

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 05 april 2007
KENMERK CGM/070405-02
ONDERWERP Advies handelingen met retroviraal getransduceerde cellen (IG 06-131/01)

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen van het Universitair Medisch Centrum Sint Radboud te Nijmegen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen. Transductie vindt plaats middels een vector die gebaseerd is op het *Moloney murine leukemia virus*. De vector is in staat om verschillende soorten cellen te infecteren, waaronder humane cellen. De aanvrager is voornemens om de getransduceerde cellen te gebruiken voor microscopie op inperkingsniveau ML-I om de rol van adhesiemoleculen en het cytoskelet op het gedrag van verschillende cellen te bestuderen.

Risico's van de beschreven handelingen kunnen optreden als gevolg van de eventuele aanwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR). RCR's kunnen gevormd worden tijdens de productie van de vector, maar ook na insleep van replicatiecompetente retrovirussen bij de kweekwerkzaamheden. Daarnaast kunnen vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes uit het oorspronkelijk inoculum achterblijven.

De COGEM is van mening dat alvorens open handelingen onder niveau ML-I kunnen plaatsvinden, de getransduceerde cellen getest moeten worden op afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR). Verder is zij van mening dat de gehanteerde kweek- en wasprocedure het aantal vrije vectordeeltjes reduceert tot verwaarloosbaar kleine hoeveelheden. Om te voorkomen dat tijdens de kweekwerkzaamheden onder ML-II RCR's gevormd worden door insleep van replicatiecompetente virussen, zijn aanvullende voorschriften opgesteld. Bovendien stemt de COGEM in met de aanvullende voorschriften die zijn opgesteld voor handelingen onder ML-I niveau. Met in acht neming van deze voorschriften, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de beschreven handelingen verwaarloosbaar klein.

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 retroviraal getransduceerde cellen

COGEM advies CGM/070405-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over handelingen met amphotroop (breed gastheerbereik) retroviraal getransduceerde cellen. Transductie van animale cellen vindt plaats onder inperkingsniveau ML-II, waarna de cellen gedurende een bepaalde periode onder hetzelfde niveau opgekweekt worden. De aanvrager is voornemens om vervolgens open microscopische handelingen te verrichten met deze cellen op een lager inperkingsniveau, namelijk ML-I. Deze handelingen hebben tot doel om de rol van adhesiemoleculen en het cytoskelet op het gedrag van verschillende cellen te bestuderen.

Retrovirale vectoren

Retrovirussen zijn RNA virussen die veelvuldig worden toegepast als genoverdrachtsysteem. Een dergelijk systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van een geïnfecteerde cel. Voor de onderhavige werkzaamheden brengt de aanvrager een transgen in het erfelijk materiaal van de animale cellen middels een vector gebaseerd op het *Moloney murine leukemia virus* (MLV). Dit virus behoort tot de Gammaretrovirussen en veroorzaakt kanker bij knaagdieren. Het virus blijkt ook pathogeen te zijn voor primaten (1).

Momenteel wordt in het merendeel van de klinische genterapie studies gebruik gemaakt van vectoren die gebaseerd zijn op MLV (2). De door de aanvrager gehanteerde retrovirale vector is gepseudotypeerd met een amphotroop envelopeiwit zodat de vector, naast knaagdiercellen, tevens in staat is om onder andere humane cellen te infecteren (2). Daarnaast zijn essentiële virale genen afwezig waardoor de vector replicatiedeficiënt is en voor vermenigvuldiging afhankelijk is van een helpervirus. Als laatste is de vector, en ook MLV, slechts in staat om delende cellen te infecteren in tegenstelling tot lentivirussen (2).

Eerder COGEM advies

In 2005 heeft de COGEM geadviseerd over handelingen met langdurig gekweekte retroviraal getransduceerde humane cellen (CGM/050623-01) (3). Deze cellen werden na transductie met een genetisch gemodificeerde amphotroop retrovirale vector, gedurende vijf jaar gekweekt onder ML-II niveau. De aanvrager verzocht destijds om na deze periode celkweek en microscopische handelingen uit te voeren in een ML-I laboratorium.

De COGEM heeft destijds positief geadviseerd over het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I niveau. Ten eerste omdat de cellen middels een gevalideerde RT-PCR werden getest op afwezigheid van replicatie competent retrovirus (RCR). Ten tweede, waren de cellen tijdens de langdurige kweekperiode vele malen gewassen. Eventueel aanwezige vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes werden zodoende weggewassen en gereduceerd tot niet-detecteerbare hoeveelheden.

Om eventuele risico's als gevolg van de werkzaamheden verder te minimaliseren, heeft de COGEM destijds aanvullende voorschriften opgesteld. Dit betrof onder andere het inactiveren van biologische actieve materialen en de desinfectie van meetopstellingen en werkoppervlakken (3).

Adviesvraag

De aanvrager is voornemens om microscopische handelingen uit te voeren met amphotroop retroviraal getransduceerde cellen onder ML-I niveau. Alvorens deze handelingen plaatsvinden, worden de benodigde cellen onder ML-II niveau opgekweekt. De cellen zijn als volgt onder te verdelen:

1. Humane cellijnen die stabiel getransduceerd zijn en gedurende vijf jaar gekweekt worden.
2. Cellijnen die na transductie twee weken worden gekweekt.
3. Cellijnen die stabiel getransduceerd zijn en gedurende vijf jaar gekweekt zijn, waarna deze cellen opnieuw getransduceerd worden. Vervolgens worden de cellen twee weken gekweekt.

Gedurende de kweekperiode van twee weken (cellen van bovenstaande categorie 2 en 3) worden de cellen vier maal gewassen met medium waaraan serum is toegevoegd. Voordat de cellen verplaatst worden van het ML-II naar het ML-I laboratorium, worden deze nogmaals twee keer gewassen, één maal getrypsiniseerd en vervolgens uitgezaaid in af te sluiten kweekschaaftjes. Daarnaast worden de cellen met behulp van een RT-PCR getest op afwezigheid van RCR, welke eventueel tijdens de productie van de retrovirale vector gevormd kunnen worden. Hierna worden de cellen verplaatst naar de ML-I ruimte. Hoewel de microscopische handelingen over het algemeen gesloten handelingen betreffen, wordt in bepaalde gevallen (bij het toedienen van reagentia) het deksel voor korte duur verwijderd.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de beschreven kweekwerkzaamheden alvorens de cellen overgebracht worden naar de ML-I ruimte en daarnaast over de noodzaak van een RCR test. Verder is de COGEM de vraag voorgelegd of een gevalideerde RCR-test in alle gevallen noodzakelijk is bij het uitvoeren van handelingen met zowel amphotrope als

ecotrope (infecteren alleen muizen en ratten) retrovirale vectoren. Ten slotte is de COGEM gevraagd een voorstel te doen voor een formule waarmee de reductie van het aantal vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes (voor handelingen met amphotrope en ecotrope vectoren) bepaald kan worden. Een dergelijke formule heeft de COGEM reeds opgesteld voor lentivirale SIN vectoren (4). Lentivirussen behoren evenals de Gammaretrovirussen tot de familie van de *Retroviridae*.

Advies

Het onderhavige advies heeft betrekking op amphotrope retrovirale vectoren. Bij de productie van dergelijke vectoren en de hierop volgende transductie van cellen kunnen een aantal potentiële risico's benoemd worden. Ten eerste kunnen RCR's ontstaan. Ten tweede kunnen vrije niet-replicerende vectordeeltjes in het kweekmedium aanwezig zijn. Bij incidenten zouden deze deeltjes mogelijk tot besmetting van een medewerker kunnen leiden; dit dient voorkomen te worden. Hieronder wordt ingegaan op de afzonderlijke risico's.

Replicatiedeficiente deeltjes

Replicatiedeficiënte vrije vectordeeltjes kunnen in het kweekmedium aanwezig zijn als gevolg van achtergebleven inoculum. In geval van een incident kunnen deze deeltjes in het milieu terecht komen. Laboratoriummedewerkers kunnen besmet raken door prikincidenten (6). Aangezien de deeltjes replicatiedeficiënt zijn, zullen deze slechts eenmalig een cel infecteren. Geïnfecteerde cellen kunnen geen nieuwe replicatiecompetente virusdeeltjes meer maken, zodat de infectie beperkt blijft tot de plaats van besmetting. Afhankelijk van de insertie in het genoom en het transgen, bestaat er een theoretische kans op het ontstaan van tumoren bij besmette laboratoriummedewerkers (6;7;8).

Aanwezigheid van vrije vectordeeltjes dient gezien de potentiële risico's vermeden te worden. Reductie van de vectordeeltjes wordt bewerkstelligd door de kweek- en wasprocedure. Om te berekenen of de reductie voldoende groot is om open handelingen uit te voeren onder ML-I, heeft de COGEM eerder een formule opgesteld voor lentivirale vectoren. Deze is beschreven in het generieke advies over handelingen met lentiviraal getransduceerde cellen, dat de COGEM in 2005 heeft uitgebracht (4). Het betreft de volgende formule:

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

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 formule is destijds opgesteld voor lentivirale vectoren. Echter, de COGEM is van mening dat een aangepaste versie van deze formule ook toegepast kan worden op de onderhavige retrovirale vector.

In de formule is ten eerste de stabiliteit van virale vectoren verwerkt in $2^{2,4T}$. Omdat de stabiliteit wordt uitgedrukt in de halfwaardetijd van de vector, is dit onderdeel van de formule tot stand gekomen door de lengte van een dag in uren (24 uur) te delen door de halfwaardetijd van lentivirale vectoren (10 uur). Uit verschillende publicaties blijkt dat de extracellulaire halfwaardetijd van de retrovirale vector tussen de 3,5 en 8 uur ligt (9). Bovendien is bij de deskundigen van de COGEM bekend dat in het werkveld vaak een halfwaardetijd van 8-10 uur gehanteerd wordt. De stabiliteit is onder andere afhankelijk van de temperatuur. Aangezien kweekwerkzaamheden normaliter onder 37°C plaatsvinden, is zij van mening dat een halfwaardetijd van 10 uur gehanteerd moet worden. Dit betekent dat na het kweken van de getransduceerde cellen gedurende twee weken de oorspronkelijke hoeveelheid virale vectoren naar schatting met een factor $2^{33,6}$ ($= 1,3 \times 10^{10}$) zal zijn afgenomen.

De afname van de vrije deeltjes wordt versterkt door de cellen tijdens en na het kweken een aantal malen te wassen. Uit ervaring van de geraadpleegde deskundigen blijkt dat elke wasstap het aantal aanwezige deeltjes met een factor 20 reduceert, zodat voor de onderhavige situatie een verdere reductie van 20^6 ($= 6,4 \times 10^7$) bereikt wordt.

Ten slotte worden de cellen blootgesteld aan een trypsine-oplossing. Hiervan is bekend dat het lentivirus HIV-1 geïnactiveerd wordt. Echter, dit is onduidelijk voor MLV. Daarom is de COGEM van mening dat de trypsine behandeling als extra wasstap gezien moet worden. De behandeling zal daarom niet, zoals in de eerder opgestelde formule, als afzonderlijke reductiefactor meegenomen worden. De reductie als gevolg van de zes wasstappen en de trypsine-behandeling kan daarom berekend worden op 20^7 ($= 1,3 \times 10^9$).

Wanneer de bovenstaande formule ingevuld wordt (de aanvrager geeft aan dat de maximale inoculatie titer 1×10^6 virale deeltjes bedraagt), blijkt dat de reductie van het aantal vrije vectordeeltjes na minimaal twee weken kweken ruimschoots de vereiste factor 100 overschrijdt. Dit maakt dat de COGEM van mening is dat de hoeveelheid vrije deeltjes gereduceerd is tot verwaarloosbaar kleine hoeveelheden. Daarom acht de COGEM het uitvoeren van open handelingen onder ML-I mogelijk.

Verder wordt de COGEM gevraagd of de formule ook van toepassing is op andere amphotrope en ecotrope retroviraal getransduceerde cellen. De COGEM is van mening dat hierover geen algemene uitspraak gedaan kan worden. Een belangrijke factor voor de betrouwbaarheid van de formule is de halfwaardetijd van het virus. Deze tijd is afhankelijk van het envelopeiwit dat gebruikt wordt voor de pseudotypering en zal experimenteel bepaald moeten worden.

Replicatiecompetent retrovirus

Tijdens de productie van de gehanteerde retrovirale vector is de kans op het ontstaan van RCR niet uitgesloten (5). Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat RCR's gevormd worden wanneer tijdens de kweekwerkzaamheden insleep van andere replicatiecompetente retrovirussen plaatsvindt. Contact met RCR's moet voorkomen worden aangezien de medewerker besmet en geïnfecteerd kan raken. Gezien de relatief beperkte transmissieroute van MLV, is de kans op besmetting van personen met name aanwezig bij prikaccidenten (6). Indien personen geïnfecteerd raken, kunnen de RCR's zich verspreiden omdat het virus ook in de cellen van deze personen kunnen repliceren. Het virus is in staat om te integreren in het DNA en heeft de voorkeur voor genen die actief afgelezen worden (7;8). Dit zou daarom kunnen leiden tot het ontstaan van tumoren. Een voorbeeld hiervan is het ontstaan van lymfomen na toediening van een vector op basis van MLV (5). Daarnaast blijkt uit een klinische gentherapie studie naar X-SCID dat de vector leukemie kan veroorzaken (7;8).

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM het testen op de afwezigheid van RCR, alvorens handelingen onder ML-I niveau plaatsvinden, noodzakelijk voor het gebruikte productiesysteem en de beschreven handelingen. Zij acht de door de aanvrager voorgestelde RT-PCR adequaat gezien de gevoeligheid (tien viruspartikels per milliliter) van de assay (5).

Bureau GGO vraagt verder of de COGEM een RCR-test noodzakelijk acht voor alle handelingen welke plaatsvinden met het hierboven beschreven productiesysteem gepseudotyperd met amphotrope of ecotrope eiwitten op ML-I niveau. De COGEM is van mening dat een RCR-test noodzakelijk is voor open handelingen gezien de reeds beschreven risico's. Voor gesloten handelingen acht de COGEM een RCR-test niet noodzakelijk omdat de kans op verspreiding van het virus dan verwaarloosbaar klein is.

Daarnaast is de COGEM gevraagd of zij een uitspraak kan doen over de noodzaak van een gevalideerde RCR-test voor werkzaamheden met andere productiesystemen dan het gehanteerde. Aangezien bij de meeste productiesystemen de kans bestaat dat RCR's gevormd worden, adviseert de COGEM in het algemeen dat voor alle productiesystemen

een RCR-test noodzakelijk is. Een uitzondering hierop vormen 3^e generatie lentivirale SIN vectoren. De COGEM heeft hierover eerder geadviseerd dat een RCR-test niet noodzakelijk is, gezien de verwaarloosbaar kleine kans op vorming van RCR tijdens productie van de vector (4).

Aanvullende voorschriften

De COGEM stemt in met de aanvullende voorschriften zoals opgesteld door Bureau GGO voor de microscopische werkzaamheden onder ML-I niveau.

Daarnaast adviseert zij dat in een ML-II laboratorium open handelingen met getransduceerde cellen dienen plaats te vinden in een veiligheidskabinet klasse-II conform de Regeling GGO (10). Verder adviseert zij, om de vorming van RCR tijdens kweekwerkzaamheden te voorkomen, dat handelingen met replicatiecompetente retrovirussen of andere vectorsystemen niet gelijktijdig met de retrovirale vector in het veiligheidskabinet plaatsvinden. Bovendien adviseert de COGEM om handelingen met retroviraal getransduceerde zoogdiercellen niet uit te voeren in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatiecompetente retrovirussen in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden.

Ten slotte is de COGEM gevraagd of zij het noodzakelijk acht om afzonderlijke aanvullende voorschriften op te stellen voor de verschillende categorieën getransduceerde cellen. De COGEM is van mening dat dit niet noodzakelijk is.

Met in acht neming van de gestelde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij de beschreven werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Donahue, R.E., Kessler, W., Bodine, D. *et al.* (1992). Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* (176): 1125-1135.
2. Buchschacher, G. L., Wong-Staal, F. (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* (95): 2499-2504.
3. COGEM (2005). Handelingen met langdurig gekweekte retroviraal getransduceerde humane cellen in een ML-I ruimte (CGM/050623-01).
4. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen (CGM/051215-01).
5. Ebeling, S.B., Simonetti, E.R., Borst, H.P.E. (2003). Human primary T lymphocytes have a low capacity to amplify MLV-based amphotropic RCR and the virions produced are largely noninfectious. *Gene Ther.* (10): 1800-1806.

6. University of California, San Diego. Material Safety Data Sheet Moloney Murine Leukemia Virus recombinant vector (1999).
7. Recombinant DNA Advisory Committee, U.S. department of health and human services (2003). Minutes of meeting.
8. Twombly, R. (2003). For gene therapy, now-quantified risks are deemed troubling. J. Natl. Cancer Inst 95(14): 1032-1033.
9. Andreadis, S.T., Brott, D., Fuller, A.O., Palsson, B.O. (1997). Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. J. Virol. 71(10): 7541-7548.
10. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004.