreft het hier om experimenten met proefdieren. Gezien het feit dat handelingen met proefdieren in principe een groter risico inhouden dan laboratoriumwerkzaamheden, is de COGEM van mening dat een zelfde reductie als bij open handelingen nagestreefd moet worden. Daarom is de onderstaande formule (voor open handelingen) van toepassing.

$$(20^W * 200^I * 2^{2,4T}) / V \geq 100$$

Uit deze formule volgt dat de reductiefactor van het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes uiteindelijk 100 maal hoger dient te zijn dan de oorspronkelijke inoculumdosis. Hierbij is

V de oorspronkelijke inoculumdosis, W is het aantal wasstappen en T is de kweektijd in dagen. Met I wordt het aantal inactiverende wasstappen met trypsine bedoeld.

De aanvrager heeft eerder aangegeven dat het aantal te transplanteren cellen afhankelijk is van het celtype en het gewicht van het dier. Afhankelijk van het getransduceerde celtype, worden minimaal 3×10^4 cellen/kg (in geval van een CD34-positieve stamcelpopulatie) of minimaal 3×10^5 cellen/kg (bij een CD34⁺HLADR^{dull} stamcelpopulatie) getransplanteerd in apen van 3 tot 4 kg. Dit betekent dat, uitgaande van het laatste celtype, minimaal $1,2 \times 10^6$ cellen per aap worden getransplanteerd. De aanvrager geeft aan een MOI van 1 te hanteren en geeft een voorbeeld waarbij een transplantaat bestaande uit 5×10^6 cellen getransduceerd wordt met een inoculumdosis van 5×10^6 lentivirale vectoren.

De aanvrager geeft echter geen maximale inoculumdosis aan. Met behulp van de aangeleverde informatie en de formule kan berekend worden hoe groot de inoculumdosis maximaal mag zijn om de gewenste reductie van vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes te bereiken. Deze reductiefactor dient 100 maal groter te zijn dan de maximale inoculumdosis. Hieruit volgt dat de beschreven kweek- en wasprocedure nog effectief is bij gebruik van een inoculumdosis van $3,4 \times 10^7$ vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes. De COGEM adviseert daarom dat wanneer de gehanteerde inoculumdosis kleiner of gelijk is aan $3,4 \times 10^7$ lentivirale vectoren, de werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II kunnen plaatsvinden. Indien de inoculumdosis groter is, dienen werkzaamheden op DM-III niveau uitgevoerd te worden aangezien met de gehanteerde kweek- en wasprocedure de aanwezigheid van vrije infectieuze vectordeeltjes niet volledig uit te sluiten is.

De COGEM is tevens gevraagd of zij kan instemmen met de inschaling van handelingen met cellen en weefsels afkomstig van de apen voor en na transplantatie van lentiviraal getransduceerde cellen. Bureau GGO schaaft deze werkzaamheden in op inperkingsniveau ML-II. De COGEM stemt hiermee in, maar is, in lijn met haar eerdere advies, van mening, dat handelingen met cellen die gefixeerd zijn in een 4% paraformaldehyde oplossing buiten inperking kunnen plaatsvinden (2). In haar eerdere advies stelt de COGEM dat deze fixatiemethode adequaat is om (getransduceerde) cellen te inactiveren. Derhalve acht de COGEM het uitvoeren van de analyse via flow cytometrie buiten inperking gerechtvaardigd.

Bureau GGO heeft aanvullende voorschriften opgesteld voor werkzaamheden in een ML-II en DM-II ruimte. De COGEM is gevraagd hierover te adviseren. De COGEM acht de aanvullende voorschriften afdoende aangezien de risico's voor mens en milieu verder geminimaliseerd worden. Met betrekking tot de werkzaamheden op ML-II is het onder

andere noodzakelijk om handschoenen te dragen en om open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet klasse-II. Voor DM-II geldt onder meer dat de te transplanteren stamcellen vrij zijn van infectieuze van lentivirale vectordeeltjes en dat apen aantoonbaar vrij zijn van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.

De aanvrager heeft eerder aangegeven getransplanteerde apen te willen testen op eventuele aanwezigheid van RCL's met behulp van de Amplicor monitor test. De COGEM heeft destijds geadviseerd dat deze test geschikt is voor dit doel. Bureau GGO heeft de COGEM nu gevraagd hoe te handelen indien een RCL gedetecteerd wordt. De COGEM acht de aanwezigheid van RCL in het bloed van de apen zeer onwaarschijnlijk. Ten eerste wordt er namelijk gebruik gemaakt van een derde generatie SIN lentivirale vector en ten tweede zijn de resusapen immuun voor HIV infecties vanwege de antivirale activiteit van bepaalde cellulaire factoren (Trim5a en Apobec3G). Voor zover bekend, komen deze factoren in alle weefsels van de aap tot expressie. De COGEM is van mening dat deze factoren ook na bestraling tot expressie zullen komen. Indien in het onwaarschijnlijke en theoretische geval toch RCL gedetecteerd wordt, dient de betreffende aap, alsmede de apen waarmee direct contact heeft plaatsgevonden, verplaatst te worden van een DM-II naar een DM-III dierverblijf om eventuele verspreiding van RCL tegen te gaan.

Concluderend adviseert de COGEM dat werkzaamheden met apen in associatie met lentiviraal-getransduceerde stamcellen uitgevoerd kunnen worden op inperkingsniveau DM-II wanneer de te transplanteren stamcellen maximaal met een inoculumdosis van $3,4 \times 10^7$ infectieuze lentivirale vectordeeltjes getransduceerd worden. Indien dit niet het geval is, dienen werkzaamheden plaats te vinden op DM-III niveau. Verder adviseert de COGEM dat handelingen met cellen die gefixeerd zijn in een 4% paraformaldehyde oplossing buiten inperking kunnen plaatsvinden.

Referenties

1. COGEM advies CGM/050330-01. COGEM (2005). Transplantatie van lentiviraal getransduceerde beenmergcellen in apen.
2. COGEM advies CGM/050527-01. COGEM (2005). Transplantatie van lentiviraal getransduceerde stamcellen in apen.
3. COGEM advies CGM/060502-05. COGEM (2006). Beoordeling detectiemethoden voor replicatiecompetente lentivirale vectoren en vrije lentivirusdeeltjes.
4. Higashikawa, F. en Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**: 124-131.
5. Tang, S.B. en Levy, J.A. (1991). Inactivation of HIV-1 by trypsin and its use in demonstrating specific virus infection of cells. *J Virol Methods* **33**: 39-46.
6. COGEM advies CGM/051215-01. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen.