

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 17 mei 2022
KENMERK CGM/220517-02
ONDERWERP Vervolgadvies Inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een vervolgadvisvraag over de inschaling van werkzaamheden met replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes (COG 21-002_000.adv.2), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

In 2021 heeft de COGEM een advies uitgebracht waarin de criteria voor de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met replicatiedeficiënte lentivirale vectoren onder Ingeperkt gebruik zijn heroverwogen, en is een inschalingsvoorstel gedaan voor dezelfde werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren.

In navolging op dit advies heeft Bureau GGO een aanvullende adviesvraag gesteld. Hierin zijn twee vragen voorgelegd die betrekking hebben op het gebruik van macrofaagachtige cellen na transductie met lentivirale vectoren, en over de huisvesting van proefdieren in associatie met lentiviraal getransduceerde macrofaagachtige cellen. De vraag komt voort uit een eerder COGEM advies waarin erop gewezen wordt dat macrofaagachtige cellen vectordeeltjes kunnen 'internaliseren' en verspreiding van vectordeeltjes vanuit macrofagen kan optreden.

In het onderhavige advies beantwoordt de COGEM deze vragen en licht daarbij haar antwoorden nader toe. Concluderend is zij van oordeel dat, voor het gebruik van getransduceerde macrofaagachtige cellen en bij huisvesting van proefdieren in associatie met deze cellen, geen aangepaste voorschriften gehanteerd hoeven te worden. Omdat geïnternaliseerde vectordeeltjes alleen via direct cel-cel contact overgedragen kunnen worden en niet vrijkomen in het kweekmedium, acht de COGEM de kans op blootstelling aan de cellen met geïnternaliseerde vectordeeltjes bij reguliere celkweekhandelingen verwaarloosbaar klein. Zij signaleert om bij invasieve handelingen met proefdieren in associatie met macrofagen, waarin zich geïnternaliseerde deeltjes kunnen bevinden, passende beschermende maatregelen in acht te nemen.



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.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau GGO
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's, DG Milieu en Internationaal



Vervolgadvies Inschaling replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes

COGEM advies CGM/220517-02

1. Inleiding

In navolging op het advies van de COGEM getiteld 'Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes' (CGM/210218-01),¹ en vervolgadvies CGM/210503-01,² is door Bureau GGO een aanvullende adviesvraag gesteld (COG 21-002_000.adv.2).

COGEM advies CGM/210218-01 betreft een heroverweging van de criteria voor de inschaling van *in vitro* werkzaamheden (productie, transductie en werkzaamheden met getransduceerde cellen) met replicatiedeficiënte lentivirale vectoren onder Ingeperkt gebruik waarover in 2009 is geadviseerd³, en een inschalingsvoorstel voor dezelfde werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren. In het advies heeft de COGEM gesignaleerd dat de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes bij transductiewerkzaamheden, of bij werkzaamheden met getransduceerde cellen een potentieel risico vormt voor de laboratoriummedewerker en dat daarom vanuit Arbo-overwegingen maatregelen nodig zijn om blootstelling aan vrije vectordeeltjes te voorkomen. Voor handelingen met getransduceerde cellen kan het aantal vrije vectordeeltjes experimenteel of theoretisch (met behulp van de COGEM-formule; deze formule geldt alleen voor lentivirale vectoren) bepaald worden. Indien dit niet mogelijk is, kan een veiligheidsperiode van 7 dagen gehanteerd worden, waarna aangenomen kan worden dat door natuurlijk verval het aantal aanwezige vectordeeltjes verwaarloosbaar klein zal zijn.¹

De aanvullende adviesvraag van Bureau GGO omvat twee vragen, die betrekking hebben op het gebruik van macrofaagachtige cellen na transductie met lentivirale vectoren, en over de huisvesting van proefdieren in associatie met lentiviraal getransduceerde macrofaagachtige cellen. In de onderstaande tekst wordt puntsgewijs ingegaan op de vragen.

2. Gebruik van macrofaagachtige cellen in combinatie met lentivirale vectoren

In het eerdere COGEM advies uit 2009³ wordt gewezen op de mogelijkheid tot internalisatie en latere uitscheiding van lentivirale deeltjes door macrofaagachtige cellen. Vanwege deze eigenschappen wordt het gebruik van macrofaagachtige cellen buiten beschouwing gelaten. In het advies uit 2021 wordt niet ingegaan op de reductie van vrije vectordeeltjes bij gebruik van lentivirale vectoren in combinatie met macrofaagachtige cellen.

Bureau GGO hanteert thans als voorschrift voor omlaagschaling van lentiviraal getransduceerde macrofaagachtige cellen dat deze cellen, waaronder macrofagen, dendritische cellen en folliculaire dendritische cellen, na transductie met een gevalideerde methode worden getest op afwezigheid van vrije infectieuze virusdeeltjes, omdat de COGEM-formule niet toepasbaar is op macrofaagachtige

cellen. Aangezien in het advies uit 2021 voor transductiewerkzaamheden of werkzaamheden met getransduceerde cellen, naast het gebruik van de COGEM formule, een alternatief wordt gegeven in de vorm van een veiligheidsperiode, heeft Bureau GGO de volgende vraag gesteld:

“Is de COGEM van mening dat voor macrofaagachtige cellen een veiligheidsperiode van 7 dagen (of een andere veiligheidsperiode) gehanteerd kan worden (op ML-I niveau) voor de reductie van het aantal (vrije) vectordeeltjes naar verwaarloosbare hoeveelheden? Graag een uiteenzetting.

***NB:** Bij toepassing van lentiviraal getransduceerde macrofaagachtige cellen op ML-I is het antwoord op de bovengestelde vraag met name van belang voor de gebruiker vanuit het oogpunt van ARBO aangezien de mogelijke aanwezigheid van geïnternaliseerde deeltjes in macrofaagachtige cellen een risico voor de medewerker kan inhouden.”*

Antwoord:

Van macrofaagachtige cellen (macrofagen, monocyt en dendritische cellen) is bekend dat deze Human immunodeficiency virus (HIV), maar ook andere virusdeeltjes, kunnen internaliseren.^{4,5,6,7} Onder andere uit gegevens in de recente wetenschappelijke literatuur blijkt dat de virusdeeltjes tijdens dit proces intact blijven en hun infectiviteit behouden. In een later stadium kunnen de deeltjes via direct (cel-cel) contact worden overgedragen naar andere cellen; in het geval van HIV vindt overdracht plaats naar CD4+ T-cellen.^{5,6,8} De geïnternaliseerde virusdeeltjes komen bij dit proces, dat trans-infectie wordt genoemd, niet vrij in de omgeving.^{5,8} Er zijn verschillende mechanismen gepubliceerd voor de internalisatie van virusdeeltjes.^{4,6,8} Hoewel bekend is dat macrofagen een rol spelen in de latentie van een HIV-infectie in mensen, is niet duidelijk welke invloed de geïnternaliseerde virusdeeltjes hierbij precies spelen. Wel is duidelijk dat virusdeeltjes gedurende langere tijd intact aanwezig kunnen blijven in macrofagen.^{4,5}

De COGEM merkt op dat bovenstaande informatie gebaseerd is op onderzoek in het kader van overdracht van wildtype HIV door macrofaagachtige cellen. Verschillende van de virale accessoire eiwitten zijn betrokken bij processen die de stabiliteit van de HIV-virusdeeltjes bevorderen, zoals bijvoorbeeld het remmen van de antivirale respons en het tegengaan van apoptose van de macrofaag.^{5,9} Replicatie-deficiënte lentivirale vectordeeltjes van de 2^e en 3^e generatie zijn echter biologisch ingeperkt, en deze virale genen zijn uit het vectorgenoom verwijderd. Het is derhalve niet zeker of lentivirale vectordeeltjes op eenzelfde manier kunnen persisteren in macrofagen.

Virusdeeltjes kunnen ook langere tijd als immuuncomplex in of op bepaalde immuuncellen aanwezig blijven. Folliculaire dendritische cellen (FDC's) hebben de unieke eigenschap om antigenen langere tijd intact te houden. Hierbij kunnen antilichaam-virus complexen aan het celmembraan gebonden blijven. Immuuncomplexen kunnen in FDC's ook geïnternaliseerd worden in compartimenten (endosomen), waarin geen degradatie plaatsvindt en waarbij deze complexen opnieuw aan het oppervlakte van de FDC gepresenteerd kunnen worden ('recycling').^{10,11,12} Voor de vorming van de antilichaam-HIV complexen zijn specifieke antilichamen, die binden aan het virus, noodzakelijk.¹³ Het FDC-gebonden virus kan later andere cellen infecteren, bijvoorbeeld in een co-cultuur. Hierbij

wordt het virus waarschijnlijk overgedragen aan de andere cel; ook wanneer HIV gebonden is aan neutraliserende antilichamen.¹⁴ Ook bij dit proces is er geen sprake van vrijkomend virus. FDC-gebonden HIV-virusdeeltjes zijn veel stabielier dan vrije virusdeeltjes (> 25 dagen *in vitro*; > 9 maanden *in vivo*).^{15,16}

De COGEM acht het niet uitgesloten, dat zowel na transductie van macrofaagachtige cellen als van FDC's, lentivirale (en retrovirale) vectordeeltjes intact aanwezig kunnen blijven in de cellen of gebonden als antilichaam-virus-complexen op de plasmamembraan. Het is niet aan te geven gedurende welke periode de vectordeeltjes intact blijven. In beide gevallen kunnen de deeltjes op een later moment worden overgedragen aan andere cellen, maar komen ze tijdens de overdracht of anderszins niet vrij in het kweekmedium.

Laboratoriummedewerkers kunnen tijdens celkweek blootgesteld worden aan vectordeeltjes via het kweekmedium of door blootstelling aan cellen met geïnternaliseerde vectordeeltjes. Omdat bij reguliere celkweekhandelingen geen scherpe voorwerpen gebruikt worden en omdat lichaamsvreemde cellen in het lichaam door het immuunsysteem worden afgebroken, acht de COGEM de kans op blootstelling via snij- en prikincidenten verwaarloosbaar klein. Voor vrije vectordeeltjes in het kweekmedium die na de transductie van de macrofaagachtige cellen of FDC's zijn achtergebleven, geldt dat deze tijdens het kweken van de gg-cellen door (inactiverende) wasstappen en natuurlijk verval zullen afnemen. Dit zal op een vergelijkbare manier plaatsvinden als beschreven bij 'gewone' cellen.¹ De COGEM signaleert derhalve dat vanuit ARBO-overwegingen ook bij transductiewerkzaamheden met macrofaagachtige cellen en FDC's een veiligheidstermijn van 7 dagen gehanteerd kan worden, waarna het aantal vrije (extracellulaire) infectieuze vectordeeltjes na transductie verwaarloosbaar klein zal zijn.

3. Huisvesting van proefdieren in associatie met lentiviraal getransduceerde macrofaagachtige cellen

Muizen en andere proefdieren in associatie met lentiviraal getransduceerde cellen die van ML-I afkomstig zijn, worden conform de Regeling ggo standaard op DM-I ingeschaald. Via een 2.8-verzoek kunnen aanvragers inschaling op D-I aanvragen voor de huisvesting van de dieren op basis van de afwezigheid van vrije (infectieuze) lentivirale vectordeeltjes. Gezien de te hanteren voorwaarden voor inschaling van dieren in associatie met lentiviraal getransduceerde macrofaagachtige cellen op D-I in plaats van DM-I heeft Bureau GGO de volgende vraag gesteld:

“Is de COGEM van mening dat voor proefdieren in associatie met van ML-I afkomstige macrofaagachtige cellen die mogelijk nog (geïnternaliseerde) lentivirale vectordeeltjes bevatten een veiligheidsperiode gehanteerd kan worden voor omlaagschaling van DM-I naar D-I? Zo ja, welke periode kan hiertoe worden gehanteerd? Graag een uiteenzetting.

NBI: Op DM-I en ML-I zijn (in tegenstelling tot D-I) standaard voorschriften voor de inactivatie van biologisch afval toepassing.

NB2: De COGEM heeft eerder geadviseerd (CGM/090331-03) dat terugplaatsing van ex-vivo getransduceerde proefdieren (getransduceerd met een derde generatie lentiviraal SIN systeem) van DM-II naar D-I kan plaatsvinden indien het transplantaat vrij is van vrije lentivirale deeltjes. Bij in vivo transductie van proefdieren adviseerde de COGEM een veiligheidsperiode van minimaal 14 dagen na transductie, indien op de dag van de terugplaatsing naar D-I niveau er op basis van de halfwaardetijd van de lentivirale vector geen infectieuze partikels meer in de proefdieren aanwezig zijn.”

Antwoord:

Bij *ex vivo* lentivirale transductie van dieren worden cellen buiten het lichaam getransduceerd met lentivirale vectoren, en worden de getransduceerde cellen vervolgens teruggeplaatst in het dier. Om de huisvesting van de proefdieren te wijzigen van inperkingsniveau DM-I naar D-I, speelt de aan- of afwezigheid van vrije (infectieuze) vectordeeltjes een rol.

Zoals bij de beantwoording van de eerste vraag is aangegeven, zal overdracht van vectordeeltjes vanuit macrofaagachtige cellen of FDC's alleen via direct contact tussen cellen plaatsvinden. Hierdoor bestaat de mogelijkheid dat geïnternaliseerde vectordeeltjes omliggende cellen in het proefdier transduceren, maar de vectordeeltjes zullen hierbij niet vrijkomen in het bloed of de excreta van de dieren. De COGEM is derhalve van oordeel dat voor het gebruik van getransduceerde macrofaagachtige cellen of FDC's waarin mogelijk geïnternaliseerde vectordeeltjes aanwezig zijn, geen veiligheidsperiode gehanteerd dient te worden voor het wijzigen van het inperkingsniveau van DM-I naar D-I, wanneer het transplantaat vrij is van vrije (extracellulaire) lentivirale deeltjes.

Bij invasieve handelingen bestaat de mogelijkheid dat de medewerker blootgesteld kan worden aan de getransplanteerde macrofaagachtige cellen of FDC's, bijvoorbeeld door snij- of prikincidenten of via wondjes. De COGEM signaleert daarom vanuit ARBO-overwegingen bij invasieve handelingen met *ex vivo* getransduceerde macrofaagachtige cellen en FDC's in proefdieren passende maatregelen, zoals handschoenen, te dragen.

Omdat de lentivirale vectordeeltjes niet zullen worden uitgescheiden in de excreta van de proefdieren, is er geen reden om het afval van deze dieren apart te verwerken. De dieren zelf vallen echter onder de reikwijdte van Regeling ggo vanwege de aanwezigheid van gg-cellen.

4. Conclusie

Samenvattend signaleert de COGEM dat vanuit ARBO-overwegingen ook bij transductiewerkzaamheden met macrofaagachtige cellen en FDC's een veiligheidstermijn van 7 dagen gehanteerd kan worden, waarna het aantal vrije (extracellulaire) infectieuze vectordeeltjes na transductie verwaarloosbaar klein zal zijn. Tevens acht zij het niet noodzakelijk een veiligheidsperiode te hanteren voor het wijzigen van inperkingsniveau DM-I naar D-I bij werkzaamheden met getransduceerde macrofagen in proefdieren. Zij signaleert echter vanuit ARBO-overwegingen dat bij invasieve handelingen met de proefdieren waarin deze cellen zijn getransplanteerd, passende beschermende maatregelen in acht genomen moeten worden.

Referenties

1. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM advies CGM/210218-01
2. COGEM (2021). Vervolgadvies Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes. COGEM advies CGM/210503-01
3. COGEM (2009). Handelingen met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
4. Geijtenbeek TBH *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597
5. Nikitina E *et al.* (2018). Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2821
6. Perez-Zsolt D *et al.* (2021). HIV-1 trans-infection mediated by DCs: the tip of the iceberg of cell-to-cell viral transmission. *Pathogens*. 11: 39. doi: 10.3390/pathogens11010039
7. Perez-Zsolt D *et al.* (2021). SARS-CoV-2 Interaction with Siglec-1 mediates trans-infection by dendritic cells. *Cell Mol. Immunol.* 18: 2676-2678
8. Hendricks CM *et al.* (2021). The interplay of HIV-1 and macrophages in viral persistence. *Front Microbiol.* 12: 646447
9. Machado Andrade V & Stevenson M (2019). Host and viral factors influencing interplay between the macrophage and HIV-1. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 14: 33-43
10. Keele BF *et al.* (2008). Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 82: 5548-5561
11. Heesters BA *et al.* (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 495-50
12. Heesters, BA *et al.* (2015). Follicular dendritic cells retain infectious HIV in cycling endosomes. *PLoS Pathog.* 11: e1005285.
13. Smith-Franklin BA *et al.* (2002). Follicular dendritic cells and the persistence of HIV infectivity: the role of antibodies and Fcγ receptors. *J. Immunol.* 168: 2408-2014
14. Heath, S *et al.* (1995). Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. *Nature* 377: 740-744
15. Smith BA *et al.* (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 690-696
16. Keele BF *et al.* (2008). Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 82: 5548-5561