

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

DATUM 05 april 2023
KENMERK CGM/230405-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden retroviraal getransduceerde cellen

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 23-001_2.8-000 getiteld 'Inschalingsverzoek GGO op niveau ML-I', afkomstig van Byondis B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met drie genetisch gemodificeerde (gg-) humane cellijnen, die geproduceerd zijn met behulp van een replicatie-deficiënte gammaretrovirale vector. De aanvrager verzoekt om met deze gg-cellijnen op ML-I celkweek en functionele assay's uit te mogen voeren. Omdat deze gg-cellijnen verkregen zijn met behulp van een gammaretrovirale vector, gelden enkele voorwaarden voor een omlaagschaling van de werkzaamheden. Zo mag er geen replicatie-competent retrovirus (RCR) aanwezig zijn geweest bij de productie van de gg-cellijnen en dienen de cellen gescreend te worden op aanwezigheid van gammaretrovirussen. De aanvrager heeft gegevens overlegd van verschillende testen die zijn uitgevoerd om te bevestigen dat aan deze voorwaarden wordt voldaan. De COGEM is gevraagd of deze testen voldoende uitsluitel geven om omlaagschaling naar ML-I te rechtvaardigen.

De humane oorsprong van de cellen is geverifieerd. Bij de productie is niet specifiek getest op afwezigheid van muizengammaretrovirussen, maar de gg-cellijnen worden getest op afwezigheid van RCR door middel van een 'cell marker rescue assay'. De COGEM is van oordeel dat de 'cell marker rescue assay' in principe geschikt is om RCR aan te tonen, maar merkt op dat in de aangeleverde gegevens een goede positieve controle ontbreekt. Omdat hierdoor geen uitspraak gedaan kan worden over de gevoeligheid van de RCR-test en eerdere validatiegegevens ontbreken, kan de COGEM vooralsnog niet instemmen met omlaagschaling naar ML-I. Pas wanneer validatiegegevens van de 'cell marker rescue test' aangeleverd worden, kan de COGEM ermee instemmen om de voorgenomen handelingen op ML-I uit te voeren.



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

Omlaagschaling van werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde humane cellen naar ML-I

COGEM advies CGM/230405-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met retroviraal getransduceerde humane cellijnen (IG 23-001). De aanvraag is afkomstig van Byondis B.V. De aanvrager heeft een drietal gg-cellijnen aangekocht (KILR Jurkat cell pool, Pathhunter Jurkat SIRPa en PathHunter U2OS TSHR B-arrestin) en verzoekt hiermee op ML-I celkweek en functionele assay's uit te voeren. Omdat deze cellijnen verkregen zijn door transductie met een gammaretrovirale vector, kan omlaagschaling alleen plaatsvinden wanneer voldaan wordt aan de voorwaarden voor omlaagschaling van getransduceerde humane cellen.¹ De aanvrager is van oordeel dat de gg-cellijnen voldoen aan deze voorwaarden.

2. (Endogene) gammaretrovirussen

De familie van de *Retroviridae* bestaat uit twee subfamilies en elf genera, waaronder het genus *Gammaretrovirus*.² Retrovirussen worden gekenmerkt door een enkelstrengs RNA-genoom dat door het virale 'reverse transcriptase' wordt omgezet naar dubbelstrengs DNA, dat in het genoom van de gastheer integreert (proviraal genoom). Het enkelstrengs RNA-genoom van retrovirussen is omgeven door capsid-eiwitten (gecodeerd door het *gag*-gen) en een lipidenmembraan waarin zich de envelopeiwitten bevinden die het gastheertropisme van het virus bepalen (gecodeerd door het *env*-gen). 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^a. Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het 'packaging' signaal Ψ in het RNA essentieel.

Het provirale genoom dat is geïntegreerd in het genoom van de gastheer, blijft hierin aanwezig zolang de gastheercel blijft bestaan.³ Vanuit het provirale genoom in de gastheercel kunnen nieuwe infectieuze virale deeltjes gevormd worden die op hun beurt nieuwe cellen infecteren (horizontale transmissie).^{3,4} Wanneer de integratie van het retrovirus plaatsvindt in het genoom van een kiemcel, zoals gameten of een embryo, kan de retrovirale sequentie doorgegeven worden aan het nageslacht (verticale transmissie).^{3,4} Een zodanig geïntegreerde retrovirale sequentie wordt een endogeen retrovirus (ERV) genoemd. Dit in tegenstelling tot verspreidende infectieuze replicatie-competente retrovirussen die als exogeen worden aangemerkt. ERVs zijn onderhevig aan selectiedruk waardoor zij in de loop der tijd kunnen verdwijnen uit de populatie ofwel geïnactiveerd worden door mutaties of epigenetische modificaties.⁵ In het genoom van hedendaagse gewervelde dieren worden ERVs aangetroffen, maar dit betreffen vaak 'overblijfselen' van infecties met verschillende retrovirussen gedurende de evolutie die miljoenen jaren geleden plaats hebben gevonden.⁶ De meerderheid van deze ERVs zijn geïnactiveerd

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

(door mutaties of epigenetische modificaties) en coderen niet voor functionele eiwitten.^{5,7} Zo zou 8 tot 10% van het menselijk genoom bestaan uit endogene retrovirale elementen (HERVs).⁴ In sommige diersoorten worden intacte (of vrijwel intacte) ERVs aangetroffen, waarin de meeste of zelfs alle retrovirale elementen aanwezig zijn. Of een ERV in staat is om nieuwe infectieuze exogene virussen te vormen lijkt afhankelijk te zijn van verschillende factoren. Intacte (of vrijwel intacte) ERVs kunnen bijvoorbeeld infectieuze exogene retrovirussen vormen bij blootstelling aan mutagene agentia, langdurige celkweek of na recombinatie met verwante exogene virussen.^{8,9,10}

3. Eerder COGEM advies

In 2021 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden (productie, transductie, en werkzaamheden met getransduceerde cellen) met lenti- en retrovirale vectoren.¹ De COGEM merkte in dit advies op dat bij cellen van humane oorsprong, waarin restanten endogene gammaretrovirale sequenties aanwezig zijn (klasse I HERVs), na transductie met een gammaretrovirale vector nooit vorming van RCR is 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.^{11,12} De kans om met een dergelijke gecontamineerde humane cellijn te werken, is echter klein. De COGEM achtte het echter wel belangrijk dat de onderzoeker de humane cellen test op aanwezigheid van gammaretrovirussen.

Met betrekking tot werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde humane cellen was de COGEM van oordeel dat het risico op de vorming van RCR in deze cellen verwaarloosbaar klein is, mits de voor transductie gebruikte vectorbatch vrij is van RCR en de te gebruiken cellen getest zijn op de afwezigheid van (replicatiecompetente) gammaretrovirussen. Onder deze voorwaarden adviseerde de COGEM werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde humane cellen op inperkingsniveau I uit te voeren. Daarbij zijn de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- 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 te zijn dat deze vrij zijn van gammaretrovirussen.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager verzoekt handelingen uit te voeren met drie gg-cellijnen, KILR Jurkat cell pool, Pathhunter Jurkat SIRPa en PathHunter U2OS TSHR B-arrestin op ML-I. Met deze aangekochte cellijnen zal celkweek uitgevoerd worden, en zullen functionele assay's verricht worden. Alle werkzaamheden zullen plaatsvinden in een veiligheidskabinet klasse II (VK-II) waarbij handschoenen worden gedragen. De cellijnen zullen tijdens de werkzaamheden en de incubatie gescheiden gehouden worden van animale cellijnen afkomstig van muizen of ratten. Hiervoor zijn aparte veiligheidskabinetten en incubatoren beschikbaar. Tevens wordt het werkoppervlak na werkzaamheden in het VK-II schoongemaakt met een

0.1% SDS-oplossing en wordt minimaal 30 minuten gewacht voordat er andere werkzaamheden plaats zullen vinden.

4.1 Achtergrondinformatie gg-cellijnen

De drie gg-cellijnen zijn afgeleid van de humane cellijn U2OS die oorspronkelijk geïsoleerd is uit botweefsel van een vrouw met osteosaroom, en de humane Jurkat-cel lijn die oorspronkelijk geïsoleerd is uit perifere bloed van een jonge patiënt met acute lymfoblastische leukemie (ALL). Deze gg-cellijnen zijn vervaardigd met behulp van replicatie-deficiënte gammaretrovirale vectoren afgeleid van het Moloney murine leukemia virus (MoMLV; een virus binnen de species *Murine leukemia virus*).

Voor de productie van deze MoMLV-vectoren is een helper-vrije productiecel lijn (Phoenix-ampho) gebruikt die gebaseerd is op de HEK293T-cel lijn en waarin de *gag-pol*- en envelopgenen op verschillende plasmiden aanwezig zijn. De *gag-pol*- en envelopconstructen hebben verschillende promotoren, niet afkomstig van MoMLV, om de kans op recombinatie te minimaliseren.¹³ Het *gag-pol* construct is geïntroduceerd met hygromycine als co-selectiemarker, en het envelopconstruct met diphtheria-resistentie als co-selectiemarker. De gebruikte transferplasmiden bevatten naast de transgenen van interesse ook hygromycine en/of G-418 antibioticumresistentie als selectiemarker.

4.2 ‘Cell marker rescue assay’

De gg-cellijnen zijn voorafgaand aan de uitlevering getest op aanwezigheid van replicatiecompetent retrovirus (RCR) door middel van een ‘cell marker rescue assay’. Hierbij wordt medium van de testcellen na ongeveer 2 dagen toegevoegd aan medium van permissieve targetcellen (U2OS of Jurkat) en vervolgens onder antibiotica-selectie (hygromycine en G418) geïncubeerd gedurende 10 dagen in de aanwezigheid van Polybrene (hexadimethrine bromide). Het Polybrene faciliteert retrovirale transductie. Indien RCR aanwezig is, kan dit tot mobilisatie van de transfervector leiden waardoor de targetcellen antibioticumresistent kunnen worden (tegen G-418 of hygromycine). Door de targetcellen te kleuren met een oplossing van kristalviolet kan beoordeeld worden hoeveel cellen nog leven na antibiotica-selectie. Blauwgekleurde cellen duiden op de aanwezigheid van RCR in het supernatant van de testcellen. Als positieve controle wordt gebruik gemaakt van een cel lijn waarin een hygromycine of G-418 resistentie tegen stabiel tot expressie komt. De aanvrager meldt dat voor geen van de drie gg-cellijnen overlevende blauwe cellen zijn waargenomen.

4.3 ‘Interspecies Contamination’ test en test op aanwezigheid (retro)virusen

De gastheercellijnen, U2OS en Jurkat, waar de getransduceerde cellijnen van afgeleid zijn, zijn tevens getest met een ‘Interspecies Contamination test’ (PCR) op de aanwezigheid van muis, rat, Chinese hamster en geelgroene meerkat (‘African green monkey’) sequenties, en zijn negatief bevonden (gevoeligheid: 1-10 DNA-kopieën per monster). De aanvrager stelt dat hiermee uitgesloten is dat de gastheercel afkomstig is van een muis xenograft. Ook is met behulp van PCR getest op aanwezigheid van een panel van (retro)virusen: Epstein-Barrvirus (EBV), humaan adenovirus (HAdV), Hantaan virus, humaan cytomegalovirus (HCMV), Hepatitis A, B en C, Humaan herpesvirus type 6 (HHV 6) en type 8 (HHV 8), humaan immunodeficiëntie virus 1 (HIV-1) en 2 (HIV-2), Humaan papillomavirus 16 (HPV16) en 18 (HPV18), herpessimplexvirus 1 (HSV-1) en 2 (HSV-2), Humaan T-lymfotroop virus 1

(HTLV-1) en 2 (HTLV-2), lymfocytair choriomeningitis virus (LCMV), Seoulvirus, Sin Nombre virus en varicellazostervirus (VZV). Deze virussen zijn niet aangetroffen in de U2OS- en Jurkat-cellijnen.

5. Overweging en advies

De aanvrager is voornemens op ML-I celkweek en functionele assay's uit te voeren met een drietal aangekochte gg-cellijnen: KILR Jurkat cell pool, Pathhunter Jurkat SIRPa en PathHunter U2OS TSHR B-arrestin. Ter ondersteuning van dit verzoek heeft de aanvrager gegevens aangeleverd van verschillende testen die zijn uitgevoerd om te bevestigen dat er geen RCR of (retro)virussen in deze cellijnen aanwezig zijn. De COGEM is gevraagd of deze testen voldoende uitsluitel geven om omlaagschaling naar ML-I te rechtvaardigen.

5.1 Afwezigheid (endogene) gammaretrovirussen

De COGEM heeft met betrekking tot omlaagschaling van werkzaamheden met getransduceerde humane cellijnen naar ML-I geadviseerd dat hiervoor als voorwaarden dienen te gelden dat bij transductie van de gg-cellijnen geen RCR aanwezig is in de vectorbatch en de cellijnen vrij zijn van gammaretrovirussen.¹ Hoewel exogene gammaretrovirussen geen humane cellen kunnen infecteren, is in het verleden voorgekomen dat humane cellijnen gecontamineerd zijn geraakt met muizengammaretrovirussen - zoals beschreven voor de cellijn Jurkat J6 -¹² die kunnen recombineren met de gammaretrovirale vector of voor mobilisatie van de geïntegreerde retrovirale vector kunnen zorgen.

De uitvoerder levert gegevens aan van een 'Interspecies Contamination test', waarmee de identiteit van de gebruikte cellijnen geverifieerd is, en een test op aanwezigheid van verschillende (retro)virussen, uitgevoerd op de U2OS en Jurkat cellijnen. In de 'Interspecies Contamination test' is enkel humaan DNA aangetroffen, waarmee de humane oorsprong geverifieerd wordt. De PCR-evaluatie voor verschillende (retro)virussen wijst negatief uit. De COGEM merkt op dat in het panel met (retro)virussen waar de U2OS en Jurkat cellijnen op getest zijn, geen muizengammaretrovirussen voorkomen. Hoewel het zeer onwaarschijnlijk is dat humane cellen gammaretrovirussen bevatten, kan afwezigheid van deze virussen op basis van deze test niet volledig uitgesloten worden. Echter, aanwezigheid van complementerende gammaretrovirussen in de getransduceerde cellijnen zal zichtbaar worden bij de 'cell marker rescue assay' op de getransduceerde cellijnen.

5.2 Afwezigheid RCR

De 'Cell marker rescue assay' is een functionele assay om aanwezigheid van RCR aan te tonen, waarbij de biologische activiteit van eventueel aanwezig RCR zichtbaar gemaakt kan worden.¹⁴ De COGEM is van oordeel dat de gebruikte 'cell marker rescue assay' in principe geschikt is om RCR aan te tonen, maar merkt op dat in de aangeleverde gegevens een goede positieve controle ontbreekt. In de aangeleverde informatie wordt als positieve controle een cellijn gebruikt die de resistentiemarker produceert, maar hiermee kan niet bevestigd worden dat een eventueel aanwezig RCR gedetecteerd zou kunnen worden. Het uitvoeren van een gevoelige 'product-enhanced reverse transcriptase' (PERT) assay op kweekmedium zou als alternatief ook uitsluitel kunnen geven over mogelijke aanwezigheid van RCR, evenals de aanwezigheid van een ander (gamma)retrovirus.

6. Advies

De COGEM heeft met betrekking tot detectiemethoden van RCR in een eerder advies gewezen op het belang van goede controles.¹⁵ Omdat met de huidige aangeleverde gegevens geen definitieve uitspraak gedaan kan worden over de uitslag van de RCR-test en eerdere validatiegegevens ontbreken, kan de COGEM niet instemmen met omlaagschaling naar ML-I. Indien validatiegegevens van de ‘cell marker rescue test’ aangeleverd worden, of een geschikte positieve controle geïnccludeerd wordt, zoals een replicerend MoMLV, of bijvoorbeeld de resultaten van een gevalideerde PERT test overlegd worden, kan de COGEM ermee instemmen dat de voorgenomen handelingen op ML-I plaatsvinden.

Referenties

1. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM advies CGM/210218-01
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy browser <https://ictv.global/taxonomy> (bezocht op 27 maart 2023)
3. Gifford RJ *et al.* (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. *Retrovirology* 15: 59
4. Mager DL & Stoye JP (2014). Mammalian endogenous retroviruses. *Microbiol. Spectr.* 3: MDNA3-0009-2014
5. Dewannieux M & Heidmann T (2013). Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr. Opin. Virol.* 3: 646-656
6. Hayward A *et al.* (2013). Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus-host evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 20146-20151
7. Gifford RJ *et al.* (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. *Retrovirology* 15: 59
8. Rasheed S *et al.* (1976). Spontaneous release of endogenous ecotropic type C virus from rat embryo cultures. *J. Virol.* 18: 799-803
9. Lowy *et al.* (1971). Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. *Science* 174: 155-156
10. Rasmussen HB (1997). Interactions between exogenous and endogenous retroviruses. *J. Biomed. Sci.* 4: 1-8
11. Delviks-Frankenberry K *et al.* (2012). Recombinant origin, contamination, and de-discovery of XMRV. *Curr. Opin. Virol.* 2: 499-507
12. Takeuchi Y *et al.* (2008). Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* 82: 12585-12588
13. Stanford University, Nolan Lab. Retroviral systems: Phoenix helper-free retrovirus producer lines. https://web.stanford.edu/group/nolan/OldWebsite/retroviral_systems/phx.html (bezocht: 27 maart 2023)
14. Van der Meulen & Rüdelsheim PLJ (2023). Detection of replication competent virus formation during production and use of lenti- and gammaretroviral vectors. An inventory and description of test methods and their characteristic. COGEM report CGM 2023-01
15. COGEM (2023). Aanbiedingsbrief onderzoeksrapport detectiemethoden replicatiecompetente lenti- en retrovirale vectoren.