

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

**DATUM** 18 september 2020  
**KENMERK** CGM/200918-01  
**ONDERWERP** Advies omlaagschaling van grootschalige productie van gg-cellen in SUBs

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag IG 20-162\_2.8-000 getiteld 'Kweek van CHO cellen voor productie op grote schaal van een bi-specifiek antilichaam dat bindt aan KLK2 en CD3. Productnaam: KLK2xCD3' van Janssen Biologics B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van grootschalige productie van monoklonale antilichamen met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) dierlijke cellen (C4113A) in een bioreactor voor eenmalig gebruik. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op MI-I inperkingsniveau uit te voeren.

MI-I is bedoeld voor grootschalige productie van ggo's, waarbij de ggo's veilig worden beschouwd en niet geïnactiveerd hoeven te worden voorafgaand aan lozing. De door de aanvrager gekweekte cellijn C4113A is afgeleid van een gg-cellijn die verkregen is door transfectie met een gg-AAV vector.

Zowel de te gebruiken cellen (C4113A) als de gastheercellijn zijn apathogeen, kunnen alleen onder laboratoriumcondities gekweekt worden, en kunnen buiten de bioreactor niet overleven. Gezien het bovenstaande kan de COGEM instemmen met een omlaagschaling van de werkzaamheden van MI-III naar MI-I inperkingsniveau en acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

***Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies***

# Omlaagschaling van grootschalige productiewerkzaamheden met gg-CHO cellen in een Single Use Bioreactor (SUB)

## COGEM advies CGM/200918-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van Janssen Biologics B.V. (IG 20-162) voor de grootschalige productie van monoklonale antilichamen met behulp van genetisch gemodificeerde (gg-) 'Chinese hamster ovary' (CHO)-cellen in een kunststof bioreactor voor eenmalig gebruik, de zogenaamde 'Single-Use bioreactor' (SUB). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op MI-I inperkingsniveau. MI-I is bedoeld voor grootschalige productie van ggo's, waarbij de ggo's veilig worden beschouwd en niet geïnactiveerd hoeven te worden voorafgaand aan lozing. Voor omlaagschaling naar inperkingsniveau MI-I dient het ggo te voldoen aan de criteria zoals genoemd in bijlage 6.2 in de Regeling ggo.<sup>1</sup>

### 2. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om met de gg-CHO cellijn C4113A in een SUB grootschalig bi-specifieke monoklonale antilichamen te produceren gericht tegen CD3 en KLK2, met productnaam KLKxCD3. Om cellijn C4113A te produceren wordt gebruik gemaakt van de commercieel verkrijgbare CHO-cellijn HD-BIOP3 K1 GS-/-.<sup>2</sup>

#### 2.1 Gastheercellijn HD-BIOP3 K1 GS-/-

Deze cellijn is verkregen door transfectie van een CHO-cellijn met een gg-AAV vector. Deze gg-AAV vector is geproduceerd in HEK293 cellen door co-transfectie van een E2A, E4 en VA RNA helper plasmide, een *rep/cap* helper plasmide, en een transferplasmide. De hiermee geproduceerde gg-AAV vector mist de *rep* en *cap* genen, die zijn vervangen door twee allelen van het hamster glutamine synthetase (GS) gen die gescheiden zijn door een neomycine resistentiegen ( $\text{Neo}^r$ ). De expressiecassette met GS sequenties wordt door homologe recombinatie geïntegreerd in het genoom van de cellijn na transfectie. Hiermee wordt een deletie aangebracht in het GS gen (exon 6), waardoor deze cellijn GS-deficiënt is en niet gekweekt kan worden in een medium zonder glutamine. Omdat het  $\text{Neo}^r$  geflankeerd is door loxP sequenties, is na transductie met gg-AAV ook transfectie met een CRE recombinase enzym toegepast om het  $\text{Neo}^r$  gen te verwijderen uit de uiteindelijke CHO-cellijn HD-BIOP3 K1 GS-/-. Deze gastheercellijn is eerder door Bureau GGO vergund op MI-II niveau, nadat de aanvrager gegevens heeft aangeleverd over de afwezigheid van replicatiecompetent (rc)-AAV, en *rep* of *cap* sequenties in deze cellen.

#### 2.2. CHO cellijn C4113A

Om cellijn C4113A te creëren is gebruik gemaakt van drie vectoren (PBD000108366, PBD000108367 en PBD000108365) die coderen voor twee typen 'heavy chains' (KLK2 en CD3) en een 'light chain' om het bi-specifieke antilichaam KLK2xCD3 te produceren. Deze drie vectoren zijn volledig gekarakteriseerd door middel van sequencing. In deze vectoren is een kanamycine resistentiegen ( $\text{KanR}$ )

aanwezig, dat alleen gebruikt wordt voor selectie van microbiële klonen en niet in de C4113A cellen aanwezig blijft. Daarnaast mist het KanR gen de benodigde expressie-elementen (zoals een eukaryote promotor), waardoor het gen niet functioneel is in zoogdiercellen.

Voor de productie van de cellijn C4113A wordt gebruik gemaakt van 'leap-in-transposase technologie' om het expressieconstruct van de 3 vectoren in het genoom van de cellijn HD-BIOP3 K1 GS-/- te integreren. Door aanwezigheid van synthetische transposon-sequenties in de PBD000108366, PBD000108367 en PBD000108365 vectoren kan met gelijktijdige transfectie van transposase mRNA tijdens het kloneren, integratie plaatsvinden van de donorsequenties in het gastheergenoom van de HD-BIOP3 K1 GS-/- cellen. De hierdoor ontstane cellijn met geïntegreerde sequenties van de monoklonale antilichamen wordt C4113A genoemd. Deze stap wordt maanden voorafgaand aan de uiteindelijke celbankproductie uitgevoerd. Gezien de korte halfwaardetijd van het transposase mRNA (2-20 uur in zoogdiercellen), stelt de aanvrager dat het vector DNA tijdens de productie niet meer gemobiliseerd kan worden in de C4113A cellen.

### 3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden verschillende keren geadviseerd over grootschalige producties in SUBs op MI-III inperkingsniveau, e.g.,<sup>3,4,5,6</sup> en op MI-I.<sup>7,8</sup> In 2011 heeft zij positief geadviseerd over de inschaling van grootschalige productie van monoklonale antilichamen door gg-CHO cellen (getransfecteerd met een plasmide) op MI-I door dezelfde aanvrager.<sup>8</sup>

Cellijn C4113A is afgeleid van HD-BIOP3 K1 GS-/- cellen, die verkregen zijn door transfectie met AAV. AAV is door de COGEM ingedeeld als niet ziekteverwekkend in pathogeniteitsklasse 1.<sup>9</sup> Tevens heeft de COGEM een advies met een generieke milieुरisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren uitgebracht.<sup>10</sup>

### 4. Overweging en advies

De COGEM is om advies gevraagd over de mogelijkheid tot omlaagschaling van de productiewerkzaamheden zoals voorgesteld door de aanvrager, aangezien de aangevraagde gastheercellijn HD-BIOP3 K1 GS-/- ontwikkeld is met behulp van een virale vector, en omdat deze cellijn verder gemodificeerd is met een transposase systeem (resultierend in cellijn C4113A).

Gastheercellijn HD-BIOP3 K1 GS-/- is verkregen met een gg-AAV-vector. De aanvrager heeft in een eerdere vergunningaanvraag en in de onderhavige aanvraag informatie aangeleverd over het testen op aanwezigheid van replicatiecompetent (rc)AAV<sup>a</sup> en mogelijke aanwezigheid van *rep* of *cap* sequenties in de cellijn. Over eventuele episomaal aanwezige AAV sequenties heeft de aanvrager aangegeven dat deze in de loop der tijd verdund worden bij celkweek. De HD-BIOP3 K1 GS-/- master cel bank is getest met een 2-delige assay (detectielimiet: 10 IU rcAAV), waarbij 3 amplificatierondes in HEK293 cellen uitgevoerd werden om aanwezigheid van rcAAV uit te sluiten, gevolgd door een detectiestap op basis

---

<sup>a</sup> De term 'replicatiecompetent' AAV wordt gebruikt om aan te geven dat het gelijk is aan wildtype AAV. In feite kan AAV echter niet repliceren in afwezigheid van een helpervirus.

van PCR. Ook zijn met 'Targeted Locus Amplification sequencing' geen *rep* of *cap* sequenties gevonden. Volgens de aanvrager zijn er geen rcAAVs of *rep/cap* sequenties aangetoond in de HD-BIOP3 K1 GS-/-.

De COGEM is van oordeel dat op basis van de uitgevoerde testen de kans op aanwezigheid van rcAAV of *rep/cap* sequenties in HD-BIOP3 K1 GS-/- verwaarloosbaar klein is. Hierbij merkt zij op dat wildtype AAV apathogeen is en niet kan repliceren zonder aanwezigheid van een helpervirus. Eventuele aanwezigheid van rcAAV gedurende grootschalige productie en in afval dat zonder inactivatie geloosd mag worden, vormt een verwaarloosbaar risico omdat rcAAV afgeleid is van een apathogeen virus, niet kan repliceren (zelfs in aanwezigheid van helpervirus) en geen schadelijke sequenties bevat. Daarnaast worden de HD-BIOP3 K1 GS-/- cellen al lange tijd gebruikt voor industriële toepassingen. De COGEM acht HD-BIOP3 K1 GS-/- even veilig als wildtype CHO cellen.

Wat de CHO cellijn C4113A betreft, is de COGEM van oordeel dat het vectorgenoom stabiel geïntegreerd is in deze cellijn door toepassing van de leap-in transposase technologie, en de kans op mobilisatie van het vector DNA tijdens de productie van de monoklonale antilichamen verwaarloosbaar klein is. Daarnaast bevat cellijn C4113A geen schadelijke sequenties, en kunnen deze cellen buiten de reactor niet overleven. Daarmee acht de COGEM cellijn C4113A veilig voor werkzaamheden op MI-I niveau.

Gezien de aard van cellijnen HD-BIOP3 K1 GS-/- en C4113A kan de COGEM instemmen met een omlaagschaling van inperkingsniveau MI-III naar MI-I, en is zij van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau MI-I verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.  
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072> (bezoekt: 7 september 2020)
2. Horizon Discovery. CHOSOURCE™ - CHO-GS knockout expression platform  
<https://horizondiscovery.com/en/navigation/chosource>
3. COGEM (2010). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-Use bioreactor. COGEM advies CGM/101028-03
4. COGEM (2011). Eiwitproductie in een Single-Use Bioreactor met behulp van baculovirusexpressie-systeem. COGEM advies CGM/111128-02
5. COGEM (2015). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in de 'Single-Use Bioreactor Sartorius STR'. COGEM advies CGM/150907-01
6. COGEM (2016). Grootschalige productie van genetisch gemodificeerde adenovirale vectoren in een 'Single-Use Bioreactor'. COGEM advies CGM/160607-02
7. COGEM (2011). Grootschalige productie van monoklonale antilichamen met behulp van PER.C6 cellen in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110503-01
8. COGEM 2011. Commerciële productie van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single Use Bioreactor onder MI-I condities. COGEM advies CGM/110110-02

9. COGEM (2018). *Adeno-associated dependoparvovirus A* en *Adeno-associated dependoparvovirus B* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. COGEM advies CGM/180321-01
10. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met AAV-vectoren. COGEM advies CGM/190905-01