

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer A.A. Aartsen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 19 augustus 2025
KENMERK CGM/250819-01
ONDERWERP Advies Toelichting op COGEM-formule voor vrije vectordeeltjes

Geachte heer Aartsen,

De zogenaamde COGEM-formule die gebruikt wordt om te bepalen of er extra veiligheidsmaatregelen nodig zijn bij onder meer gentherapiestudies, blijkt soms voor vergunningaanvragers lastig te hanteren. Dit advies biedt een update en nadere uitleg van de formule.

Samenvatting:

In biomedisch of klinisch onderzoek worden veelvuldig cellen genetisch aangepast met behulp van zogenaamde lenti- of retrovirale vectoren (genetisch gemodificeerde (gg-)virussen). Deze gg-virussen kunnen hun genoom integreren in het genoom van een cel en daarmee ook een gewenst gen inbouwen. Hoewel de genetisch gemodificeerde cellen na behandeling met de gg-vectoren vaak nog verschillende kweek- en wasstappen ondergaan, kunnen er soms nog 'vrije' (niet door de cel opgenomen) vectordeeltjes achterblijven. De aanwezigheid van deze vrije vectordeeltjes vormt een potentieel risico voor derden wanneer zij onbedoeld hieraan worden blootgesteld. Afhankelijk van hoeveel vrije vectordeeltjes aanwezig zijn, kunnen maatregelen nodig zijn om blootstelling aan deze deeltjes te voorkomen. Het aantal overgebleven lenti- of retrovirale vectordeeltjes na de kweek- en wasstappen kan experimenteel of theoretisch bepaald worden. Een experimentele benadering heeft de voorkeur, maar is niet altijd mogelijk. In dergelijke gevallen kan de 'COGEM-formule' worden toegepast.

De COGEM heeft opgemerkt dat de COGEM-formule niet altijd correct wordt toegepast. Ook blijkt voor sommige vergunningaanvragers onduidelijk hoe de uitkomst van de formule (de zogenaamde reductieratio) zich verhoudt tot het aantal vrije vectordeeltjes. Om het gebruik van de formule te verduidelijken, geeft de COGEM in dit advies een nadere uitleg over het gebruik van de COGEM-formule, en worden tevens de beperkingen van de formule geschetst.



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

Advies Toelichting op de COGEM-formule voor het berekenen van vrije lenti- of gammaretrovirale vectordeeltjes na ex vivo transductie

COGEM-advies CGM/250819-01

1. Achtergrondinformatie

In het biomedisch en klinisch onderzoek wordt veelvuldig gebruik gemaakt van replicatie-deficiënte virale vectoren afgeleid van lentivirussen (voornamelijk Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) en gammaretrovirussen (voornamelijk Moloney murine leukemia virus, MoMuLV) voor genetische modificatie van cellen. Deze lenti- of gammaretrovirale vectoren integreren hun vectorgenoom in het genoom van de gastheercel. Na de transductie ondergaan de genetisch gemodificeerde (gg-)cellen vaak diverse kweek- en wasstappen, met mede als doel de overmaat aan zogenaamde 'vrije' (niet in de cel geïnternaliseerde) vectordeeltjes te verwijderen. Aan de blootstelling van derden aan deze overgebleven vectordeeltjes zijn verschillende risico's verbonden. Wanneer integratie van het vectorgenoom optreedt in cellen van de onbedoelde ontvanger, kunnen tumorsuppressorgenen worden verstoord, of proto-oncogenen worden geactiveerd, waardoor kanker kan ontstaan (oncogenese). Ook kunnen mogelijk ongewenste effecten optreden door expressie van het gebruikte transgen.

In laboratoria (onder Ingeperkt Gebruik) kan blootstelling aan vrije vectordeeltjes bij werkzaamheden plaatsvinden bij laboratoriummedewerkers. Wanneer medewerkers onbedoeld geïnfecteerd raken met vrije vectordeeltjes is verdere verspreiding naar derden niet mogelijk, omdat de genetische informatie die essentieel is voor replicatie, ontbreekt in deze vectoren. De COGEM heeft vanuit Arbo-overwegingen eerder gesignaleerd aanvullende inperkingsmaatregelen te hanteren wanneer de kans op blootstelling aan vrije vectordeeltjes hoog is.¹

Bij klinische gentherapiestudies wordt veel gebruik gemaakt van replicatie-deficiënte lenti- of gammaretrovirale vectoren voor het produceren van gg-cellen (zoals CAR T-cellen). Hiervoor worden cellen (meestal bloed(stam)cellen) van een patiënt of donor afgenomen en buiten het lichaam genetisch gemodificeerd. Ook hier kunnen na de transductie, ondanks het uitvoeren van was- of kweekstappen, vrije vectordeeltjes achterblijven in de suspensie met gg-cellen. Wanneer vrije infectieuze vectordeeltjes in het medisch product aanwezig zijn, kunnen deze in het geval van incidenten (bijvoorbeeld bloed-bloed contact met de patiënt) verspreid worden naar derden, zoals familieleden of omstanders. Bij blootstelling van derden aan de vectordeeltjes zou onbedoelde transductie op kunnen treden met potentiële gezondheidsrisico's tot gevolg. Afhankelijk van hoeveel infectieuze vectordeeltjes er na de kweek- en wasstappen resteren in het medische product (de gg-cellen), zijn mogelijk aanvullende maatregelen nodig om de kans op overdracht van vrije vectordeeltjes van de patiënt naar derden tot een minimum te beperken.

Het heeft de voorkeur om experimenteel te bepalen hoeveel vrije vectordeeltjes nog aanwezig zijn na de kweek- en wasstappen, maar indien dit niet mogelijk is, kan de COGEM-formule uitkomst bieden.^{2,3} De COGEM-formule biedt een zo goed mogelijke benadering van de hoeveelheid overgebleven lenti- of gammaretrovirale vectordeeltjes. De formule is initieel ontwikkeld voor de risicobeoordeling van

laboratoriumwerkzaamheden met replicatie-deficiënte lentivirale vectoren gepseudotypeerd met het glycoproteïne van vesicular stomatitis virus (VSV-G), waarbij voornamelijk met hechtende cellen wordt gewerkt.² De formule wordt echter thans ook toegepast bij het beoordelen van aanvragen voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen.^{4,5,6,7} De COGEM-formule is in 2020 aangepast nadat in opdracht van de COGEM verschillende parameters uit de formule experimenteel zijn gevalideerd.^{3,8}

De COGEM heeft in de afgelopen jaren over een groot aantal klinische studies met *ex vivo* lenti- of retroviraal getransduceerde cellen geadviseerd. In een aantal gevallen is gebleken dat de COGEM-formule niet correct is toegepast, waardoor niet vastgesteld kon worden hoeveel vrije vectordeeltjes mogelijk nog aanwezig waren. Ook blijkt voor sommige vergunningaanvragers niet direct duidelijk hoe de berekende reductieratio zich verhoudt tot het aantal resterende vectordeeltjes. In dit advies wordt daarom een nadere toelichting gegeven op het gebruik van de COGEM-formule, waarin tevens de laatste aanpassingen^{3,9,10} aan de formule zijn verwerkt.

2. Uitleg over de COGEM-formule

De uitkomst van de COGEM-formule is weergegeven als de reductieratio. De reductieratio wordt bepaald door een aantal parameters, namelijk het natuurlijke verval van de vectordeeltjes (de halfwaardetijd), de inactivatie (verlies aan infectiviteit van de vectordeeltjes) door aanwezigheid van trypsine, en het verlies aan deeltjes door het wassen van de gekweekte cellen.

In de formule wordt geen rekening gehouden met de afname van vrije vectordeeltjes door de opname in cellen (de feitelijke transductie), omdat dit sterk afhankelijk is van de experimentele condities en transductie-efficiëntie van de gebruikte cellen.

De COGEM-formule en uitleg over de gebruikte variabelen en eenheden volgt hieronder:

$$Reductieratio = \frac{wash^W \times (wash \times trypt)^I \times 2^{(F \times T)}}{N_i}$$

wash: Deze variabele geeft het reducerende effect van de wasstappen weer. Omdat de formule is opgesteld voor werkzaamheden met lentivirale vectoren in het laboratorium, wordt uitgegaan van het wassen van hechtende cellen in kweekschaltes. De waarde van deze variabele is onder andere afhankelijk van de grootte van de gebruikte kweekschaltes. Bij het wassen van een kweekschaal met een diameter van 10 cm (waar 10 ml medium aan toegevoegd wordt) kan de experimenteel bepaalde constante waarde '20' gehanteerd worden, overeenkomstig met een afname van het volume van het medium (en daarmee aanwezige vectordeeltjes) van 95%.³ Wanneer het een 35 mm kweekschaal betreft (waar 3 ml medium aan toegevoegd wordt), kan de experimenteel bepaalde constante waarde 50 gehanteerd worden.³ Afhankelijk van de gebruikte kweekschalen komt de formule er als volgt uit te zien:

- Kweekschaal met een diameter van 10 cm: $Reductieratio = \frac{20^W \times (20 \times trypt)^I \times 2^{(F \times T)}}{N_i}$
- Kweekschaal met een diameter van 35 mm: $Reductieratio = \frac{50^W \times (50 \times trypt)^I \times 2^{(F \times T)}}{N_i}$

Bij het gebruik van een ander formaat kweekschaal, een andere methode om cellen te wassen, een suspensie van cellen in plaats van hechtende cellen, of een ander kweekstelsel dan kweekschalen, kan een andere factor gebruikt worden wanneer hier experimentele gegevens over beschikbaar zijn, of als deze goed beredeneerd is.

W: Het aantal uitgevoerde wasstappen.

tryp^a: Trypsine is een proteolytisch enzym dat veel wordt gebruikt voor het losmaken van hechtende cellen in celculturen. Het kan echter ook envelopeiwitten van lentivirale deeltjes klieven, waardoor de vectordeeltjes geïnactiveerd worden. Een wasstap met trypsin is als additionele inactivatiefactor in de formule opgenomen.^b Uit het eerder genoemde onderzoek is gebleken dat deze waarde sterk afhankelijk is van het gebruikte pseudotyperingseiwit. Voor lentivirale vectoren die zijn gepseudotyperd met verschillende envelopeiwitten, zijn in het onderzoek de onderstaande waarden bepaald.³ Deze waarden wijken mogelijk af voor gepseudotyperde retrovirale vectoren.

Reductiefactor bij inactivatie door trypsin van gepseudotyperde lentivirale vectoren (tryp)							
VSV-G	Measles	GALV	Rabies	RD114	4070A	10A1	MULV
1	4	79	2	110	4	1	10

VSV-G: glycoproteïne van het vesicular stomatitis virus, Measles: glycoproteïne van het mazelenvirus, GALV: glycoproteïne van het Gibbon ape leukemia virus, Rabies: glycoproteïne van het rabiesvirus, RD114: glycoproteïne van het feline endogenous RD114 retrovirus, 4070A: glycoproteïne van het Moloney MULV 4070A retrovirus, 10A1: glycoproteïne van de Moloney MULV virusstam 10A1, MULV: glycoproteïne van het murine leukemia virus.

I: Het aantal inactiverende wasstappen met trypsin.

F: Het natuurlijke verval van de vectordeeltjes. Deze F-waarde wordt berekend door 24 uur (een etmaal) te delen door de halfwaardetijd (in uren) van het vectordeeltje. Deze waarde is sterk afhankelijk van het gebruikte pseudotyperingseiwit. Voor lentivirale vectoren gepseudotyperd met verschillende envelopeiwitten zijn experimenteel de volgende waarden bepaald.³

Reductiefactor (F) op basis van de halfwaardetijd van gepseudotyperde lentivirale vectoren								
Pseudotyperingseiwit	VSV-G	Measles	GALV	Rabies	RD114	4070A	10A1	MULV
F-waarde	0,7	1,7	2,9	1,6	1,1	0,7	1,7	1,3
Halfwaardetijd (in uren)	34,7	14,1	8,3	15,4	21,2	36,6	13,8	18,6

VSV-G: glycoproteïne van het vesicular stomatitis virus, Measles: glycoproteïne van het mazelenvirus, GALV: glycoproteïne van het Gibbon ape leukemia virus, Rabies: glycoproteïne van het rabiesvirus, RD114: glycoproteïne van het feline endogenous RD114 retrovirus, 4070A: glycoproteïne van het Moloney MULV 4070A retrovirus, 10A1: glycoproteïne van de Moloney MULV virusstam 10A1, MULV: glycoproteïne van het murine leukemia virus.

-
- a. Oorspronkelijk werd in de formule ook inactivatie door humaan complement als inactivatiefactor opgenomen. Uit het onderzoeksrapport is echter gebleken dat de effectiviteit van complement-inactivatie van teveel variabelen afhankelijk is om als constante factor in de formule op te nemen.³
- b. Oorspronkelijk werd in de formule een reductiefactor van 10 aangehouden. Gecombineerd met een wasstap in een kweekschaal van 10 cm resulteerde dit in de waarde 20 (wash) x 10 (trypsin) = 200 in de oorspronkelijke formule.²

Deze waarden wijken mogelijk af voor gepseudotypeerde retrovirale vectoren. In de literatuur zijn voor gammaretrovirale vectoren, afhankelijk van de pseudotypering en experimentele condities, verschillende halfwaardetijden gerapporteerd.^{6, 11, 12, 13, 14, 15, 16}

T: De kweektijd in dagen (etmalen) na transductie.

N_i: Het oorspronkelijke aantal infectieuze vectordeeltjes in het inoculum (in eerdere adviezen werd dit weergegeven als C_i). In het geval er gegevens bekend zijn over het de reductie van het aantal deeltjes door de transductie, kan dit verrekend worden met het inoculum in de formule.

3. Relatie tot het aantal vrije vectordeeltjes

Bij de COGEM is gebleken dat er soms verwarring bestaat over de verhouding tussen de uitkomst van de COGEM-formule (de reductieratio) en het aantal aanwezige vrije infectieuze vectordeeltjes. Mogelijk leidt de term reductieratio tot deze verwarring. Het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes is gelijk aan 1/reductieratio. Oftewel, door in de COGEM-formule de teller en de noemer om te draaien, kan direct het aantal vrije vectordeeltjes berekend worden:

$$\text{Aantal vrije vectordeeltjes} = \frac{N_i}{\text{wash}^W \times (\text{wash} \times \text{tryp})^I \times 2^{(F \times T)}}$$

Voor klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen heeft de COGEM een bepaalde grenswaarde aan vectordeeltjes geadviseerd. Deze grenswaarde is recent bijgesteld op 500 vrije vectordeeltjes (gelijk aan een reductieratio van 0,002),¹⁰ en wordt gebruikt om te bepalen of er aanvullende maatregelen nodig zijn om de kans op verspreiding van lenti- en retrovirale vectordeeltjes tot een minimum te beperken. Indien de grenswaarde van 500 vrije deeltjes overschreden wordt, dienen de volgende generieke beheersmaatregelen gehanteerd te worden:

- Na toediening van het medisch product wordt de infuusinsteekplaats met een adequate methode gedesinfecteerd om resterende cellen en vectordeeltjes te inactiveren.
- Na toediening van het medisch product (*ex vivo* getransduceerde gg-cellen) blijft de patiënt minimaal 16 uur in het ziekenhuis opgenomen, zodat de geëigende ziekenhuishygiënische maatregelen in acht genomen kunnen worden. Patiënt, medisch personeel en bezoekers worden voorgelicht hoe gedurende deze periode met wondverzorging en besmet materiaal moet worden omgegaan. Indien de aanvrager aannemelijk maakt dat de vectordeeltjes eerder dan 16 uur voldoende uit het lichaam van de patiënt geklaard zijn, kan de periode navenant worden bekort.

4. Beperkingen van de formule

De COGEM-formule geeft een zo goed mogelijke benadering van de hoeveelheid residuele vectordeeltjes. Hierbij moet opgemerkt worden dat de gebruikte parameters afhankelijk zijn van de

c. Gerapporteerde halfwaardetijden voor gepseudotypeerde retrovirale (MoMuLV-)vectoren bij 37°C zijn onder andere: VSV-G: 4,5 ± 1 uur¹¹, 4070A: 4-14 uur^{13,15}, GALV: 10-13 uur^{13,15}, 10A1: 14 uur¹³, RD114: 6- >24 uur^{13,15}. Hierbij dient opgemerkt te worden dat deze waarden gelden voor de specifieke condities waaronder de experimenten gedaan zijn. Deze kunnen afwijken van de condities die voor de betreffende vergunningaanvraag gebruikt zijn.

specifieke experimentele condities, waardoor het daadwerkelijke aantal vrije vectordeeltjes kan afwijken.

De formule is oorspronkelijk bedoeld voor culturen met hechtende cellen, en daarnaast zijn de halfwaardetijd en mate van inactivatie door trypsine alleen voor gepseudotypeerde lentivirale vectoren bepaald. Een experimentele vaststelling van het aantal vrije infectieuze lenti- of retrovirale vectordeeltjes heeft daarom de voorkeur boven toepassing van de COGEM-formule.

Indien dit niet mogelijk is, biedt de COGEM-formule – ondanks haar mogelijke beperkingen – de beste benadering van het aantal aanwezige vrije vectordeeltjes. Experimentele bevestiging van de waarden van de parameters in de formule voor de specifieke condities van het uit te voeren experiment of klinische studie helpt daarbij om tot een betere inschatting te komen van het aantal aanwezige vectordeeltjes.

Referenties

1. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM-advies CGM/210218-01
2. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM-advies CGM/090331-03
3. Dautzenberg IJC & Hoebe RC (2020). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles. COGEM-rapport CGM 2020-01
4. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met ex vivo retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM-advies CGM/190729-01
5. European Commission. Advanced therapies. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/advanced-therapies_en (bezocht: 21 juli 2025)
6. Loket Gentherapie (RIVM). Aanvraagformulier Retro/lentivirale vectoren zonder deeltjes – VoV. <https://www.loketgentherapie.nl/aanvraagformulier-retrovirale-vectoren-vov> (bezocht: 21 juli 2025)
7. Loket Gentherapie (RIVM). Aanvraagformulier Lentivirale vectoren en SIN virale partikels - VoV https://www.loketgentherapie.nl/aanvraagformulier-cellen_LLIV-SIN_met_deeltjes-vov (bezocht: 21 juli 2025)
8. Dautzenberg IJC *et al.* (2020). The stability of envelope-pseudotyped lentiviral vectors. *Gene Ther.* 28: 89-104
9. 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
10. COGEM (2025). Advies Heroverweging grenswaarde aanwezige vrije lenti- en retrovirale vectordeeltjes bij klinische studies met ex vivo getransduceerde cellen. COGEM-advies CGM/250520-01
11. Higashikawa F & Chang L (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* 280: 124-131
12. Andreadis ST *et al.* (1997). Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J. Virol.* 71: 7541-7548
13. Uckert W *et al.* (2000). Efficient gene transfer into primary human CD8⁺ T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype. *Hum. Gene Ther.* 11: 1005-1014
14. Ghani K *et al.* (2007). Generation of a high-titer packaging cell line for the production of retroviral vectors in suspension and serum-free media. *Gene Ther.* 14: 1705-1711
15. Ghani, K *et al.* (2009). Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum. Gene Ther.* 20: 966-974
16. Carmo M *et al.* (2009). Stabilization of gammaretroviral and lentiviral vectors: from production to gene transfer. *J. Gene Med.* 11: 670-678