

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

11 september 2006
CGM/060911-01
Advies omlaagschaling van handelingen met adenoviraal getransduceerde cellen
(IG 01-259/06)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 01-259/06 getiteld 'Onderzoek naar gapjunctie eiwitten' 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. De aanvrager is voornemens om open handelingen met deze getransduceerde cellen uit te voeren. Hij gebruikt hiervoor specifieke meetapparatuur welke is gesitueerd in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor de beoogde werkzaamheden, namelijk inperkingsniveau ML-I in plaats van ML-II.

Risico's bij werkzaamheden met adenovirale vectoren kunnen ontstaan indien eventueel in de celkweek aanwezig replicatiecompetent adenovirus (RCA) en/of vrije replicatiedeficiënte adenovirale deeltjes vrijkomen in het milieu.

De COGEM acht de kans op aanwezigheid van RCA in de getransduceerde cellen verwaarloosbaar klein. De aanvrager test de virusbatch voorafgaand aan transductie van de cellen op aanwezigheid van RCA. Slechts batches die vrij zijn, worden gebruikt voor de transductie.

Verder is de COGEM van mening dat de hoeveelheid eventueel nog aanwezige replicatiedeficiënte vectordeeltjes, afkomstig van het inoculum, verwaarloosbaar klein is 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 omlaagschaling van de onderhavige 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 large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Omlaagschaling van handelingen met adenoviraal getransduceerde cellen

COGEM advies CGM/060911-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu bij omlaagschaling van open handelingen met eerste generatie adenoviraal getransduceerde cellen. De aanvrager maakt gebruik van enkele getransduceerde cellijnen welke deels afkomstig zijn van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). Met de cellen wil de aanvrager elektrofysiologische metingen, waarbij zogenaamde 'open handelingen' noodzakelijk zijn, verrichten.

De vervaardiging van de getransduceerde cellen is reeds vergund en vindt plaats onder inperkingsniveau ML-II. De elektrofysiologische meetapparatuur bevindt zich echter in een ruimte die gekwalificeerd is als ML-I. De aanvrager verzoekt daarom om omlaagschaling van de metingen.

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. Immuungecompromitteerde patiënten kunnen ernstig ziek worden, in de vorm van nier- en longontstekingen 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 zogenaamde 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 wordt. 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).

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. Voor de vervaardiging van de vector is in het onderhavige advies gebruik gemaakt van de helpercellijnen PER.C6 en HEK293.

Eerder COGEM advies

Voor de elektrofysiologische metingen gebruikt de aanvrager getransduceerde cellen die verkregen zijn via derden. De COGEM heeft eerder geadviseerd over omlaagschaling van elektrofysiologische handelingen met deze getransduceerde cellen (CGM/060313-06). Destijds betrof het de vraag of deze metingen buiten inperking konden plaatsvinden. De COGEM was van mening dat de kans op RCA vorming tijdens de productie van de vector verwaarloosbaar klein was gezien het gehanteerde productiesysteem en de aanvullende voorschriften. Daarnaast achtte zij de gehanteerde was- en kweekprocedures afdoende om eventueel aanwezige vrije vectordeeltjes, als gevolg van de transductie, terug te brengen naar verwaarloosbaar kleine hoeveelheden. De COGEM concludeerde daarom dat, met in acht name van de gestelde aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu bij het uitvoeren van de metingen met open kweekschaltes in een ruimte buiten inperking, verwaarloosbaar klein waren (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 01-259). Daarnaast zijn de cellen die verkregen zijn via derden ook vergund voor werkzaamheden onder ML-II niveau (IG 01-181).

De onderhavige adviesvraag heeft betrekking op omlaagschaling van 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 apparatuur bevindt zich in een kooi van Faraday om elektrische (ver)storingen van de metingen te voorkomen. Het is niet mogelijk om de meetapparatuur in een veiligheidskabinet op te stellen vanwege zijn omvang.

Adenovirale vector

Tijdens de productie van de adenovirale vector zou mogelijk replicatiecompetent adenovirus (RCA) gevormd kunnen worden. Aangezien aanwezigheid van RCA ongewenst is, in verband met een eventueel besmettingsrisico, test de aanvrager de virusbatches op afwezigheid van RCA. Dit wordt op twee manieren onderzocht, met

behulp van een PCR en een biologische RCA-test waarbij de cytotoxiciteit van het recombinante adenovirus getest wordt op HeLa cellen. Slechts de batches die vrij zijn van RCA worden gebruikt voor de transductie van de cellen.

Vorbereiding van de werkzaamheden

De aanvrager is van plan metingen te verrichten op de volgende getransduceerde cellen:

- A) Primaire humane progenitor hartcellen en humane progenitor cellen van foetale oorsprong welke de isovorm B van het humane myocardine tot expressie brengen. De aanvrager heeft deze cellen verkregen van het LUMC waar tevens de transductie en de daaropvolgende kweek- en wasprocedure plaatsvindt. De cellen worden minimaal vijf dagen gekweekt, een aantal maal gewassen met een fysiologische zoutoplossing en ondergaan een trypsine behandeling. Bovendien worden de getransduceerde cellen behandeld met hAd5-neutraliserende antistoffen, zodat eventueel nog aanwezige adenovirale deeltjes geïnactiveerd worden.
- B) Animale cellen waaraan verschillende genen zijn toegevoegd coderend voor onder meer myotrofine en luciferase. Deze cellen worden na 2 uur transductie met de adenovirale vector (MOI= 50-100), 24-48 uur gekweekt en ondergaan vier wasbehandelingen met een fysiologische zoutoplossing.

Na transductie zullen vrije niet-replicerende inoculumdeeltjes nog aanwezig zijn in het medium van de cellen. Deze dienen verwijderd te worden omdat de deeltjes nog infectieus zijn en daarmee een risico vormen. Om te bepalen wat de invloed van de wasstappen en de kweektijd is op de aanwezigheid van vrije niet-replicerende infectieuze adenovirale deeltjes, heeft de aanvrager het volgende experiment uitgevoerd. HeLa cellen (2×10^5) werden gedurende twee uur geïncubeerd met 2×10^8 recombinant adenovirus (MOI = 1000). Vervolgens werden de cellen twee maal gewassen met een fysiologische zoutoplossing en werden de cellen in medium gekweekt. Na 24 uur werd het medium verzameld (monster 1) en werden de cellen opnieuw twee maal gewassen en gedurende 15 minuten gekweekt. Hierna is ook dit medium verzameld (monster 2). Tenslotte werd nieuw medium toegevoegd aan de cellen waarna deze 24 uur gekweekt werden. Hierna werd wederom het medium verzameld (monster 3). Het verzamelde medium werd afzonderlijk gebruikt om HEK293 cellen te infecteren waarna 'plaquevorming' bepaald werd. De mate van plaquevorming is een maat voor de aanwezigheid van adenovirussen in het verzamelde medium. Monster 1 heeft tot de vorming van 1000 plaques geleid, monster 2 tot de vorming van 6 plaques en monster 3 tot 22 plaques. Hieruit concludeert de aanvrager dat na 24 uur infectie het oorspronkelijke aantal virusdeeltjes met een factor 2×10^5 gereduceerd is. Na twee maal wassen wordt een additionele reductie bereikt van een factor 167. De additionele kweekperiode bevestigt de reductie van de wasstap.

Om de elektrofysiologische metingen te kunnen uitvoeren, worden de getransduceerde cellen opgenomen in een fysiologische tyrode buffer. Dit alles vindt plaats in een ML-II laboratorium. Voordat de cellen in gesloten kweekvaatjes naar de naastgelegen ML-I ruimte worden verplaatst voor de metingen, wordt een laagje siliconenolie over de tyrode buffer aangebracht. Hierdoor tracht de aanvrager aërosolvorming tijdens de metingen te voorkomen.

Metingen aan getransduceerde cellen

In de ML-I ruimte vinden de elektrofysiologische metingen volgens de zogenaamde 'patch clamp' analyse plaats. Patch clamping heeft als doel om ionenstromen over het membraan van één cel te meten. Hiertoe wordt het kweekschaaltje open onder een microscoop geplaatst en wordt de pipet door het olielaagje gebracht. Vervolgens wordt met behulp van de pipet een individuele cel geïsoleerd en vinden de metingen plaats. Na deze analyse wordt de pipet teruggetrokken door de olielaag. De aanvrager is van mening dat bij deze laatste handeling een kans op aërosolvorming bestaat. Hij acht deze kans echter vele malen kleiner dan wanneer geen olie gebruikt wordt.

Aanvullende voorschriften

De aanvrager heeft de volgende aanvullende voorschriften opgesteld om eventuele risico's verder te beheersen:

- indien handelingen met virusbevattende kweken zijn uitgevoerd in een veiligheidskabinet dient 30 minuten gewacht te worden voordat werkzaamheden met getransduceerde cellen kunnen plaatsvinden;
- tijdens de elektrofysiologische metingen is de ML-I ruimte niet toegankelijk voor onbevoegde personen, dit wordt aangegeven op de deur;
- tijdens metingen worden handschoenen gedragen;
- alle wegwerpmaterialen worden na afloop van de metingen afgevoerd in 'biohazard' containers. Bovendien wordt de micropipet na iedere meting vervangen;
- alle her te gebruiken materialen, apparatuur en omgeving van de meetopstelling worden na afloop van de metingen ontsmet met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol.

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 als gevolg van de transductie. Deze deeltjes zijn namelijk infectieus zodat verspreiding voorkomen dient te worden.

De COGEM heeft reeds, in het kader van een eerdere vergunningaanvraag, geadviseerd over de risico's van de getransduceerde hartcellen en cellen van foetale oorsprong die de aanvrager verkregen heeft van het LUMC (4). Destijds was de COGEM hierover van mening dat de kans op RCA vorming tijdens vectorproductie (met behulp van de helpercellijn PER.C6) verwaarloosbaar klein was. Daarnaast achtte de COGEM de gehanteerde was- en kweekprocedures afdoende om eventueel aanwezige vrije vectordeeltjes, als gevolg van de transductie, terug te brengen naar verwaarloosbaar kleine hoeveelheden.

Gezien dit eerdere advies, dat de COGEM nog steeds actueel acht, zal hieronder niet worden ingegaan op de getransduceerde hartcellen, of de cellen van foetale oorsprong, maar slechts op de eventuele aanwezigheid van RCA en vrije niet-replicerende adenovirale deeltjes als gevolg van de transductie van de animale cellen door de aanvrager.

RCA vorming

De door de aanvrager gehanteerde adenovirale vectoren missen de *E1* regio die noodzakelijk is voor replicatie. Hierdoor is E1-hAd5 replicatiedeficiënt en voor zijn replicatie afhankelijk van helpercellijnen die de coderende sequentie van de *E1* regio bevatten. In tegenstelling tot het gebruik van de helpercellijn PER.C6, kan het gebruik van de helpercellijn HEK293 wel leiden tot homologe recombinatie van de *E1* regio tussen de helpercellijn en E1-hAd5, waardoor de vector replicatiecompetent kan worden (5).

De aanvrager test via PCR en een biologische assay op de afwezigheid van RCA in de virusbatch. Slechts de RCA-vrije batches zullen gehanteerd worden voor transductie van animale cellen. De COGEM merkt op dat de detectielimiet van beide testen niet gegeven wordt, wat een beoordeling van de assays bemoeilijkt. Echter, de experts van de COGEM zijn van mening dat replicatiecompetent virus dat geproduceerd wordt in HEK293 cellen zich zeer snel repliceert. Zij acht de detectie van dergelijke grote hoeveelheden RCA hoogstwaarschijnlijk.

Gezien het bovenstaande, is de COGEM van mening dat de kans op RCA aanwezigheid tijdens de elektrofysiologische metingen verwaarloosbaar klein is. Overigens merkt de COGEM op dat indien RCA toch onverhoopt aanwezig zou zijn, dit zich niet optimaal kan repliceren in de gehanteerde getransduceerde cellen.

Verwijderen van vectordeeltjes

Vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes hebben het vermogen tot infectie nog niet verloren. Daarom dienen, alvorens getransduceerde cellen in een ML-I ruimte te hanteren, de celkweken vrij te zijn van adenovirale vectordeeltjes om verspreiding via aërosolen te voorkomen. Door middel van de gehanteerde kweek- en wasprocedure wordt een afname van dergelijke deeltjes bewerkstelligd. De aanvrager heeft testen uitgevoerd om te bepalen wat het effect is van de gebruikte was- en kweekprocedure op de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes. Deze testen zijn uitgevoerd onder omstandigheden die vergelijkbaar zijn met de uiteindelijke procedure. Uit de testen blijkt dat de reductie aanzienlijk is en dat na 48 uur nog slechts een geringe hoeveelheid vrije vectordeeltjes overblijft. De aanvrager maakt in de test gebruik van 2×10^8 recombinante virusdeeltjes. In het uiteindelijke experiment zal de virusdosis 10-20 maal lager liggen, zodat cellen met maximaal 2×10^7 recombinante virusdeeltjes worden geïnfecteerd. Uit de resultaten van de testen volgt dat de kweek- en wasprocedure de hoeveelheid vrije vectordeeltjes zal reduceren tot niet-detecteerbare hoeveelheden.

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 eventuele lysis (stukgaan) van cellen zullen daarom geen infectieuze adenovirale deeltjes kunnen vrijkomen.

De aanvrager maakt tijdens de elektrofysiologische metingen onder ML-I niveau tevens gebruik van siliconenolie om aërosolvorming, en daarmee de verspreiding van vrije adenovirale deeltjes, te minimaliseren.

Aanvullende maatregelen

De aanvrager heeft aanvullende werk- en desinfectievoorschriften opgesteld. Een voorbeeld hiervan is de desinfectieprocedure waarbij ontsmet wordt met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol. Daarnaast is het niet toegestaan om binnen een tijdsbestek van 30 minuten handelingen met getransduceerde cellen uit te voeren in een veiligheidskabinet indien kort daarvoor werkzaamheden met virusbevattende kweken hebben plaatsgevonden. De COGEM acht de gestelde voorschriften en werkprocedures adequaat.

Het ministerie van VROM heeft tevens als aanvullende voorwaarde het dragen van een mond- en neuskapje gesteld. De COGEM stemt in met deze voorwaarde. Er worden namelijk open handelingen verricht waarbij medewerkers beschermd dienen te worden tegen direct contact met het genetisch gemodificeerd organisme (ggo) als gevolg van morsen of omstoten van de kweekschaltjes.

De COGEM benadrukt dat het verwijderen van de micropipet na de meting met zorg dient plaats te vinden. Enkele prikaccidenten met dergelijke met ggo-gecontamineerde pipetten zijn bij de experts van de COGEM bekend.

Conclusie

Gezien de afwezigheid van RCA en vrije adenovirale deeltjes, acht de COGEM het gebruik van siliconenolie niet strikt noodzakelijk. Verder 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 kweekschaaltjes in een ML-I ruimte verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. McConnell, M.J. en M.J. Imperiale (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15:1022-1033.
2. Knipe, D.M. en P.M. Howley (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. COGEM (2006). COGEM advies CGM/060313-06. Omlaagschaling van werkzaamheden met adenoviraal getransduceerde zoogdiercellen.
5. Volpers, C. en S. Kochanek (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J. Gene Med.* 6: S164-S171.