

Advies betreffende: **Identificatie en functionele karakterisering van genen verantwoordelijk voor de groeiconrole van menselijke cellen**

Kennisgever: **Erasmus Universiteit Rotterdam**

COGEM kenmerk  
**CGM/020301-01**

BGGO nummer  
**GGO 01-155**

Datum advies  
**1 maart 2002**

## **Inleiding**

De kennisgever zal met behulp van een amphotrope retrovirale packaging cellijn (AmphoPack<sup>TM</sup>-293) replicatie-deficiënte retroviruspartikels produceren. Deze retrovirale viruspartikels worden vervolgens gebruikt voor de infectie van een ongemodificeerde borstkanker cellijn (ZR-75-1). De kennisgever heeft aangegeven dat werkzaamheden met de celklonen van cellijn ZR-75-1, ontstaan door infectie en vrij van replicatie competent virus, te willen uitvoeren onder VMT niveau. Op aanvraag van Bureau GGO heeft de kennisgever het protocol toegestuurd voor het testen op de afwezigheid van replicatie competent retrovirus (RCR) in de productie cellijnen en batches replicatie deficiënte retrovirussen.

In het voorgestelde protocol zullen er drie batches replicatie deficiënt virus getest te worden op het ontbreken van replicatie competente retrovirussen (RCR) in de productie van cellijnen en batches replicatie deficiënte retrovirussen, namelijk:

1. (het supernatant van) de producercellen
2. de virusbatch, verkregen na transfectie van producercellen met een deficiënt retrovirus DNA construct, die gebruikt wordt om de ZR-75-1 cellen te infecteren, en
3. een experimentele batch, bestaande uit het supernatant van ZR-75-1 cellen, die geïnfecteerd zijn met de hierboven beschreven virusbatch met retrovirale constructen die een cDNA bank bevatten.

De vraag aan de COGEM luidde of het protocol voldoet aan de eisen die worden gesteld in het algemene advies 'Inschaling van activiteiten met amphotrope (replicatie deficiënte) muizen-retrovirale vectoren in animale cellen in cultuur en toepassing bij proefdieren' van 1 augustus 2000 (CGM/000801-01).

## **Overwegingen en inschaling**

De aanvrager geeft aan replicatie-deficiënte retroviruspartikels te produceren ten behoeve van infectie experimenten met zoogdiercellen. Een klein deel van deze replicatie-deficiënte retroviruspartikels zal gebruikt worden voor het testen op de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR). Aangezien voor bovengenoemde onderdelen nog niet is aangetoond dat het productiesysteem vrij is van RCR, dienen deze onderdelen in principe aangemerkt te worden als activiteiten met een 'niet-veilig'

productiesysteem. De COGEM is daarom van mening dat de productie van replicatie-deficiënte retroviruspartikels, de infectie experimenten met zoogdiercellen en het testen op de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus dienen te worden uitgevoerd op C-I niveau, conform artikel 5.5.6.e en 6.5.6.e van de Regeling .

Voor het testen op de afwezigheid van RCR geven de aanvragers aan dat zij over een gevoelige en algemeen geaccepteerde methode beschikken. Het aantonen van RCR in batches met EGFP of G418 dient te geschieden door het toevoegen van EGFP of G418 bevattend marker virus. Gebruikmakend van deze methode kan door de aanwezigheid van EGFP fluorescentie of de groei van G418-resistente celklonen op antibioticum bevattend medium een enkele positieve cel gedetecteerd worden. De COGEM is van mening dat indien met deze methode in de praktijk in ieder geval minder dan 10 RCR kunnen worden aangetoond in de hoeveelheid van het grootste inoculum of, als dat een groter volume is, 5% van het batchvolume deze methode als voldoende gevoelig bestempeld mag worden.

Het voorgestelde protocol voldoet hiermee in principe aan de eisen zoals gesteld in het algemene advies van 1 augustus 2000, maar dit protocol dient wel voor de afzonderlijke deficiënte marker virussen (met EGFP en G418-resistentie) gevalideerd te worden. De COGEM adviseert daarom dat de in de kennisgeving benoemde handelingen met genetisch gemodificeerde zoogdiercellen die aangetoond vrij zijn van RCR kunnen worden uitgevoerd op VMT niveau.

De COGEM adviseert daarnaast om als aanvullend voorschrift op te nemen dat de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus in bovengenoemde drie batches is getest door controle van de geïnfecteerde zoogdiercellen op de afwezigheid van EGFP fluorescentie of G418-resistentie.