

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

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IG 03-018/02.co1	9 juni 2005	CGM/050623-01	23 juni 2005
Onderwerp	Advies kennisgeving IG 03-018/02		

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking IG 03-018/02, getiteld 'Mechanismen van T-cel differentiatie en activatie bij de mens', van het Academisch Ziekenhuis bij de Universiteit van Amsterdam (AMC), komt de COGEM tot het volgende oordeel.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met humane cellen, die geïnfecteerd zijn met retrovirale vectoren, op ML-I inperkingsniveau. Het doel van de experimenten is om de mechanismen van differentiatie en activatie van cellen van het immuunsysteem bij de mens te bestuderen. De cellen zijn na infectie gedurende vijf jaar gekweekt in een ML-II laboratorium en zijn daarbij wekelijks met vers medium gewassen waaraan geen virusdeeltjes zijn toegevoegd. De aanvrager verzoekt om de celkweek en microscopische handelingen lager in te schalen op ML-I inperkingsniveau. Daarbij zullen alle open handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet van klasse 2.

Voordat de cellen overgebracht worden naar het ML-I laboratorium worden ze getest op de aanwezigheid van retrovirussen die zich kunnen vermenigvuldigen (replicatie-competente retrovirussen, RCR). De COGEM is van mening dat, met de door de aanvrager voorgestelde PCR test, uitgesloten kan worden dat de celkweek detecteerbare hoeveelheden RCR bevat. Daar de hoeveelheid retrovirussen elke tien uur halveert en de cellen gedurende de kweekperiode 263 wasstappen hebben ondergaan, kan worden uitgesloten dat er nog infectieuze virusdeeltjes aanwezig zijn die zich in het milieu zouden kunnen verspreiden. Daarom is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu, bij de uitvoering van de experimenten op ML-I niveau, gewaarborgd is.

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

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

Titel: Handelingen met langdurig gekweekte retroviraal getransduceerde humane cellen in een ML-I ruimte

COGEM advies: CGM/050623-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van handelingen retroviraal getransduceerde humane cellen op ML-I niveau. Het doel van de aanvrager is om de mechanismen van differentiatie en activatie van cellen van het immuunsysteem bij de mens te bestuderen.

Retrovirussen (*Retroviridae*) zijn RNA virussen die veelvuldig toegepast worden als genoverdrachtsysteem. Dit systeem zorgt voor een stabiele integratie in het genoom van de geïnfecteerde cel. Diverse retrovirale vectoren worden voor dit doel gebruikt, waaronder lentivirale vectoren die afgeleid zijn van het *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) en vectoren gebaseerd op het *Moloney murine leukemia virus* (MMLV). Het genoom van retrovirussen bestaat uit de structurele genen *gag*, *pol* en *env* die essentieel zijn voor replicatie en virulentie van het virus.

Bij de productie van recombinante replicatie-deficiente retrovirussen wordt gebruik gemaakt van een productiesysteem waarbij de benodigde virale genen en het transgen verdeeld zijn over tenminste drie afzonderlijke plasmiden. Voor de vorming van replicatie-competent retrovirussen (RCR) zijn hierdoor minimaal twee recombinatie gebeurtenissen vereist. Mede door het gebruik van een minimum aan overlappende sequenties, is de kans op RCR-vorming hierdoor aanzienlijk verkleind (2).

De adviesvraag

De COGEM is verzocht een advies uit te brengen over handelingen met een drietal humane cellijnen (CTLAKR108TG, CTLINFA13TG en melAKRflu) die getransduceerd zijn met een genetisch gemodificeerd amphotroop retrovirus (MMLV). Het betreft onder meer microscopische handelingen, flowcytometrie en ELISA welke plaatsvinden in een ML-I ruimte. Voor microscopie blijven de cellen in een afgesloten kweekfles, terwijl voor flowcytometrie de cellen uiteindelijk gefixeerd worden met 1% paraformaldehyde. De aanvrager heeft aangegeven dat alle open handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan, zoals pipetteren en celkweek, uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet van klasse 2. Hoewel werkzaamheden met retroviraal getransduceerde werkzaamheden zijn ingeschaald op ML-II inperkingsniveau (5), verzoekt de aanvrager deze lager in te schalen.

De CTLAKR108TG en CTLINFA13TG cellen zijn na transductie met de retrovirale vectoren gedurende 3 jaar op ML-II niveau gekweekt in kweekmedium dat 1% humaan serum bevat. Daarna zijn de cellen gedurende 2 jaar gekweekt in medium

met 10% humaan serum. De melAKRflu cellen zijn gedurende 5 jaar na transductie gekweekt in medium met 10% foetaal kalfsserum. Alle cellen zijn wekelijks gewassen in serumbevattend medium, waardoor de cellijnen in totaal 263 wasstappen hebben ondergaan. Vóórdat de cellen overgebracht worden naar ML-I niveau, worden ze met behulp van een RT-PCR assay getest op de afwezigheid van RCR.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder een advies opgesteld als richtsnoer bij de beoordeling van de veiligheid van handelingen met genetisch gemodificeerde amphotrope (replicatie deficiënte) muizen-retrovirale vectoren in animale cellen (CGM/000801-01). Hierin zijn onder andere voorwaarden opgenomen voor de bepaling van de afwezigheid van RCR in het productiesysteem. Er zijn meerdere testen geschikt om RCR aan te tonen, waaronder de PCR analyse (2; 3). Belangrijk is dat het gebruikte testsysteem permissief is voor retrovirussen met het tropisme van het te testen virus. In het betreffende advies is voorts gesteld dat met de gebruikte test de aanwezigheid van tien RCR in de gebruikte hoeveelheid moet kunnen worden aangetoond. Deze test dient gevalideerd te zijn (CGM/000801-01).

Overweging en advies

In onderhavige aanvraag wordt gebruikt gemaakt van cellijnen die getransduceerd zijn met een amphotrope retrovirale vector. Een risico bij de productie van dit soort vectoren is het ontstaan van RCR die zich in het milieu kunnen verspreiden. Door gebruik te maken van een productiesysteem waarbij de benodigde virale genen en het transgen verdeeld zijn over tenminste drie afzonderlijke plasmiden wordt dit risico beperkt. De getransduceerde cellen zullen getest worden op de afwezigheid van RCR. Hiertoe wordt gebruik gemaakt van een kwantitatieve RT-PCR assay die eerder in de literatuur beschreven is (2). De aanvrager heeft aangegeven dat de test in tweevoud is uitgevoerd waarbij getest is op de aanwezigheid van het amphotrope envelopgen. De gevoeligheid van de RT-PCR test is tien viruspartikels per milliliter. De uitslag van beide testen voor alle drie de cellijnen wees negatief uit voor de aanwezigheid van RCR. Op grond van de gevoeligheid en uitslag van de test is de COGEM van mening dat de aanwezigheid van RCR in de celkweek niet aannemelijk is.

De voorgestelde handelingen buiten het veiligheidskabinet van klasse 2 op ML-I inperkingsniveau zijn volgens de aanvrager van korte duur. Microscopische handelingen vinden plaats in afgesloten kweekflessen, terwijl de cellen die gebruikt worden voor flowcytometrie gefixeerd zijn met 1% paraformaldehyde. De COGEM is van mening dat deze fixatiemethode adequaat is om celsuspensies te inactiveren. Alle open handelingen waarbij aerosolen kunnen ontstaan worden in een veiligheidskabinet van klasse 2 uitgevoerd. Naast de afwezigheid van RCR in de celkweek, dient tevens de aanwezigheid van infectieuze replicatie-deficiënte retrovirusdeeltjes uitgesloten te worden. Indien deze virusdeeltjes vrijkomen in het milieu kunnen ze

éénmalig andere personen of dieren infecteren. Retrovirussen hebben onder kweekcondities bij een temperatuur van 37°C een halfwaardetijd van ongeveer 10 uur (1; 4; 6). Bij een dergelijke halfwaardetijd is de oorspronkelijke concentratie na 5 jaar tenminste met een factor 3×10^{1000} verlaagd. Naast het feit dat de cellen 263 wasstappen hebben ondergaan, waarbij vrije virusdeeltjes weggewassen worden, is de COGEM van mening dat de reductie dermate groot is dat de hoeveelheid overgebleven retrovirale deeltjes gereduceerd is tot niet detecteerbare hoeveelheden. Wanneer de retrovirale deeltjes opgenomen worden door de cel verliezen ze hun membraan en envelopeiwitten, en daarmee het vermogen om andere cellen te infecteren. Bij eventuele lysatie van cellen tijdens de voorgestelde handelingen zullen derhalve geen infectieuze deeltjes in het medium kunnen vrijkomen.

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn indien de handelingen met de retroviraal getransduceerde cellen in dit specifieke geval plaatsvinden op ML-I niveau met inachtneming van de gebruikelijke aanvullende voorschriften:

- de getransduceerde cellen dienen met de voorgestelde gevalideerde RT-PCR methode getest te zijn op afwezigheid van RCR;
- het transport van de genetisch gemodificeerde cellen tussen het ML-II en ML-I laboratorium dient plaats te vinden in een gesloten, breukvaste, lekdichte houder, die voor vervoer uitwendig wordt ontsmet
- na afloop van de werkzaamheden wordt al het biologisch actieve materiaal geïnactiveerd en worden de meetopstellingen en werkoppervlakken gedesinfecteerd met 70% alcohol.

Referenties

1. Beer, C., Meyer, A., Muller, K., and Wirth, M. (2003). The temperature stability of mouse retroviruses depends on the cholesterol levels of viral lipid shell and cellular plasma membrane. *Virology* **308**, blz. 137-46
2. Ebeling, S. B., Simonetti, E. R., Borst, H. P., Blok, A., Schelen, A. M., Braakman, E., Ederveen, J., and Hagenbeek, A. (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**, blz. 1800-6
3. Forestell, S. P., Dando, J. S., Bohnlein, E., and Rigg, R. J. (1996). Improved detection of replication-competent retrovirus. *J Virol Methods* **60**, blz. 171-8
4. Higashikawa, F. and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* **280**, blz. 124-31
5. Integrale versie van de Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2003).

6. Kaptein, L. C., Greijer, A. E., Valerio, D., and van Beusechem, V. W. (1997). Optimized conditions for the production of recombinant amphotropic retroviral vector preparations. *Gene Ther* **4**, blz. 172-6