

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 18 februari 2021  
**KENMERK** CGM/210218-01  
**ONDERWERP** Advies 'Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes'

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

De COGEM heeft een eerder door de COGEM uitgebracht advies over de inschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren onder Ingeperkt Gebruik heroverwogen en deelt u het volgende mee.

**Samenvatting:**

In 2009 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1*. In dit advies wordt een overzicht gegeven van de criteria die zij hanteert om tot een inschaling van werkzaamheden te komen. Wegens voortschrijdend inzicht, mede gebaseerd op een in de opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject, heeft de COGEM de criteria voor werkzaamheden met replicatiedeficiënte lentivirale vectoren heroverwogen. Aanvullend heeft zij daarbij ook werkzaamheden met replicatiedeficiënte gammaretrovirale vectoren afgeleid van muizen gammaretrovirussen in haar overwegingen meegenomen.

De COGEM is van oordeel dat bij de productie van en de transductie met lentivirale vectoren, en werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen de risico's voor het milieu verwaarloosbaar klein zijn wanneer deze werkzaamheden op ML-I worden uitgevoerd, mits de aanwezigheid van of mogelijkheid tot vorming van replicatiecompetent virus (RCV) uitgesloten is en de te gebruiken cellen vrij zijn van wildtype lentivirussen. Omdat de kans op vorming van RCV bij de productie van gammaretrovirale vectoren niet uitgesloten kan worden, adviseert zij deze werkzaamheden op inperkingsniveau II te handhaven. Transductie met gammaretrovirale vectoren en werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen acht de COGEM onder bepaalde voorwaarden mogelijk op ML-I: de gammaretrovirale vectorbatch dient vrij te zijn van RCV, de te gebruiken cellijnen zijn van humane oorsprong en bewezen vrij van replicatiecompetente exogene gammaretrovirussen, en werkzaamheden blijven gescheiden van cellen waarin zich gammaretrovirussen kunnen bevinden.

De COGEM signaleert dat er een risico bestaat dat bij bepaalde werkzaamheden medewerkers blootgesteld worden aan vectordeeltjes en dat dit nadelige effecten voor de betreffende medewerker met zich mee kan brengen. Blootstelling aan vectordeeltjes kan bijvoorbeeld voorkomen worden door de werkzaamheden uit te voeren onder werk- en inrichtingsvoorschriften die gelijk zijn aan inperkingsniveau II.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
  - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's  
DG Milieu en Internationaal

# Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik

## COGEM advies CGM/210218-01

### 1. Inleiding

In 2009 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de inschaling van handelingen met lentivirale vectoren afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) onder Ingeperkt Gebruik.<sup>1</sup> In dat advies wordt onder meer een overzicht gegeven van de criteria die de COGEM hanteert om tot een inschaling te komen voor de productie van lentivirale vectoren, de transductie van zoogdiercellen met deze vectoren, en de kweek en analyse van de getransduceerde zoogdiercellen. Wegens voortschrijdend inzicht, mede gebaseerd op een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject,<sup>2</sup> heeft de COGEM de criteria om tot een inschaling te komen voor *in vitro* handelingen, - in het bijzonder het risico van de (mogelijke) aanwezigheid van lentivirale deeltjes -, in het onderhavige advies heroverwogen. Ook is de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met replicatiedeficiënte gammaretrovirale vectordeeltjes gebaseerd op muizen gammaretrovirussen en afgeleiden hiervan meegenomen.

### 2. Achtergrondinformatie lenti- en gammaretrovirussen

Lentivirussen (waartoe HIV behoort) en gammaretrovirussen behoren tot verschillende genera binnen de familie van de *Retroviridae*.<sup>3</sup> De virussen bezitten een enkelstrengs RNA genoom dat door een virus-specifiek polymerase, het reverse transcriptase, wordt omgezet naar dubbelstrengs DNA dat integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel.<sup>4,5</sup>

Het RNA genoom van lenti- en gammaretrovirale virusdeeltjes is ingepakt in capsid-eiwitten en wordt omhuld door een lipidenmembraan, de zogenoemde 'envelop'. De virusdeeltjes bevatten alle eiwitten die nodig zijn om de virale levenscyclus te kunnen opstarten, waaronder de enzymen reverse transcriptase, integrase en protease. Deze eiwitten worden in het virale genoom gecodeerd door het (*pro*)/*pol* gen<sup>a</sup>. Ingebed in het lipidenmembraan zitten de zogenoemde envelopeiwitten die het gastheertropisme van het virus bepalen. Deze eiwitten worden gecodeerd door het *env* gen.

De levenscyclus van lenti- en gammaretrovirussen is vergelijkbaar. Infectie van de cel wordt geïnduceerd door specifieke binding van de envelopeiwitten aan een cellulaire receptor, al dan niet in combinatie met een co-receptor. Tijdens dit proces wordt het virusdeeltje gedeeltelijk ontmanteld. In het cytoplasma wordt het virale RNA via een complex stappenplan omgezet in een dubbelstrengs DNA kopie, die in het cellulaire genoom integreert (provirale genoom). Aan zowel het 5'- en het 3'-uiteinde van het provirale DNA zijn identieke zogenoemde 'long terminal repeats' (LTR's) aanwezig. Deze sequenties spelen een belangrijke rol bij onder meer de integratie van het provirale DNA en de transcriptie van het virale genoom.

De transcriptiemachinerie van de gastheercel zorgt voor de synthese van viraal RNA vanaf het geïntegreerde provirale DNA. Na transport naar het cytoplasma, worden twee kopieën van het virale RNA

---

<sup>a</sup> Bij lentivirussen is het *pro* gen gelegen in het *pol* open leesraam (ORF). Bij sommige retrovirussen kan *pro* een eigen ORF hebben.

ingepakt in het capsid-eiwit (gecodeerd door het *gag*-gen). Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het 'packaging' signaal  $\Psi$  in het RNA essentieel. Tijdens de 'budding' aan het plasmamembraan worden de infectieuze virusdeeltjes gevormd. Bij dit proces wordt het ingepakte virale genoom omhuld door een lipidenmembraan met daarin geïntegreerd de envelopeiwitten.

Een belangrijk verschil tussen retro- en lentivirussen is dat het virale DNA bij de laatst genoemde virussen actief de kern in wordt getransporteerd via het 'nuclear pore complex', terwijl bij de retrovirussen gewacht moet worden tot het moment dat het kernmembraan uiteengevallen is tijdens de mitose. Als gevolg hiervan kunnen retrovirussen en de daarvan afgeleide vectoren, in tegenstelling tot lentivirussen, alleen delende cellen infecteren.

Een ander belangrijk verschil tussen retro- en lentivirussen is dat de lentivirussen naast de al eerder genoemde genen *gag*, (*pro*)/*pol* en *env*, in het bezit zijn van de vier accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*, en de twee regulatoire genen *rev* en *tat*.

### **2.1 Endogene retrovirussen (ERVs)**

Door integratie in het genoom van de gastheer kan het retrovirale genoom aanwezig blijven zolang de cel blijft bestaan. Wanneer integratie van het retrovirale genoom plaatsvindt in de kiemcellen (in de gameten of een embryo in een vroeg stadium), kunnen deze geïntegreerde sequenties doorgegeven worden aan opvolgende generaties en wordt het geïntegreerde virale genoom een endogeen retrovirus (ERV) genoemd.<sup>6</sup> Dit in tegenstelling tot verspreidende infectieuze replicatie-competente retrovirussen die als exogeen worden aangemerkt. Door selectiedruk in de gastheerpopulatie verdwijnen de meeste ERVs in de loop van de tijd. In het genoom van hedendaagse gewervelde dieren worden ERVs aangetroffen, maar dit betreffen vaak 'overblijfselen' van eerdere infecties met verschillende retrovirussen gedurende de evolutie die miljoenen jaren geleden plaats hebben gevonden.<sup>7</sup> De meerderheid van deze ERVs zijn geïnactiveerd (door mutaties of epigenetische modificaties) en coderen niet voor functionele eiwitten.<sup>6</sup> Ook in mensen komen ERVs voor. Deze worden onderverdeeld in verschillende klassen: klasse I ERVs vertonen sequentie-homologie met de huidige gammaretrovirussen en epsilonretrovirussen, klasse II ERVs vertonen sequentie-homologie met de alpha-, beta-, deltaretrovirussen en klasse III ERVs met de spumavirussen.<sup>7</sup>

In sommige diersoorten, waaronder muizen en ratten, worden intacte (of vrijwel intacte) ERVs aangetroffen, waarin de meeste of zelfs alle retrovirale elementen aanwezig zijn.<sup>8</sup> Voor knaagdieren wordt gesteld dat het lastig is onderscheid te maken tussen de sequenties van endogene retrovirussen en het provirale genoom van exogene retrovirussen.<sup>8</sup> In muizencellen en rattencellen, waarin intacte of vrijwel intacte ERVs aanwezig zijn, is gebleken dat *in vitro* onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld na blootstelling aan mutagene stoffen, na infectie met een virus dat retrovirale functies kan complementeren, of na herhaalde celpassages, exogene replicatiecompetente retrovirussen geproduceerd kunnen worden.<sup>bijv.9,10</sup> Van andere zoogdiersoorten, zoals katten en varkens, is bekend dat zij ERVs bevatten die gemakkelijk kunnen recombineren met verwante exogene virussen.<sup>11</sup>

Humane ERVs (ook wel HERVs genoemd) beslaan zo'n 8% van het genoom en zijn voornamelijk afkomstig van infecties met retrovirussen die verwantschap vertonen met gammaretrovirussen (klasse I) en betaretrovirussen (klasse II), welke 30-40 miljoen jaar geleden hebben plaatsgevonden.<sup>6,12</sup> Echter, door accumulatie van inactiverende mutaties kunnen deze sequenties niet meer resulteren in de productie van exogene replicatiecompetente retrovirussen.<sup>13,12,14,15</sup> Er bestaat een groep HERVs, de zogenaamde HERV-K familie, die transcriptioneel actief kunnen zijn en in staat zijn in tumorcellijnen 'virus like particles', i.e., niet infectieuze virusdeeltjes, te vormen.<sup>16,17</sup> Deze HERVs zijn echter niet replicatiecompetent en om infectieus exogeen retrovirus te vormen zijn meerdere genetische aanpassingen noodzakelijk.<sup>8,18</sup> Deze familie HERVs behoren tot klasse II.<sup>6</sup>

ERVs met een significante homologie met lentivirussen worden niet aangetroffen in het humane genoom. Endogene lentivirussen zijn extreem zeldzaam, en tot dusver alleen aangetroffen in het genoom van het konijn.<sup>19</sup>

### **3. Achtergrondinformatie replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectoren**

Vectoren gebaseerd op lenti- en gammaretrovirussen kunnen in het genoom van een cel integreren en worden vanwege deze eigenschap veel in het biomedisch en genetisch onderzoek toegepast. Daarbij wordt ten behoeve van de bioveiligheid veelal gebruik gemaakt van replicatiedeficiënte vectoren afgeleid van het lentivirus HIV-1 en van het muizen gammaretrovirus Moloney murine leukemia virus (MoMLV; een virus binnen de species *Murine leukemia virus*).

#### **3.1 Samenstelling replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectoren**

Voor de productie van replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectoren wordt gebruik gemaakt van zogenaamde 'split packaging' systemen.<sup>4</sup> Daartoe worden de verschillende virale genen en sequenties opgesplitst, en *in trans* (meestal over verschillende plasmiden verdeeld) aangeboden. Het vectorgenoom wordt aangeleverd op het zogenaamde 'transfer' plasmide. Dit plasmide bevat de virale 5' en 3' LTR sequenties, het 'packaging' signaal  $\Psi$  en het transgen van interesse. In het vectorgenoom zijn de genen die essentieel zijn voor de levenscyclus van het virusdeeltje, de genen *gag*, (*pro*)/*pol* en *env*, en bij lentivirale vectoren ook (het merendeel van) de accessoire en regulatoire genen *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* en *nef*, verwijderd. Omdat de essentiële genen zich niet in het vectorgenoom bevinden, is de vector niet meer in staat om zelfstandig te repliceren.

De *gag*/(*pro*)/*pol* genen en het *env* gen (en in geval van lentivirale vectoren ook het *rev* gen en eventueel het *tat* gen (bij een translentiviraal systeem)), worden *in trans* aangeleverd, hetzij op één of meer verschillende 'packaging' of 'helper' plasmiden, hetzij in een genetisch gemodificeerde (gg-) cellijn waar deze genen stabiel in het genoom zijn geïntegreerd. Aangezien tijdens de vectorproductie meerdere recombinaties nodig zijn om een replicatiecompetente vector te verkrijgen, is de kans op het ontstaan van replicatiecompetent virus verminderd. De kans hierop wordt verder verkleind door sequentieovereenkomst tussen het vectorgenoom, helperplasmiden en 'packaging' cellijnen te minimaliseren.

Voor onderzoeksdoeleinden worden de vectoren veelal gepseudotypeerd met envelopeiwitten (glycoproteïnen) van andere virussen, zoals het vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV, ook wel VSV genoemd) G-eiwit, het rabiësvirus G-eiwit, het *Gibbon ape leukemia virus* envelopeiwit, het

hemagglutinine/fusie glycoproteïne van het *Measles morbillivirus* (stam Edmonston) en het Feline endogenous virus RD114 envelopeiwit. Ook kunnen verschillende *Murine leukemia virus* envelopeiwit-varianten (waaronder de 10A1 en 4070A varianten) gebruikt worden.

### **3.2. Risico's van replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes**

Lenti- en gammaretrovirale vectoren kunnen in het genoom van de gastheercellen integreren; dit proces wordt insertionele mutagenese genoemd.<sup>b</sup> Dit kan gezondheidsrisico's met zich meebrengen wanneer door insertionele mutagenese een tumorsuppressorgen wordt verstoord (geïnactiveerd), of een proto-oncogen wordt geactiveerd, waardoor kanker kan ontstaan (oncogenese).<sup>20,21</sup> Zo is voor de gammaretrovirale vectoren afgeleid van MoMLV beschreven dat ze bij voorkeur nabij 'transcription start sites' integreren.<sup>22,23,24</sup> De promotor/enhancer activiteit van de LTR's aan de uiteinden van de geïntegreerde vector kan daarbij leiden tot de activatie van proto-oncogenen aanwezig op het gastheergenoom.<sup>20,21</sup>

Naast het optreden van insertionele mutagenese, kan de integratie van het vectorgenoom in het genoom van de gastheer nadelig zijn wanneer het gecodeerde genproduct schadelijk is voor de cel of gastheer. Als eventueel bijkomstig nadelig effect kunnen infectieuze vectordeeltjes een immuunreactie te weeg brengen.

### **3.3 Zelf-inactiverende lenti- en gammaretrovirale vectoren**

Teneinde de bioveiligheid van lenti- en gammaretrovirale vectoren te verbeteren, zijn zogenaamde zelf-inactiverende ('self inactivating' (SIN)) vectoren ontwikkeld.<sup>25,26</sup> In deze vectoren ontbreekt het domein van de 3' LTR dat de promotor en 'enhancer' elementen van de LTR bevat. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor de in het DNA geïntegreerde vector geen functionele LTR promotor/enhancer activiteit meer bezit. Hierdoor wordt de initiatie van transcriptie verhinderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk.<sup>26</sup> Daarnaast wordt verondersteld dat hierdoor de mogelijke activering van proto-oncogenen wordt voorkomen. Deze SIN-vectoren hebben nog wel een interne promotor ten behoeve van de expressie van het transgen, maar deze is niet afkomstig van een lenti- of gammaretrovirus en heeft een verminderde transformerende potentie.<sup>25,27,28</sup>

In de literatuur wordt er echter op gewezen dat bij de transcriptie van het transgen vanaf geïntegreerde SIN-vectoren 'read-through' transcriptie in het cellulaire genoom kan optreden, hetgeen zou kunnen resulteren in de vorming van onbedoelde virale-cellulaire fusietranscripten, en mogelijke activatie van 'downstream' proto-oncogenen of inactivatie van tumor-suppressorgen.<sup>29</sup> Ter verdere verbetering van de veiligheid en efficiëntie wordt er nog steeds onderzoek naar SIN-vectoren uitgevoerd, en worden er nog steeds aanpassingen aan deze vectoren gedaan.<sup>30</sup>

---

<sup>b</sup> De COGEM merkt op dat de termen insertionele mutagenese en insertionele oncogenese soms door elkaar gebruikt worden. Indien ten gevolge van de integratie van het vectorgenoom in het genoom van de cel kanker ontstaat, gebruikt de COGEM de term insertionele oncogenese. Indien de integratie niet tot kanker leidt, gebruikt zij de term insertionele mutagenese.

#### 4. Overwegingen

De COGEM heeft HIV-1 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3. De (muizen) gammaretrovirussen die ze geclassificeerd heeft, zoals *Murine leukemia virus* (waaronder MoMLV valt), heeft zij ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>31</sup> De inschaling van werkzaamheden met de hiervan afgeleide gg-virussen is conform de Regeling ggo gekoppeld aan het corresponderende inperkingsniveau (respectievelijk inperkingsniveau's III en II).<sup>32</sup>

Ten behoeve van de inschaling van werkzaamheden met van HIV-1 afgeleide lentivirale vectoren heeft de COGEM in 2009 een generiek advies uitgebracht met de criteria die zij hanteert om tot een inschaling te komen.<sup>1</sup> Deze inschaling wordt mede bepaald door het 'packaging' systeem waarmee de vector is geproduceerd en het feit of de vector al dan niet voorzien is van een SIN-deletie. Andere factoren die van belang zijn voor de omlaagschaling van *in vitro* werkzaamheden (productie, transductie en werkzaamheden met getransduceerde cellen) zijn de mogelijke vorming van een replicatiecompetent virus die gebaseerd is op de lentivirale vector (replicatiecompetent lentivirus, RCL), de aanwezigheid van en hoeveelheid vrije vectordeeltjes en de kans op complementatie en mobilisatie van de vector door de aanwezigheid van (wildtype) lentivirussen. In hoofdlijnen was de inschaling als volgt:

- indien er bij een handeling geen uitsluitel gegeven kan worden over de afwezigheid van RCL of (wildtype) lentivirussen, moeten de werkzaamheden, gezien de pathogeniteitsklasse van HIV-1 (klasse 3) op inperkingsniveau III worden uitgevoerd;
- indien de gebruikte gastheercellen vrij zijn van (wildtype) lentivirussen, en er géén RCL kan ontstaan (mede bepaald door het type/'generatie' productiesysteem waarmee de vector is geproduceerd) of aanwezig is in de gebruikte vectorbatch, maar er wel 'vrije' (dat wil zeggen niet-geïnternaliseerde) vectordeeltjes aanwezig zijn, dienen de werkzaamheden op inperkingsniveau II te worden uitgevoerd;
- indien de gebruikte gastheercellen vrij zijn van (wildtype) lentivirussen, en er geen RCL en geen vrije vectordeeltjes aanwezig zijn, kunnen werkzaamheden op het laagste inperkingsniveau (niveau I) worden uitgevoerd.

Wegens voortschrijdend inzicht, mede naar aanleiding van een door de COGEM geïnitieerd onderzoeksproject naar de COGEM formule voor de berekening van de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes,<sup>2,33</sup> wordt in het onderhavige advies het milieurisico van de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes (i.e., niet-geïnternaliseerde vectordeeltjes) heroverwogen. Daarbij wordt een nieuw inschalingsvoorstel gegeven, waarbij ook ingegaan wordt op handelingen met gammaretrovirale vectoren gebaseerd op muizen gammaretrovirussen en afgeleiden hiervan.

##### 4.1 Milieurisico van blootstelling aan vrije vectordeeltjes

Blootstelling aan vrije vectordeeltjes bij werkzaamheden onder Ingeperkt Gebruik kan alleen plaatsvinden bij laboratoriummedewerkers. Wanneer een laboratoriummedewerker geïnfecteerd raakt met vrije vectordeeltjes is verdere verspreiding naar derden niet mogelijk, omdat de genetische informatie die essentieel is voor replicatie, ontbreekt in deze vectoren (zie §3.1). De vrije vectordeeltjes vormen daarom geen milieurisico.

#### 4.1.1. Recombinatie en complementatie in de laboratoriummedewerker

In een theoretisch scenario kan een laboratoriummedewerker die geïnfecteerd is met wildtype HIV-1<sup>c</sup>, tijdens werkzaamheden geïnfecteerd raken met een lentiviraal vectordeeltje. Wanneer co-infectie optreedt van dezelfde gastheercel kan complementatie optreden waarbij het geïntegreerde vectorgenoom gemobiliseerd kan worden. Als de vector voorzien is van een SIN-deletie in de LTR, zal de kans op mobilisatie na integratie in het genoom van de gastheer(cel) aanzienlijk worden verminderd (zie §3.3). Bij een niet-SIN-vector kan mobilisatie optreden en zou de vector mee kunnen liften met het wildtype virus ('co-packaging' in virusdeeltjes), maar de lentivirale vector zal niet zelfstandig kunnen repliceren, omdat de genetische informatie essentieel voor replicatie, ontbreekt. Ook zou bij co-infectie met HIV recombinitie kunnen optreden met de vector, waarbij theoretisch een recombinant HIV kan ontstaan. Voor zowel mobilisatie (door complementatie) als recombinitie dient de lentivirale vector dezelfde cel te infecteren als HIV-1. De kans hierop is echter klein, omdat infectie met HIV-1 zich hoofdzakelijk beperkt tot CD4<sup>+</sup> T-cellen. Daarnaast zal eventuele recombinitie meestal resulteren in een slecht replicerend, of zelfs replicatie-deficiënt virus, aangezien opname van vectorsequenties in HIV zeer waarschijnlijk de expressie van de virale genen zal verstoren en een negatief effect zal hebben op het inpakken van het virale genoom in virusdeeltjes door het toenemen van de genomgrootte. De COGEM merkt op dat bij HIV-geïnfecteerden antiretrovirale therapie toegepast wordt, hetgeen niet alleen het HIV-1 remt, maar ook een eventuele infectie met de lentivirale vector en daarmee de kans op mobilisatie en recombinitie nog verder verkleint. Alles in overweging nemende, acht de COGEM het milieurisico verwaarloosbaar klein indien een met HIV-1 besmette laboratoriummedewerker wordt blootgesteld aan vrije lentivirale vectordeeltjes. Wel is er een mogelijk risico voor de medewerker (Arborisico, zie §4.2).

#### **4.2 Arborisico van blootstelling aan vrije vectordeeltjes**

Na blootstelling van de laboratoriummedewerker aan vrije vectordeeltjes kan vanwege het replicatiedeficiënte karakter van de lenti- en gammaretrovirale vectoren geen verdere verspreiding in het milieu optreden. Aan blootstelling aan vrije vectordeeltjes zijn echter wel verschillende potentiële gezondheidsrisico's verbonden, zoals met name het risico op oncogenese door insertionele mutagenese (zie §3.2), maar ook kunnen er mogelijke ongewenste effecten optreden die afhankelijk zijn van de gebruikte transgen-expressiecassette. In Nederland worden risico's voor derden in de categorie werknemers, zoals personeel in laboratoria, juridisch gezien onder de Arbeidsomstandighedenwet (Arbowet) geschaard,<sup>34</sup> en niet onder de milieuwetgeving<sup>d</sup>. De Arbowet dient ter waarborging dat alle werknemers veilig en gezond kunnen werken. Werkgevers en werknemers zijn samen verantwoordelijk voor de invulling van deze wet in de eigen organisatie. Bij aanpassing van de Regeling ggo en de inschalingsvoorstellen kunnen daarom op juridische gronden mogelijke risico's voor laboratoriummedewerkers niet in de overwegingen meegenomen worden.

---

<sup>c</sup> Aangezien het hier werkzaamheden betreft met lenti- en retrovirale vectoren die afgeleid zijn van HIV-1 of muizen gammaretrovirussen, is alleen co-infectie met HIV-1 als relevant scenario meegewogen. HIV-2 is hier buiten beschouwing gelaten, omdat de sequentieovereenkomst tussen HIV-2 en HIV-1 matig is (48%) en derhalve de kans op recombinitie en mobilisatie tussen de lentivirale vector en HIV-2 nog kleiner zal zijn dan met HIV-1. Andere lentivirussen, zullen een te beperkte sequentiehomologie hebben voor recombinitie en van andere gammaretrovirussen is tot op heden geen bewijs gevonden dat deze mensen kunnen infecteren.

<sup>d</sup> *Lex specialis derogat legi generali*: de arbeidsomstandighedenwet (Arbowet) heeft 'voorrang' boven de algemene milieuwetgeving.



### **4.3 Aanwezigheid van wildtype lentivirussen en exogene gammaretrovirussen**

Twee belangrijke aspecten die meewegen bij de inschaling van werkzaamheden met lenti- en retrovirale vectoren betreffen de aanwezigheid van respectievelijk wildtype lenti- of retrovirussen in de te gebruiken cellijnen en de mogelijkheid tot vorming van replicatiecompetent virus (RCV). Lenti- en gammaretrovirussen kunnen in verschillende diersoorten voorkomen. De COGEM acht het noodzakelijk dat bij alle handelingen met lenti- of gammaretrovirale vectoren aanwezigheid van verwante wildtype virussen uitgesloten is om recombinatie, complementatie en mobilisatie van de vectoren uit te sluiten.

Er zijn geen exogene gammaretrovirussen bekend die mensen infecteren. In het verleden is het echter voorgekomen dat een humane cellijn gecontamineerd is geraakt met muizengammaretrovirussen door toepassing als xenograft in muizen, waarbij een nieuw recombinant xenotroop gammaretrovirus is verworven.<sup>35</sup> Omdat het enige tijd heeft geduurd voordat bekend was dat deze cellen xenotroop muizenretrovirus produceerden (zo'n 10 jaar), heeft kruiscontaminatie naar andere cellijnen op kunnen treden, en is niet op voorhand uit te sluiten dat in sommige humane cellijnen ook muizen-gammaretrovirussen aanwezig kunnen zijn.<sup>36</sup>

### **4.4 Risico's van endogene gammaretrovirussen bij handelingen met gammaretrovirale vectoren**

De COGEM merkt op dat het uitsluiten van de aanwezigheid van gammaretrovirussen in dierlijke cellijnen lastig kan zijn. In diverse gewervelde dieren, waaronder muizen, vogels, varkens, ratten en katten, kunnen intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen (ERVs) aanwezig zijn. Vaak zijn deze endogene gammaretrovirussen defectief, maar dit berust in sommige gevallen op een enkele puntmutatie. Hierdoor bestaat de kans dat in deze cellijnen spontaan na verschillende passages of na behandeling met bijvoorbeeld UV-straling, X-ray of blootstelling aan mutagene stoffen, herstel van de replicatiecapaciteit optreedt en alsnog replicatiecompetent gammaretrovirus geproduceerd wordt. Aangezien (gamma)retrovirussen - in tegenstelling tot lentivirussen - geen lytische infectie veroorzaken, wordt de productie van gammaretrovirussen uit deze endogene gammaretrovirale sequenties niet altijd gedetecteerd. Hierdoor kunnen gammaretrovirussen in bepaalde cellijnen al dan niet sluimerend aanwezig zijn.

Een voorbeeld hiervan zijn rattencellen. Voor zover bekend zijn er geen exogene gammaretrovirussen die ratten infecteren.<sup>e</sup> Echter, in de wetenschappelijke literatuur is melding gemaakt van een ERV in ratten, destijds aangeduid als rat leukemia virus (RaLV), dat verwantschap vertoont met de gammaretrovirussen *Feline leukemia virus* en in mindere mate *Murine leukemia virus* en waaruit na herhaalde passage van embryonale rattencellen spontaan exogeen replicatiecompetent RaLV geproduceerd kan worden.<sup>10,37</sup> Daarnaast is van RaLV beschreven dat door recombinatie tussen exogeen RaLV en endogene proto-oncogenen in tumorcellen van ratten het Rasheed rat sarcoma virus (RaSV) – een replicatie-deficiënt virus – gevormd kan worden.<sup>37,38</sup>

---

<sup>e</sup> De door de ICTV erkende virusspecies *Kirsten murine sarcoma virus* (Ki-MSV) en *Harvey murine sarcoma virus* (Ha-MSV) worden in onderhavig advies niet als natuurlijke rattenvirussen beschouwd. Deze virussen zijn ontstaan door muizen retrovirussen (murine erythroblastosis virus en Moloney murine leukemia virus) te passeren in ratten, waarbij de virussen door recombinatie genetische elementen (o.a. het *ras* oncogen) uit het rattengenoom hebben opgenomen.<sup>36</sup>

Naast het feit dat ERVs in cellen van bepaalde diersoorten (o.a. muizen, varkens, vogels, ratten en katten) onder bepaalde laboratoriumomstandigheden spontaan exogeen gammaretrovirus kunnen produceren, kan bij een grote sequentiehomologie tussen de ERVs en de gammaretrovirale sequenties in een retrovirale vector recombinatie optreden. Indien de endogene gammaretrovirale sequenties de genetische informatie bevatten die noodzakelijk is voor het herstellen van de replicatiecapaciteit van de vector, kan een recombinant replicatiecompetent gammaretrovirus ontstaan. Ook kan door complementatie mobilisatie van de retrovirale vector plaatsvinden in deze cellen. Zo is in de literatuur gerapporteerd dat transfectie van een defectief MoMLV provirus in rattencellen waarin defectief endogeen RaLV aanwezig is, resulteerde in de productie van een recombinant replicatiecompetent retrovirus.<sup>39</sup> Alhoewel zich in humane cellen ook klasse I HERVs bevinden die sequentiehomologie vertonen met de huidige gamma- en epsilonretrovirussen, zijn deze HERVs dusdanig geïnactiveerd dat het uiterst onwaarschijnlijk is dat recombinatie met een gammaretrovirale vector kan leiden tot recombinant replicatiecompetent virus.

## **5. Inschalingsvoorstel**

De COGEM acht het milieurisico van aanwezigheid van vrije vectordeeltjes verwaarloosbaar klein. Dit in acht nemende, heeft de COGEM de inschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren heroverwogen. Ook heeft zij een inschalingsvoorstel voor werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren gebaseerd op muizen gammaretrovirussen en afgeleiden hiervan, in onderhavig advies uiteengezet. In onderstaande paragrafen wordt eerst het inschalingsvoorstel voor lentivirale vectoren heroverwogen, en vervolgens wordt ingegaan op het inschalingsvoorstel voor gammaretrovirale vectoren.

### ***5.1 Nieuw inschalingsvoorstel voor handelingen met lentivirale vectoren***

In onderstaande paragrafen is de inschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren heroverwogen. Om in aanmerking te komen voor omlaagschaling van de verschillende handelingen met lentivirale vectoren acht de COGEM het voor alle werkzaamheden noodzakelijk dat er geen replicatie-competent lentivirus (RCL) gevormd kan worden, en de te gebruiken cellen of cellijnen vrij zijn van wildtype lentivirussen om recombinatie, complementatie en mobilisatie van de vectoren uit te sluiten.

#### **5.1.1 Productiewerkzaamheden**

Bij gebruik van lentivirale vectorproductiesystemen hangt de mogelijkheid op het ontstaan van replicatie-competent lentivirus (RCL) af van welk vectorproductiesysteem (1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup> of 3<sup>e</sup> generatie al dan niet in combinatie met een SIN LTR) gebruikt wordt.<sup>1</sup> Bij gebruik van lentivirale productiesystemen waarbij de kans op het ontstaan van RCL op voorhand verwaarloosbaar klein is (i.e., 3<sup>e</sup> generatie SIN, of translentivirale productiesystemen) is de COGEM van oordeel dat de productie op ML-I kan plaatsvinden. Bij gebruik van productiesystemen waarbij op voorhand niet uitgesloten kan worden dat RCL kan ontstaan, zoals bij een 2<sup>e</sup> generatie productiesysteem in combinatie met een niet-SIN vector, dienen de handelingen op ML-III plaats te vinden, conform de pathogeniteitsklasse van HIV-1.

#### **5.1.2 Transductiewerkzaamheden**

Wanneer lentivirale vectoren ingezet worden voor transductie van cellen, acht de COGEM het noodzakelijk dat de te gebruiken vectorbatch vrij is van RCL alvorens deze handelingen omlaaggeschaald kunnen

worden. Indien de te gebruiken lentivirale vectoren geproduceerd zijn met een productiesysteem waarvan de kans op het ontstaan van RCL verwaarloosbaar klein is, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van transductiewerkzaamheden met deze lentivirale vectoren op ML-I inperkingsniveau verwaarloosbaar klein zijn. Wanneer op voorhand niet uitgesloten kan worden dat er tijdens de productie RCL kan ontstaan, acht de COGEM omlaagschaling naar ML-I alleen mogelijk wanneer de te gebruiken vectorbatch negatief is getest op aanwezigheid van RCL voorafgaand aan transductie.

### 5.1.3 Werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen

Na lentivirale transductie worden de gg-cellen enige tijd gekweekt, en vervolgens zullen de cellen enkele (inactiverende) wasstappen ondergaan om de resterende vrije vectordeeltjes te verwijderen. De COGEM merkt op dat door biologisch verval en de wasstappen het aantal vrije vectordeeltjes en daardoor de kans op blootstelling van medewerker, sterk gereduceerd zullen worden. De COGEM is van oordeel dat werkzaamheden met getransduceerde cellen op ML-I ingeschaald kunnen worden indien de lentivirale vectorbatch die gebruikt wordt voor transductie (bewezen) vrij is van RCL. Met dit voorschrift en het algemeen geldende voorschrift dat de te gebruiken cellen vrij moeten zijn van lentivirussen, acht de COGEM de kans op RCL-vorming in de getransduceerde cellen en verspreiding naar mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### 5.1.4 Risico's van contaminatie op inperkingsniveau I bij werkzaamheden met lentivirale vectoren

Aangezien er op inperkingsniveau I niet gewerkt mag worden met wildtype virussen (of replicatie-competente lentivirussen), is contaminatie van buitenaf tijdens handelingen met wildtype lentivirussen niet mogelijk. Wel bestaat de mogelijkheid dat er in dezelfde ML-I ruimte gewerkt wordt met lentivirale constructen afgeleid van deze wildtype virussen. Bij werkzaamheden met lentivirale vectoren waarbij gebruik gemaakt wordt van een niet-SIN-vector, bestaat de mogelijkheid dat het vectorgenoom uit het gastheercelgenoom gemobiliseerd kan worden, indien er gedurende of na transductie van een gastheercel complementatie optreedt door contaminatie met lentivirale constructen. De COGEM merkt op dat eventuele vectordeeltjes die vervolgens zouden ontstaan, wederom replicatiedeficiënt zullen zijn, omdat de genetische informatie essentieel voor replicatie, ontbreekt. Bij gebruik van een SIN-vector is de kans op mobilisatie verwaarloosbaar klein.

In het meest ernstige geval zou theoretisch ten gevolge recombinatie een replicatiecompetent virus ontstaan. De COGEM merkt op dat dit alleen mogelijk is als: a) één cel gelijktijdig gecontamineerd wordt met verschillende constructen, waarbij b) de constructen tezamen alle genetische informatie bevatten die noodzakelijk is voor het herstellen van de replicatiecapaciteit, c) deze constructen overlappende nucleotidensequenties bevatten die recombinatie mogelijk maken, en d) er meerdere recombinaties gelijktijdig optreden. De kans dat aan al deze voorwaarden wordt voldaan tijdens een laboratorium-experiment met lentivirale vectoren, acht zij verwaarloosbaar klein.

## **5.2 Inschalingsvoorstel gammaretrovirale vectoren**

In onderstaande paragrafen is de inschaling van werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren afgeleid van muizen gammaretrovirussen uiteengezet. Om in aanmerking te komen voor omlaagschaling van de verschillende handelingen met deze gammaretrovirale vectoren acht de COGEM het voor alle

werkzaamheden noodzakelijk dat er geen replicatiecompetent gammaretrovirus (RCR) gevormd kan worden en dat de cellen vrij dienen te zijn van gammaretrovirussen. Een belangrijk aspect dat hierbij tevens een rol speelt is de aanwezigheid van intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen in de gebruikte cellijnen.

#### 5.2.1 Productie van gammaretrovirale vectoren

Tijdens de productie van gammaretrovirale vectoren zou replicatiecompetent gammaretrovirus (RCR) kunnen ontstaan door recombinatie tussen de verschillende plasmiden benodigd voor de productie van de virale vector, of met de eventueel aanwezige endogene gammaretrovirussequenties in de voor productie gebruikte cellijn.<sup>40</sup> Hoewel voor de reconstructie van het gehele gammaretrovirale genoom meerdere recombinatie 'events' nodig zijn om een infectieus virusdeeltje te construeren, is de COGEM van oordeel dat de kans op het ontstaan van RCR bij gebruik van een gammaretroviraal productiesysteem niet geheel uit te sluiten is.<sup>40</sup> Teneinde verspreiding van RCR in het milieu te voorkomen, adviseert de COGEM derhalve om productie van gammaretrovirale vectoren, conform de pathogeniteitsklasse van muizen gammaretrovirussen, op inperkingsniveau II te laten plaatsvinden.

#### 5.2.2 Transductiewerkzaamheden

Zoals eerder is opgemerkt, kunnen cellijnen van diverse diersoorten (waaronder muizen-, vogel-, katten-, varkens-, of rattencellen) intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten en kunnen in deze cellijnen mogelijk ongemerkt gammaretrovirussen geproduceerd worden. Bij transductie van cellen die mogelijk dergelijke endogene (onopgemerkte exogene) gammaretrovirussen bevatten met een gammaretrovirale vector, is niet uit te sluiten dat er homologe recombinatie op kan treden waarbij een recombinant replicatiecompetent gammaretrovirus kan ontstaan of dat mobilisatie van de retrovirale vector plaats kan vinden. Derhalve adviseert de COGEM transductie met gammaretrovirale vectoren in combinatie met cellijnen die behoren tot een soort anders dan humane cellijnen die (van nature) geen intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten, op ML-II plaats te laten vinden.

In humane cellijnen is aanwezigheid van intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen uitgesloten. Ook zijn er geen gammaretrovirussen bekend die mensen kunnen infecteren. Bij cellen van humane oorsprong, waarin restanten endogene gammaretrovirale sequenties aanwezig zijn (klasse I HERVs), is na transductie met een gammaretrovirale vector nooit vorming van RCR waargenomen. Een uitzonderlijke situatie doet zich voor in gecontamineerde humane cellijnen waarbij in het verleden insleep van een gammaretrovirus is opgetreden in het (dier)laboratorium.<sup>35,36</sup> De kans om met een dergelijke gecontamineerde humane cellijn te werken is echter klein. Het is echter wel belangrijk dat de onderzoeker de humane cellen test op aanwezigheid van gammaretrovirussen.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat bij werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren in humane cellijnen, die van nature geen intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten, het risico op de vorming van RCR verwaarloosbaar klein is, mits de te gebruiken vectorbatch eveneens vrij is van RCR en de te gebruiken cellen getest zijn op de afwezigheid van (replicatiecompetente) gammaretrovirussen. De COGEM wijst hierbij op het belang van het verifiëren van de identiteit van de te

gebruiken cellijn. Onder deze voorwaarden adviseert de COGEM transductiewerkzaamheden met gammaretrovirale vectoren in combinatie met humane cellen op inperkingsniveau I uit te voeren. Daarbij adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Er vindt een scheiding plaats tussen de werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen en cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze vaak endogene gammaretrovirussen bevatten (o.a. muizen-, vogel-, varkens-, katten-, en rattencellen) in tijd en ruimte om kruiscontaminatie te voorkomen. Voor de scheiding van werkzaamheden kan gedacht worden aan gescheiden laboratoriumruimtes of het gescheiden gebruik van veiligheidskabinetten;
- Voor de gelijktijdige werkzaamheden met andere cellen, dient aangetoond zijn dat deze negatief zijn voor gammaretrovirussen.

Voor transductiewerkzaamheden met cellijnen die vooraf niet negatief getest zijn op aanwezigheid van gammaretrovirussen adviseert de COGEM een inschaling op inperkingsniveau II te hanteren.

### 5.2.3 Werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen

De COGEM is van oordeel dat voor omlaagschaling van werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen aan dezelfde voorwaarden en aanvullende voorschriften voldaan dient te worden zoals gehanteerd bij omlaagschaling van transductie met gammaretrovirale vectoren. Door toepassing van kweek en wasstappen wordt tevens het aantal vrije vectordeeltjes sterk verminderd, waardoor het eventuele gezondheidsrisico van blootstelling aan vrije vectordeeltjes voor de medewerker beperkt wordt.

## **6. Conclusie en advies**

Gezien het feit dat SIN en niet-SIN replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes niet kunnen verspreiden omdat de genetische informatie essentieel voor replicatie ontbreekt, acht de COGEM de milieurisico's van aanwezige vrije vectordeeltjes bij werkzaamheden met dit type vectoren verwaarloosbaar klein. Zij merkt hierbij op dat er voor de laboratoriummedewerkers wel potentiële gezondheidsrisico's zijn verbonden aan werkzaamheden met vrije vectordeeltjes.

De COGEM heeft in onderhavig advies de inschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren heroverwogen, en heeft daarnaast een inschalingsadvies gegeven over werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren gebaseerd op muizen gammaretrovirussen en afgeleiden hiervan.

Voor productie- of transductiewerkzaamheden met lentivirale vectoren en werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen adviseert de COGEM een inschaling op inperkingsniveau I indien aan de volgende voorwaarden voldaan wordt:

- De te gebruiken cellen zijn bij alle handelingen vrij van lentivirussen, teneinde het ontstaan van een recombinant virus, of mobilisatie van het vectorgenoom uit te sluiten;
- Bevestigd is dat er tijdens de productie geen RCL kan ontstaan, of in het geval van transductiewerkzaamheden (of daaropvolgend werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde cellen) de toe te passen of toegepaste vectorbatches vrij zijn van RCL.

Voor werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren is de COGEM van oordeel dat bij de productie niet geheel uitgesloten kan worden dat er RCR kan ontstaan, en adviseert zij de productie van deze vectoren op inperkingsniveau ML-II te laten plaatsvinden. Voor transductiewerkzaamheden met gammaretrovirale vectoren en werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen adviseert de COGEM deze werkzaamheden op ML-II uit te voeren indien gebruik gemaakt wordt van niet-humane cellijnen wegens mogelijke aanwezigheid van intacte (of vrijwel intacte) ERVs. Zij adviseert transductiewerkzaamheden met gammaretrovirale vectoren en werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen alleen op inperkingsniveau ML-I plaats te laten vinden indien aan de volgende voorwaarden en voorschriften voldaan wordt:

- De te gebruiken cellijnen zijn van humane oorsprong en zijn bewezen vrij van (replicatiecompetente) gammaretrovirussen (aangetoond met een gevalideerde test) teneinde het ontstaan van een recombinant virus, of mobilisatie van het vectorgenoom uit te sluiten;
- De te gebruiken gammaretrovirale vectorbatch voor transductie is vrij van RCR;
- Er vindt een scheiding plaats tussen de werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen en cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze vaak intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten (o.a. muizen-, vogel-, varkens-, katten-, en rattencellen) in tijd en ruimte om kruiscontaminatie te voorkomen. Voor de scheiding van werkzaamheden kan gedacht worden aan gescheiden laboratoriumruimtes of het gescheiden gebruik van veiligheidskabinetten;
- Voor de gelijktijdige werkzaamheden met andere cellen, dient aangetoond zijn dat deze negatief zijn voor gammaretrovirussen.

Wanneer bij werkzaamheden met lenti- en gammaretrovirale vectoren aan deze voorwaarden voldaan wordt en deze aanvullende voorschriften (voor gammaretrovirale vectoren) gehanteerd worden, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCV bij het uitvoeren van de werkzaamheden op inperkingsniveau ML-I verwaarloosbaar klein.

### **6.1 Signalering vanuit ARBO-overwegingen**

Vrije vectordeeltjes vormen een potentieel risico voor de laboratoriummedewerker, maar verdere verspreiding van deze vectordeeltjes is niet mogelijk. De veiligheid van de medewerkers valt onder de Arbo-wetgeving en niet onder de reikwijdte van de ggo- of milieuwetgeving. De COGEM signaleert dat vanuit Arbo-overwegingen maatregelen noodzakelijk zijn om blootstelling aan vrije vectordeeltjes en mogelijke infectie te voorkomen. Teneinde het risico voor de medewerker te beperken acht zij het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II kabinet), en het dragen van handschoenen noodzakelijk bij werkzaamheden waarbij de kans op blootstelling aan vrije vectordeeltjes hoger is, i.e., tijdens de productie van de vectordeeltjes of het inzetten van transducties (bereiden gg-cellen), waarbij met grote hoeveelheden vectordeeltjes gewerkt wordt.

Na een transductie-experiment zullen de gg-cellen enige tijd gekweekt worden. Vervolgens zullen de cellen enkele (inactiverende) wasstappen ondergaan om de resterende vrije vectordeeltjes te verwijderen. Door biologisch verval en de wasstappen zal bij werkzaamheden met getransduceerde cellen het aantal vrije vectordeeltjes in de tijd sterk afnemen. De COGEM wijst erop dat de hoeveelheid resterende vrije

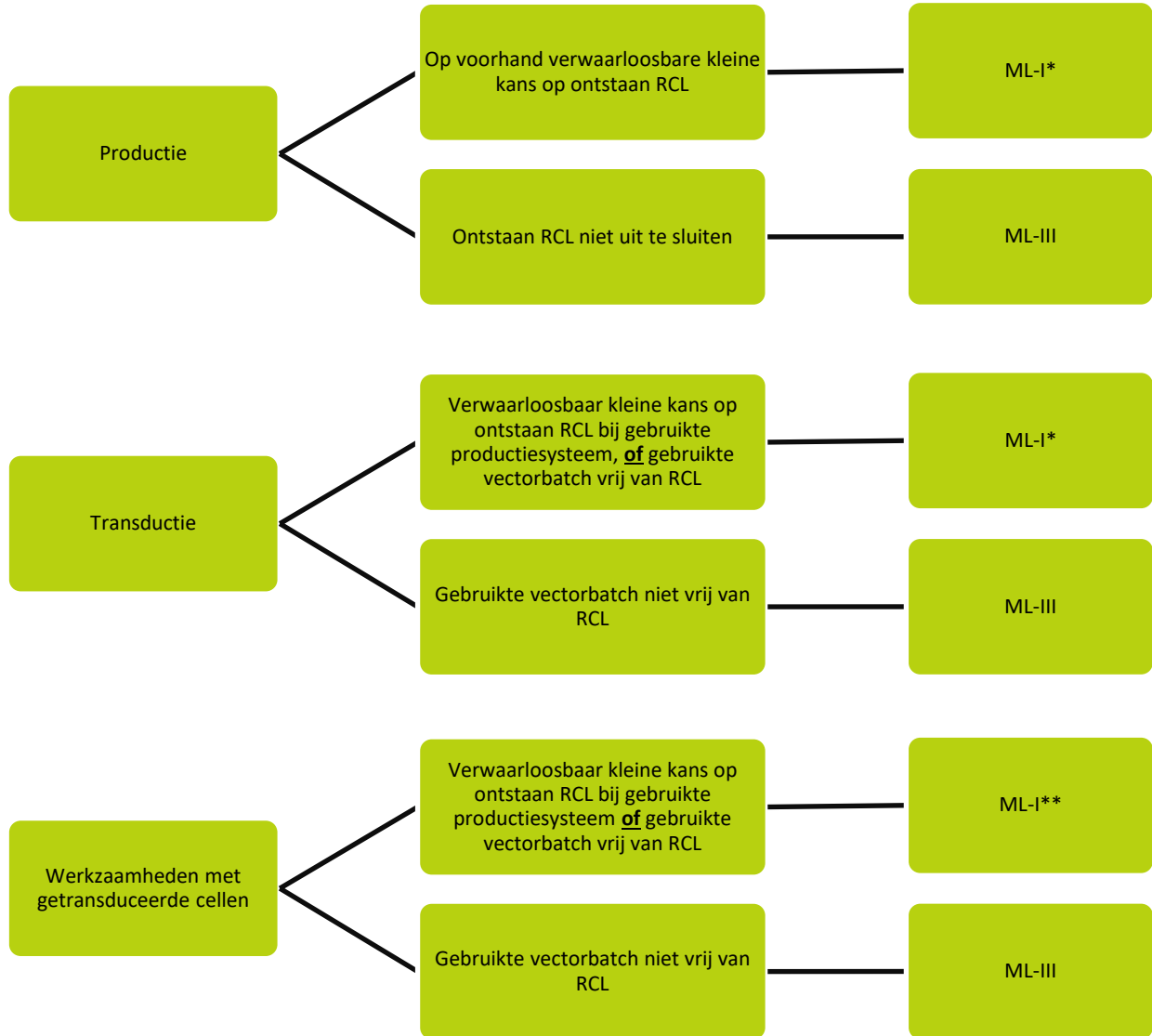
vectordeeltjes experimenteel bepaald kan worden. Bij gebruik van lentivirale vectordeeltjes kan als alternatieve methode de door de COGEM opgestelde rekenformule toegepast worden om de hoeveelheid resterende vectordeeltjes te bepalen.<sup>1,33</sup> Toepassing van de formule is niet geschikt voor de berekening van vrije gammaretrovirale vectordeeltjes, omdat er nog onzekerheden zijn over de halfwaardetijden van deze vectoren. De COGEM-formule schat de afname aan vrije infectieuze vectordeeltjes gedurende de transductie en het wassen van de (gg-)cellen, en relateert deze aan het aantal tijdens de transductie toegevoegde vectordeeltjes. De afname in vectordeeltjes wordt weergegeven in de zogenaamde 'reductieratio' (Rr). Het aantal deeltjes kan vervolgens berekend worden aan de hand van de reciproke waarde van de reductieratio (1/Rr). Naar aanleiding van een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject naar de experimentele validatie van de COGEM-formule, is gebleken dat de meeste waarden van de parameters in de formule variabel en soms ook methode-afhankelijk zijn.<sup>2</sup> In het uitgebrachte onderzoeksrapport is daarom een vernieuwde formule opgenomen, die alleen te gebruiken is voor cultures met hechtende cellen en waarvan de waarden alleen betrekking hebben op lentivirale vectoren.

Indien het niet mogelijk is om de COGEM formule toe te passen, bijvoorbeeld wegens het ontbreken van gegevens over de halfwaardetijd van de vector, kan een veiligheidsperiode van 7 dagen gehanteerd worden, omdat het aantal aanwezige vrije vectordeeltjes door natuurlijk verval na deze termijn verder afgenomen en verwaarloosbaar klein zal zijn.

## **7. Samenvatting in diagrammen**

In de diagrammen op de volgende pagina's wordt bovenstaand inschalingsadvies grafisch weergegeven. Voor de inschaling van alle werkzaamheden geldt dat de te gebruiken cellen bij alle handelingen bewezen vrij zijn van lenti- of gammaretrovirussen.

## 7.1 Lentivirale vectoren



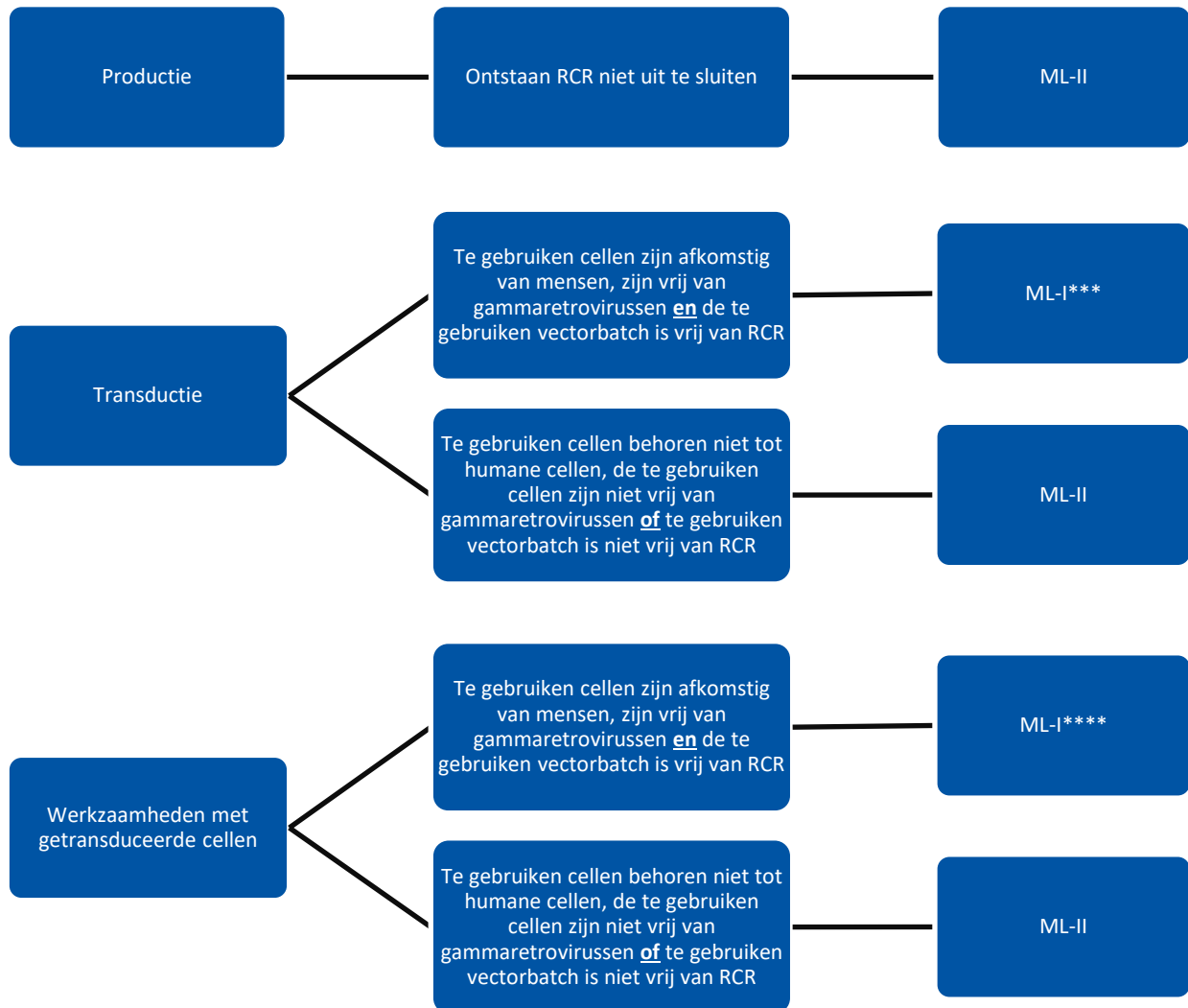
\* De COGEM wijst op het belang om vanuit Arbo-overwegingen additionele maatregelen te nemen, zoals het uitvoeren van open handelingen in een VK-II en handschoenen.

\*\* De COGEM wijst op het belang om vanuit Arbo-overwegingen additionele maatregelen te nemen, zoals het uitvoeren van open handelingen in een VK-II en handschoenen indien er nog vrije vectordeeltjes aanwezig zijn.

**RCL:** replicatiecompetent lentivirus.



## 7.2 Gammaretrovirale vectoren



\*\*\* Met inachtneming van voorschriften om de werkzaamheden gescheiden te houden van cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten (o.a. muizen-, vogel-, varkens-, katten-, en rattencellen), of andere cellen die niet negatief zijn getest op aanwezigheid van gammaretrovirussen. De COGEM wijst daarnaast op het belang om vanuit Arbo-overwegingen additionele maatregelen te nemen, zoals het uitvoeren van open handelingen in een VK-II en handschoenen.

\*\*\*\* Met inachtneming van voorschriften om de werkzaamheden gescheiden te houden van cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze vaak intacte (of vrijwel intacte) endogene gammaretrovirussen bevatten (o.a. muizen-, vogel-, varkens-, katten-, en rattencellen), of andere cellen die niet negatief zijn getest op aanwezigheid van gammaretrovirussen. De COGEM wijst daarnaast op het belang om vanuit Arbo-overwegingen additionele maatregelen te nemen, zoals het uitvoeren van open handelingen in een VK-II en handschoenen indien er nog vrije vectordeeltjes aanwezig zijn.

**RCR:** Replicatiecompetent gammaretrovirus.

## Referenties

1. COGEM (2009). Handelingen met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
2. Dautzenberg IJC & Hoeben RC (2020). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles. COGEM rapport CGM 2020-01
3. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 3 februari 2021)
4. Goff SP (2013). Retroviridae. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
5. Freed EO & Martin MA (2013). Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
6. Gifford RJ *et al.* (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. *Retrovirology* 15: 59
7. Hayward A *et al.* (2013). Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus-host evolution. *PNAS* 110: 20146-20151
8. Mager DL & Stoye JP (2014). Mammalian endogenous retroviruses. *Microbiol. Spectrum* 3: MDNA3-0009-2014
9. Lowy *et al.* (1971). Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. *Science* 174: 155-156
10. Rasheed S *et al.* (1976). Spntaneous release of endogenous ecotropic type C virus from rat embryo cultures. *J. Virol.* 18: 799-803
11. Rasmussen HB (1997). Interactions between exogenous and endogenous retroviruses. *J. Biomed. Sci.* 4: 1-8
12. Vargiu L *et al.* (2016). Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology* 13: 7
13. Villesen P *et al.* (2004). Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1: 32-44
14. Lander ES *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
15. Dewannieux M & Heidmann T (2013). Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr. Opin. Virol.* 3: 646-656
16. Reus K *et al.* (2000). Genomic Organization of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K(HML-2.HOM) (ERV6) on Chromosome 7. *Genomics* 72: 314-320
17. Boller K *et al.* (2008). Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J. Gen. Virol.* 89: 567-572
18. Lee YN & Bieniasz PD (2007). Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog.* 3: e10
19. Katzourakis A *et al.* (2007). Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6261-6265
20. Sadelain M (2004). Insertional oncogenesis in gene therapy: how much of a risk? *Gene Ther.* 11: 569-573
21. Schlimgen R *et al.* (2016). Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. *J. Occup. Environ. Med.* 58: 1159-1166
22. Bushman F *et al.* (2005). Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 848-

23. Cattoglio C *et al.* (2007). Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110: 1770–1778
24. Cattoglio C *et al.* (2010). High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 116: 5507-5517
25. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
26. Kappes JC & Wu X (2002). Safety consideration in vector development *Somat. Cell Mol. Genet.* 126: 147-158
27. Modlich U *et al.* (2009). Insertional transformation of hematopoietic cells by selfinactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol. Ther.* 17: 1919–1928
28. Corrigan-Curay J *et al.* (2012). Challenges in vector and trial design using retroviral vectors for long-term gene correction in hematopoietic stem cell gene therapy. *Mol. Ther.* 20: 1084-1094
29. Scholz SJ *et al.* (2017). Lentiviral vector promoter is decisive for aberrant transcript formation. *Hum. Gene Ther.* 28: 875-885
30. Song L *et al.* (2019). Improved biosafety of a lentiviral vector by reducing cellular gene activation. *J. Gene Med.* 21: doi.org/10.1002/jgm.3087
31. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
32. Bijlage 5 behorende bij artikel 16 en artikel 17, tweede lid, van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezocht: 3 februari 2021)
33. COGEM (2020). Generiek advies over de milieurisicobeoordeling van klinische studies met ex vivo lentiviraal getransduceerde cellen: aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medisch product. COGEM advies CGM/200507-01
34. Arbeidsomstandighedenwet. Wet van 18 maart 1999, houdende bepalingen ter verbetering van de arbeidsomstandigheden (Arbeidsomstandighedenwet 1998)
35. Delviks-Frankenberry K *et al.* (2012). Recombinant origin, contamination, and de-discovery of XMRV. *Curr. Opin. Virol.* 2: 499-507
36. Takeuchi Y *et al.* (2008). Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* 82: 12585-12588
37. Lee SY *et al.* (1998). Genetic Analysis of the Rat Leukemia Virus: Influence of Viral Sequences in Transduction of the c-ras Proto-Oncogene and Expression of Its Transforming Activity. *J. Virol.* 72: 9906-9917
38. Rasheed S *et al.* (1978). In vitro isolation of stable rat sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 75: 2972-2976
39. Villanueva RA *et al.* (2003). Molecular analysis of a recombinant M-MuLV/RaLV retrovirus. *Virology* 315: 195-208
40. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01