

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

DATUM 5 september 2007
KENMERK CGM/070905-03
ONDERWERP Advies Handelingen met adenovirale en hybride vectoren buiten inperking
(IG 01-181/06 en IG 01-182/05)

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende handelingen buiten inperking met cellen getransduceerd met adenovirale of hybride vectoren (IG 01-181/06 en IG 01-182/05) deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over open handelingen met genetische gemodificeerde cellen die plaatsvinden in een ruimte waaraan geen inperkingsniveau is toegekend. In de cellen zijn verschillende virale vectoren gebracht die niet meer in staat zijn zich zelf te repliceren. De vectoren zijn gebaseerd op adenovirussen en een combinatie van adenovirus en adeno-associated virus (AAV).

Risico's voor mens en milieu zouden kunnen ontstaan door de aanwezigheid van virale vectoren die zichzelf wel kunnen vermenigvuldigen wat zou kunnen leiden tot verspreiding van de vector in het milieu. Daarnaast zouden er risico's voor laboratoriummedewerkers kunnen optreden door aanwezigheid van virusdeeltjes in de celkweek die zich niet meer kunnen repliceren maar nog wel infectieus zijn.

De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat tijdens de productie van de virale vectoren, virussen gevormd worden die zichzelf kunnen repliceren. De door de aanvrager voorgestelde voorschriften dragen hier zorg voor. Om te voorkomen dat er nog infectieuze virusdeeltjes aanwezig zijn wast de aanvrager de celcultures meerdere malen. De uiteindelijke hoeveelheid infectieuze deeltjes die nog over kunnen zijn, is naar de mening van de COGEM dermate gering dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De aanvrager wil de experimenten om praktische reden uitvoeren in een ruimte zonder inperking. De COGEM kan daar mee instemmen mits er gewerkt wordt onder ML-II werkvoorschriften en er een aantal overige aanvullende voorschriften in acht wordt genomen.

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 long horizontal stroke that ends in a small hook.

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

c.c. Dr. D.C.M. Glandorf
Dr. I. van der Leij

Handelingen met adenovirale en hybride vectoren buiten inperking

COGEM advies CGM/070905-03

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu bij handelingen met cellen die getransduceerd zijn met adenovirale vectoren of hybride vectoren bestaande uit een combinatie van adenovirus (Ad) en adeno-associated-virus (AAV). De aanvrager beschikt al over een vergunning om de vectoren te mogen produceren op ML-II niveau. De aanvrager wil getransduceerde cellen echter sorteren met behulp van een FACS. Deze FACS bevindt zich in een ruimte waaraan geen inperkingsniveau is toegekend. De aanvrager verzoekt daarom om deze open handelingen te mogen uitvoeren in deze ruimte buiten inperking.

Virale vectoren

Adenovirale vectoren

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als effectief genoverdrachtsysteem. Er zijn 51 verschillende serotypes humane adenovirussen, welke geclassificeerd kunnen worden in zes groepen (A tot en met F). Vaak wordt groep C serotype 5 adenovirus (hAd5) als basis gebruikt voor een adenovirale vector. Infectie met type 5 adenovirus kan leiden tot verkoudheidsverschijnselen. Immuungecompromitteerde patiënten kunnen ernstig ziek worden, in de vorm van nier- en longonsteking met eventueel fatale gevolgen. Adenovirussen hebben een gastheerbereik dat beperkt is tot één soort of nauw verwante soorten (1-3).

Adenovirussen bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel (1,2). De genomen van adenovirussen zijn 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 bestaat uit vijf transcriptie units (E1A, E1B, E2, E3 en E4). De E1 eiwitten zijn betrokken bij de activering van de overige vroege en late genen en induceren de 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). De E2 regio codeert voor eiwitten noodzakelijk voor replicatie van het virale genoom. De E3 regio remt de reactie van het immuunsysteem van de gastheer tegen de geïnfecteerde cellen zodat deze niet direct

opgeruimd worden. De E4 regio tenslotte, codeert voor een aantal eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus (1).

Voor de vervaardiging van zogenaamde eerste generatie adenovirale vectoren wordt de E1 regio uit het adenovirusgenoom uitgewisseld met het gen van interesse (1). Daarnaast wordt ook vaak (een deel van) de E3 regio verwijderd. Bij adenovirale vectoren van de tweede generatie zijn hiernaast (delen van) de E2 en/of de E4 regio weggehaald.

Aangezien het virus na verwijdering van de E1 regio niet meer in staat is tot replicatie, is een helpercellijn noodzakelijk voor productie van de vectoren. Voor de vervaardiging van de adenovirale vectoren uit onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van de helpercellijnen PER.C6 en 293, 911 en afgeleiden van deze cellen. In deze cellen komt onder andere de E1 regio tot expressie.

Hybride vectoren

Naast adenovirale vectoren is de aanvrager van plan gebruik te maken van hybride vectoren waarbij gensegmenten van het adenovirus en het adeno-associated virus (AAV) gecombineerd worden.

AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus* (3). AAV is een enkelstrengs DNA virus en is afhankelijk van de activiteit van een helpervirus. Van adenovirussen en herpes simplex virussen (HSV) is bekend dat zij voor AAV als helpervirus kunnen optreden (2,3). Het helpervirus levert specifieke functies die AAV mist voor replicatie en zorgt ervoor dat AAV in een geïnfecteerde cel zich kan vermenigvuldigen (6). Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met een ziektebeeld (7). Daardoor is er niet veel bekend over de infectiecyclus van AAV gedurende een infectie. Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via aërosolen en huidcontact.

De genetische informatie van het AAV virus bestaat uit een tweetal genen, *rep* en *cap*, die verantwoordelijk zijn voor de replicatie en voor de vorming van het manteleiwit van het virus. De *rep* en *cap* genen zijn omgeven door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's). Deze ITR's zijn nodig voor het inpakken van genetisch materiaal in omhulsels (virusmantel) van het AAV. Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend welke onder andere verschil vertonen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.

Omdat een infectie met AAV geen ziekte veroorzaakt, wordt AAV beschouwd als een zeer geschikt virus voor de ontwikkeling van vectoren voor gentherapie (7-11). Een nadeel van deze vectoren is echter dat slechts transgene sequenties van een geringe lengte (4,7 kb) in de vector kunnen worden gekloneerd. Door een hybride vector te ontwikkelen van AAV en adenovirus elementen is deze limitatie overwonnen.

Het Ad/AAV hybride systeem bestaat uit een adenovirus backbone waarbij de rechter adenovirus ITR (inverted terminal repeat) is vervangen door een AAV ITR. Dit systeem is voor de vectorproductie afhankelijk van een adenovirus waarvoor de aanvrager de bovengenoemde eerste of tweede generatie adenovirusvectoren wil gebruiken die op PER.C6 cellen of afgeleiden hiervan geproduceerd zijn.

Het AAV/Ad hybride systeem bestaat uit een recombinant AAV backbone met AAV ITR's en adenovirus 'packaging' elementen en is voor de productie afhankelijk van zowel adenovirus- als AAV-genproducten. Ook hier wil de aanvrager de eerder genoemde eerste en tweede generatie in PER.C6 cellen geproduceerde vectoren inzetten.

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager heeft al een vergunning om zowel de adenovirale vectoren als de hybride vectoren te produceren op ML-II niveau. Ook transductie-experimenten met deze vectoren in animale cellen zijn vergund onder ML-II condities (IG 01-181 en IG 01-182). Daarnaast kan de aanvrager handelingen met de met adenovirale vectoren getransduceerde cellen uitvoeren op ML-II niveau en zijn handelingen met dieren die zijn ingespoten met de adenovirale vectoren vergund onder DM-II niveau (IG 01-181).

De onderhavige adviesvraag heeft betrekking op omlaagschaling van open handelingen met getransduceerde cellen. Er wordt gebruik gemaakt van FACS apparatuur welke is gelegen in een ruimte die niet gekwalificeerd is voor de beoogde werkzaamheden.

Productie virale vectoren

Tijdens de productie van zowel de adenovirale vector als de hybride vectoren zou mogelijk replicatiecompetent virus (RCV) gevormd kunnen worden. De aanwezigheid van RCV is ongewenst in verband met een eventueel besmettingsrisico. De aanvrager heeft aangegeven de te gebruiken vectorbatches niet te testen op RCV vorming.

De aanvrager heeft aangegeven voor de productie van eerste generatie vectoren slechts gebruik te zullen maken van PER.C6 cellen. De vector heeft hierbij geen overlappende sequenties met de E1-regio in de productielijn zodat de vorming van replicatie competent adenovirus (RCA) niet kan optreden. Deze specifieke eerste generatie vector zal ook gebruikt worden als helpervector voor de productie van Ad/AAV en AAV/Ad vectoren.

Voor de productie van tweede generatie adenovirale vectoren geeft de aanvrager aan naast PER.C6 cellen ook gebruik te willen maken van 293 en 911 cellijnen en afgeleiden hiervan. De aanvrager stelt voor een aanvullend voorschrift op te nemen waarin vermeld staat dat uitsluitend tweede generatie adenovirale vectoren worden gebruikt waarbij het 'terug recombineren' van tenminste één van de twee ontbrekende essentiële adenovirale

genregio's (E1, E2 of E4) door homologe recombinatie is uitgesloten door het ontbreken van een sequentieoverlap tussen de adenovirale vector en de bijbehorende productiecellijn. Ook mogen er geen adenovirale vectoren worden gebruikt waarbij in de verwijderde adenovirale genregio's potentieel complementerende adenovirale genen zijn ge(her)introduceerd.

Ook tweede generatie vectoren geproduceerd op PER.C6 cellen zullen worden gebruikt als helpervector bij de productie van de hybride vectoren.

Vorbereiding van de werkzaamheden

De aanvrager is van plan animale getransduceerde cellen te sorteren met behulp van een FACS. Het betreft hier een breed scala aan primaire cellen en cellijnen. In de cellen wordt een breed scala aan donorsequenties tot expressie gebracht variërend van cytokines tot leverenzymen.

Na transductie zullen nog vrije inoculumdeeltjes aanwezig zijn in het medium van de cellen. Deze dienen verwijderd te worden omdat de deeltjes infectieus zijn en daarmee een risico vormen. De aanvrager geeft aan de cellen te transduceren met een maximale 'multiplicity of infection' (MOI) van 100. Daarnaast zullen zich in de celweek op het moment van de FACS analyse maximaal 0,05 transducerende eenheden adenovirus vector bevinden. De aanvrager zal hiervoor de celcultures minimaal 6 maal wassen.

Metingen aan getransduceerde cellen

De aanvrager heeft de intentie sorteren van de cellen met behulp van een FACS in een ruimte buiten inperking te laten plaatsvinden. De aanvrager geeft aan dat voor de analyse alleen cellen worden gebruikt die niet met behulp van adenovirus genen zijn geïmmortaliseerd en die geen productieve adenovirusinfectie doormaken.

Om het ontstaan van aerosolen tijdens de werkzaamheden met de FACS tot een minimum te beperken geeft de aanvrager aan dat er voorzieningen zijn getroffen die eventueel gevormde aerosolen afzuigen. Een precieze omschrijving van de voorzieningen ontbreekt. Verder geeft de aanvrager aan dat bij de FACS een logboek wordt bijgehouden waarin de werkzaamheden met ggo's worden geregistreerd. Ook zijn er werkvoorschriften voorgesteld (ML-I werkvoorschriften) die het veilig werken met ggo's tijdens het uitvoeren van de FACS-experimenten moeten waarborgen.

Het transport van de ggo's van en naar de FACS apparatuur zal gebeuren in een afgesloten lekvrije en breukvaste container. De container en de buizen worden geopend direct voordat ze aan de FACS gekoppeld worden. Er is hierbij sprake van open handelingen. De cellen worden na de analyse in een gesloten afvalvat opgevangen. Het afvalvat is voorzien van een verse chlooroplossing. Na afloop van de metingen wordt de

FACS meerdere malen doorgespoeld met een verse chlooroplossing. Het afval zal in een gesloten container weer worden vervoerd naar het ML-II laboratorium.

Bureau GGO stelt voor alle her te gebruiken materialen, apparatuur en omgeving van de meetopstelling na afloop van de metingen te ontsmeten met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol. Ook het dragen van handschoenen en een mond- en neuskapje is verplicht. Dit om eventuele risico's als gevolg van vrijkomende aerosolen verder te beperken.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de omlaagschaling van handelingen met getransduceerde zoogdiercellen met behulp van een adenovirale vector (12). Het betroffen hier open handelingen buiten een ingeperkte ruimte. In deze aanvraag werd gebruik gemaakt van een eerste generatie adenovirale vector waarbij de E1 regio van het humane adenovirus 5 genoom is uitgewisseld met het gen van interesse (E1-hAd5). Als helpercellijn is gebruik gemaakt van de PER.C6 cellijn. Deze cellijn bevat de basenparen 459-3510 van de E1 regio van het humane adenovirus type 5. Hierdoor zijn er geen overlappende sequenties aanwezig met het E1-hAd5 waardoor homologe recombinatie niet kan optreden. Dit heeft als gevolg dat er tijdens de productie van de vectorbatch geen RCA gevormd kan worden. Testen op aanwezigheid van RCA werd in het advies daarom niet noodzakelijk geacht.

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.

Wel achtte de COGEM het noodzakelijk dat de primaire cellen vrij waren van adenovirussen. Dit omdat aanwezige adenovirussen kunnen zorgen voor recombinatie en mobilisatie met de in de cel aanwezige vector waardoor een RCA kan ontstaan.

Overweging en advies

In de onderhavige aanvraag wordt gebruik gemaakt van eerste en tweede generatie adenovirale vectoren. Daarnaast worden zowel hybride Ad/AAV als AAV/Ad vectoren gebruikt. Als helpercellijnen wordt gebruik gemaakt van PER.C6, 911 en 293 cellen en afgeleiden hiervan. De productiesystemen zijn hierbij niet zo scherp gedefinieerd als in de aanvraag waar het bovenstaande eerdere advies van de COGEM op gebaseerd is.

Risico's bij werkzaamheden met dergelijke vectoren hebben betrekking op een eventuele aanwezigheid van RCV en van vrije niet-replicerende vectordeeltjes als gevolg van de transductie. Deze deeltjes zijn namelijk infectieus zodat verspreiding voorkomen dient te worden.

RCV vorming

RCV vorming zou mogelijk kunnen optreden tijdens de productie van de virale vectoren en in de getransduceerde cellen. Hieronder wordt ingegaan op deze twee situaties.

RCV vorming tijdens de vectorproductie

Uit de literatuur is bekend dat bij de productie van eerste generatie vectoren RCA's kunnen ontstaan (15,16). Voor de productie van eerste generatie adenovirale vectoren uit deze aanvraag maakt de aanvrager echter gebruik van een gedefinieerd systeem. Er zijn hierbij geen overlappende sequenties aanwezig tussen de vector en de helpercellijn PER.C6 waardoor homologe recombinatie is uitgesloten. Zoals de COGEM al vermeld heeft in eerdere adviezen acht zij de kans op de vorming van RCA bij gebruik van dit systeem, waar overlappende sequenties ontbreken, verwaarloosbaar klein.

Naast productie van eerste generatie vectoren is de aanvrager van plan ook tweede generatie vectoren te produceren. In de aanvraag wordt niet beschreven welke delen uit welke regio's (E2A, E2B of E4) naast de E1-regio, niet meer in de vector aanwezig zijn. Wel wordt vermeld dat bij de vervaardiging van tweede generatie vectoren niet alleen de PER-C6 cellijn gehanteerd wordt maar ook gebruik gemaakt wordt van de 293 en 911 cellijn.

In het geval van eerste generatie adenovirale vectoren is er minimaal één homologe recombinatiegebeurtenis nodig om een RCA te kunnen vormen. In het geval van een tweede generatie adenovirale vector zijn dit er minimaal twee. Een experiment waarin de vorming van RCA's tijdens de productie met $\Delta E1/\Delta E4$ vector op 293 cellen is bestudeerd laat zien dat bij de productie van dit type vector geen RCA's gevormd worden (14). De aanvrager geeft verder aan dat hij bij de productie van tweede generatie vectoren enkel gebruik zal maken van vectorsystemen waarbij het invangen van tenminste één van de twee ontbrekende essentiële adenovirus genregio's door homologe recombinatie is uitgesloten door het ontbreken van een sequentieoverlap tussen de adenovector en de bijbehorende productieceldlijn. Ook zullen er geen adenovirusvectoren worden gebruikt waarbij in de gedeleteerde adeno genregio's potentieel complementerende adenovirale genen zijn ge(her)introduceerd.

De COGEM is van mening dat met in achtneming van deze aanvullende voorschriften de kans verwaarloosbaar klein is dat tijdens de productie van deze tweede generatie vectoren RCA's kunnen ontstaan. Wel acht zij het mogelijk dat er zogenaamde 'revertant E1 adenovirussen' (REA) of 'helper-dependent E1-positive-particles (HDEP) ontstaan (13,16).

Bij REAs heeft één homologe recombinatie tijdens de productie van in een tweede generatie vector geresulteerd in een vector waarbij de E1 regio is 'teruggekeerd'. Door

het ontbreken van de E2 of E4 regio is het virus echter niet in staat om te repliceren (16). Een experiment waarin een HDEP is ontstaan liet zien dat de aanwezigheid van één overlappende sequentie tussen een eerste generatie adenovirale vector en PER.C6 cellen kan resulteren in een vectordeeltje dat de E1 regio en het transgen bevat. Andere essentiële genregio's zijn hierbij echter verloren gegaan. Hierdoor is de HDEP voor replicatie afhankelijk van een helpervirus (13).

Van de E1 regio is bekend dat het kwaaddiercellen en, zij het in een veel lagere frequentie, sommige humane celtypes kan transformeren en immortaliseren (16). Het is niet bekend of vectoren die de E1 regio bevatten tumoren bij mensen kunnen induceren (16). De kans hierop is echter zeer klein omdat de E1A en E1B regio van adenovirussen sterke epitopen voor cytotoxische T-lymfocyten (CTLs) bevatten. Deze CTLs staan bekend om hun eigenschap dat ze tumorcellen onschadelijk kunnen maken.

Tijdens de productie van de hybride vectoren worden eerste en tweede generatie adenovirale vectoren gebruikt als helpervector. Deze helpervectoren zijn geproduceerd met behulp van PER.C6 cellen of afgeleiden hiervan. De COGEM is van mening dat voor de helpervectoren dezelfde eisen gelden als hier bovengenoemde eerste en tweede generatie adenovirale vectoren. Met inachtneming van deze aanvullende voorschriften is de COGEM van mening dat de vorming van replicatie competente vectoren verwaarloosbaar klein is. Bovendien is het genomisch DNA van de hybride vectoren dermate groot dat het niet kan worden ingepakt in capsiden van het AAV. De kans op de vorming van AAV replicerend virus is hierdoor verwaarloosbaar klein.

RCV vorming in de getransduceerde cellen

Indien de te transduceren cellen besmet zijn met wildtype adenovirussen zou recombinatie kunnen optreden, met eventueel replicatiecompetente vectoren als gevolg. De aanvrager is al in het bezit van een vergunning voor het transduceren van de cellen met de virale vectoren op ML-II niveau. Destijds zijn door het ministerie extra aanvullende voorschriften opgesteld voor de productie van de adenovirale vectoren. De COGEM acht onderstaande voorschriften ook voor deze aanvraag van belang.

- Gedurende het productieproces van de in dit lid genoemde vectoren worden in dezelfde ruimte geen handelingen verricht met wildtype adenovirussen en/of met replicatie competente adenovirus bevattende vector stocks;
- het is niet toegestaan handelingen met de getransduceerde cellen uit te voeren binnen een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met andere virusbevattende kweken in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden;
- de te transduceren cellen moeten vrij zijn van wildtype adenovirussen.

Verwijderen van vectordeeltjes

Vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes hebben het vermogen tot infectie nog niet verloren. Daarom dienen, alvorens getransduceerde cellen buiten inperking 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 halfwaardetijd van de adenovirale vector draagt niet bij aan een afname omdat adenovirale vectoren, in tegenstelling tot lentivirale vectoren, stabiel zijn door hun dubbelstrengs-DNA structuur. De halfwaardetijd ligt hier niet in de orde van uren maar van dagen.

De aanvrager heeft aangegeven dat het monster dat tijdens de FACS analyse gebruikt zal worden niet meer dan 0,05 transducerende eenheden adenovirus zal bevatten. De COGEM is van mening dat deze hoeveelheid vrije virusdeeltjes dermate gering is dat de kans verwaarloosbaar klein is dat een laboratoriummedewerker door de deeltjes geïnfecteerd raakt.

De COGEM merkt op dat wanneer de adenovirale en hybride 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 deeltjes kunnen vrijkomen.

FACS analyse

Normaliter dienen de FACS werkzaamheden op ML-II niveau te worden uitgevoerd. Hierbij worden de werkzaamheden waarbij aërosolen kunnen ontstaan uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II. Het is bij deze aanvraag echter niet mogelijk de FACS apparatuur in een veiligheidskabinet van klasse II te plaatsen. Om het ontstaan van aërosolen tijdens de werkzaamheden met de FACS tot een minimum te beperken geeft de aanvrager daarom aan dat er in samenwerking met de leverancier van de FACS apparatuur voorzieningen zijn getroffen die eventueel gevormde aërosolen afzuigen. Een precieze omschrijving van de voorzieningen ontbreekt echter. Naast een adequate voorziening voor de afzuiging van aërosolen acht de COGEM het van belang dat de laboratoriummedewerkers tijdens de handelingen een neus- en mondkapje dragen (P2 of hogere specificatie). Dit om de eventuele risico's van aërosolen tot een minimum te beperken.

De voorgestelde maatregelen voor de inactivatie van het afval met een chlooroplossing acht de COGEM voldoende.

Aanvullende maatregelen voor de ruimte buiten inperking

Omdat de handelingen buiten inperking plaatsvinden is de COGEM van mening dat aanvullende voorschriften in acht moeten worden genomen die betrekking hebben op

deze ruimte. De COGEM is van mening dat ML-II werkvoorschriften moeten worden gehanteerd. Tijdens het uitvoeren van de FACS werkzaamheden mogen er geen personen in de ruimte aanwezig zijn die niet betrokken zijn bij het experiment. Daarnaast moeten de gebruikte materialen en werkvoorschriften na afloop van het experiment ontsmet worden met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol.

Conclusie

De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu van de voorgestelde handelingen buiten inperking verwaarloosbaar klein zijn als aan de bovengenoemde aanvullende voorschriften wordt voldaan. Hieronder worden de aanvullende voorschriften nogmaals opgenoemd.

- gedurende het productieproces van de in dit lid genoemde vectoren worden in hetzelfde veiligheidskabinet geen handelingen verricht met wildtype adenovirussen of replicatie competente adenovirus bevattende vector stocks;
- bij de productie van eerste generatie vectoren wordt alleen gebruik gemaakt van PER.C6 cellen die geen sequentiehomologie vertonen met de vectorbackbone waardoor homologe recombinatie uitgesloten is;
- bij de productie van tweede generatie vectoren mag uitsluitend gebruik gemaakt worden van vectorsystemen waarbij het invangen van tenminste één van de twee ontbrekende essentiële adenovirus genregio's door homologe recombinatie is uitgesloten door het ontbreken van een sequentieoverlap tussen de adenovector en de bijbehorende productieceldlijn;
- er mogen geen adenovirusvectoren worden gebruikt waarbij in de gedeleteerde adenovirale genregio's potentieel complementerende adenovirale genen zijn ge(her)ïntroduceerd;
- de te transduceren cellen moeten vrij zijn van wildtype adenovirus;
- het is niet toegestaan handelingen met de getransduceerde cellen uit te voeren binnen een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met andere virusbevattende kweken in hetzelfde veiligheidskabinet hebben plaatsgevonden;
- de te sorteren cellen bevatten maximaal 0,05 transducerende eenheden adenovirus vector.
- tijdens de FACS handelingen moeten ML-II werkvoorschriften in acht worden genomen en mogen er geen personen in de ruimte aanwezig zijn die niet zijn betrokken bij het experiment;
- tijdens de FACS handelingen moeten de laboratoriummedewerkers een mond- en neuskapje dragen (P2-specificatie of hoger);

- personen die immuungecompromiteerd zijn of tijdens de experimenten een actieve adenovirusinfectie doormaken mogen niet bij de experimenten aanwezig zijn;
- na afloop van de FACS handelingen wordt het FACS apparaat doorgespoeld met een verse chlooroplossing en wordt het afval hiermee geïnactiveerd;
- na afloop van het experiment moeten de gebruikte materialen en werkoppervlakten ontsmet worden met 1% SDS gevolgd door 70% ethanol.

Referenties

1. McConnell M.J en Imperiale M.J (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Human gene therapy* 15:1022-1033
2. Knipe DM en Howley PM (2001). *Fields virology*, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Van Regenmortel MHV (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 Kochanek S (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *Journal of gene medicine* 6: S164-S171
6. Smith-Arica JR en Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49
7. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology journal* 2: 43
8. Lai CM, Lai YK en Rakoczy PE (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA. Cell biology* 21: 895-913.
9. El-Aneed A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of controlled release* 94: 1-14.
10. Monahan PE en Samulski RJ (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Molecular medicine today* 6: 433-440
11. Favre D *et al.* (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Molecular therapy* 4: 559-566
12. COGEM (2006). Omlaagschaling van werkzaamheden met adenoviraal getransduceerde zoogdiercellen. Advies CGM/060313-06
13. Murakami P, Pungor E en Files J *et al.* (2002). A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positieve particles. *Human gene therapy* 13: 909-920
14. Lanuti M, Gao GP en Force SD *et al.* (1999). Evaluation of an E₁E₄-deleted adenovirus expressing the herpes simplex thymidine kinase suicide gene in cancer gene therapy. *Human gene therapy* 10: 463-475
15. Hehir KM, Armentano D en Cardoza LM (1996). Molecular characterization of

- replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *Journal of virology* 9: 8459–8467
16. Fallaux FJ, Van der Eb AJ en Hoeben RC (1999). Who's is afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene therapy* 6: 709-712
 17. COGEM (2005). Handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen. Advies CGM/051215-01