

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

DATUM 01 februari 2024
KENMERK CGM/240201-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met picornavirus SRIPs op ML-I

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 23-181_2.8-000, getiteld 'bestudering RNA replicatie m.b.v. Single Round Infectious Particles (SRIPs) van Cocksackie- en Enterovirussen', ingediend door Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met zogenaamde 'single-round infectious particles' (SRIPs) die gebaseerd zijn op een drietal picornavirussen. In het genoom van deze picornavirussen zijn bepaalde genen verwijderd, waardoor geen nieuwe virusdeeltjes gemaakt kunnen worden. De productie van de SRIPs zal plaatsvinden op ML-II. In deze aanvraag verzoekt de aanvrager om verdere analyse van de SRIPs (in combinatie met cellen) op ML-I uit te voeren. De analysewerkzaamheden betreffen zogenaamde 'omics' experimenten en cryo-elektronenmicroscopie/tomografie (CryoEM/ET).

Door de aangebrachte deletie in het picornavirusgenoom, kan tijdens de productie van de SRIPs geen replicatiecompetent picornavirus gevormd worden. De aanvrager levert tevens gegevens van een tweetal experimenten aan, waarmee aangetoond wordt dat er geen vorming en verspreiding van nieuwe virusdeeltjes plaatsvindt na infectie van nieuwe cellen met SRIPs en derhalve geen recombinitie is opgetreden. Ook worden de geproduceerde SRIPs door middel van een PERT-assay gecontroleerd op afwezigheid van murine leukemia virus (MLV), dat gebruikt is om de productiecellen te maken die nodig zijn om de SRIPs te produceren. De COGEM is van oordeel dat deze PERT-assay voldoende gevoelig is om replicatiecompetent MLV aan te tonen.

Omdat de kans op aanwezigheid van replicatiecompetent picornavirus of MLV in de SRIPs verwaarloosbaar klein is, stemt de COGEM in met de omlaagshaling van voorgenomen werkzaamheden op ML-I. Op dit inperkingsniveau zijn de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden 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.

- Drs. Y de Keulenaar, 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 dr. C.A.M. de Haan niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met picornavirus single-round-infectious-particles (SRIPs) op ML-I

COGEM advies CGM/240201-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met ‘single-round infectious particles’ (SRIPs) gebaseerd op picornavirussen CVB3, EV-D68 en EV-A71 (IG 23-181). De aanvraag is afkomstig van de Universiteit Utrecht. In het genoom van deze picornavirussen zijn de structurele genen (P1-regio) gedeleteerd. Productie van de SRIPs zal plaatsvinden op ML-II. In deze aanvraag verzoekt de aanvrager om verdere analyse van de SRIPs in combinatie met cellen op ML-I uit te mogen voeren. De analysewerkzaamheden betreffen ‘omics’ experimenten en cryo-elektronen-microscopie/tomografie (CryoEM/ET). De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met omlaagschaling naar ML-I voor verdere analyse met de SRIPs.

2. Picornavirussen

Picornavirussen (familie *Picornaviridae*) zijn positief enkelstrengs RNA-virussen. De familie Picornaviridae bestaat uit 5 subfamilies, 68 genera en 158 soorten.¹ Infecties met picornavirussen kunnen subklinisch verlopen, maar in sommige gevallen kunnen deze virussen ook milde of ernstige ziekte veroorzaken aan het hart, de lever, huid, luchtwegen, het gastro-intestinale systeem of het zenuwstelsel.² Op het RNA-genoom van picornavirussen (6,7-10,1 kb) ligt één groot open leesraam (‘open reading frame’, ORF, een uitzondering hierop betreffen cadicivirussen die 2 ORFs bevatten). Het ORF wordt geflankeerd door de 5’ en 3’ ‘untranslated regions’ (UTRs), en codeert voor één polyproteïne die wordt gesplitst in meerdere (intermediaire) eiwitten. Het ORF is opgedeeld in drie secties, P1, P2 en P3, waarbij de P1-regio codeert voor de structurele eiwitten (drie of vier capsid eiwitten), en de P2 en P3 regio’s coderen voor de niet-structurele eiwitten (minstens 7 eiwitten).² De SRIPs die de aanvrager voornemens is te produceren zijn afgeleid van picornavirussen uit het genus *Enterovirus* en betreffen Coxsackievirus B3 (CVB3), Enterovirus D68 (EV-D68) en Enterovirus A71 (EV-A71).

3. Voorgenomen werkzaamheden

Het doel van de voorgenomen werkzaamheden is om de manier van infectie van picornavirussen en de interactie met de gastheercel te bestuderen. Hiertoe worden cellen geïnfecteerd met SRIPs, zodat er geen replicerend virus nodig is. Productie van de SRIPs zal plaatsvinden op ML-II en valt buiten deze vergunningaanvraag. Het verzoek tot omlaagschaling betreft enkel de analyses met cryo-EM/ET en ‘omics’ technieken van met SRIPs geïnfecteerde naïeve cellen of lysaat daarvan.

Om de SRIPs te produceren wordt gebruik gemaakt van een CVB3, EV-D68 of EV-A71 replicon; viraal RNA waarin de P1-regio is verwijderd en vervangen door reportergenen zoals mCherry, GFP of luciferase en een ‘self-cleaving’ T2A-site. De CVB3, EV-D68, of EV-A71 replicons zullen op ML-II getransfecteerd worden in een productiecellijn, i.e., een HeLa of HEK293T cellijn die de P1-regio van

CVB3, EV-D68 of EV-A71 tot expressie brengt en die verkregen is door transductie met een replicatie-incompetente Murine leukemia virus (MLV)-vector.^a Door aanwezigheid van de P1-regio in de productiecellijn, brengt deze stabiel de capsid-eiwitten van de uitgangsvirussen CVB3, EV-D68, of EV-A71 tot expressie. De SRIPs die hierdoor geproduceerd worden, worden in 3x “gevroesdood” kweksupernatant (3x achtereenvolgend ingevroren en ontdood) gehouden, waardoor volgens de aanvrager alle aanwezige cellen gedood zijn. Tevens is het supernatant gecentrifugeerd om celresten te verwijderen. Het kweksupernatant met SRIPs wordt getest op afwezigheid van MLV door middel van een ‘product-enhanced reverse transcriptase’ (PERT) assay.

Met betrekking tot de omics-experimenten zullen de geproduceerde SRIPs gebruikt worden om naïeve cellen (i.e., zonder P1-regio)^b te infecteren. De met SRIPs geïnfecteerde naïeve cellen worden op ML-II gelyseerd alvorens de omics-experimenten op ML-I worden uitgevoerd. Voor de cryoEM/TM worden volgens de aanvrager naïeve cellen opgekweekt op grids en vervolgens geïnfecteerd met de verkregen SRIPs. De grids met geïnfecteerde cellen worden naar de ML-I faciliteit gebracht. Daar worden de grids in een VK-II gevitriciseerd (“ingevroren”) door ze onder te dompelen in vloeibaar ethaan, m.b.v. vloeibare stikstof. De grids worden in griddoosjes afgesloten en daarna onder vloeibare stikstof bewaard of overgebracht voor analyse in een cryo-microscop (Aquilos of vergelijkbaar apparaat). Deze techniek heeft als doel om de structuur van het biologisch materiaal te behouden, zonder deze aan te tasten. Om het ontdooien van het monster tegen te gaan worden de grids ten alle tijden onder vloeibare stikstof gehouden. Na afloop van de experimenten kunnen de grids worden opgewarmd, en wordt het materiaal afgedood in hypochloriet (1500 ppm Cl) en gaat materiaal ter plaatse in een afvalvat voor ML-I afval.

4. Eerder COGEM advies

De picorna-/enterovirussen CVB3, EV-D68 en EV-A71 zijn alle door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³ De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over replicons/SRIPs afkomstig van picornavirussen.

5. Overweging en advies

De aanvrager heeft een verzoek tot omlaagschaling ingediend voor werkzaamheden met picornavirus SRIPs op ML-I. Productie van de SRIPs zal plaatsvinden op ML-II. De COGEM is gevraagd of uitgesloten kan worden dat bij de voorgenomen werkzaamheden replicatiecompetent picornavirus kan ontstaan, of afdoende bewezen is dat er geen MLV aanwezig is in het supernatant met SRIPs, en of zij kan instemmen met omlaagschaling naar ML-I voor verdere analyse met de SRIPs. In onderstaande paragrafen zal de COGEM ingaan op de eerdergenoemde aspecten van de milieurisicobeoordeling. De COGEM merkt hierbij op dat het dossier een aantal onduidelijkheden en tegenstrijdigheden bevat,

a. Het is uit de aangeleverde informatie niet duidelijk of uitsluitend MLV-getransduceerde productiecellen gebruikt worden, omdat elders in het dossier ook opgemerkt wordt dat de productiecellijnen verkregen zijn door transductie met een lentivirale vector.

b. Het is uit de aangeleverde informatie niet duidelijk wat er precies bedoeld wordt met naïeve cellen (niet getransduceerd met P1). In de aanvraag is aangegeven dat HEK293, HeLa of primaire cellen (stamcel afgeleide neuronale cellen van rat, muis of mens) geïnfecteerd kunnen worden met de SRIPs. De aanvrager stelt dat er geen getransduceerde cellen uit het ML-II laboratorium gebruikt zullen worden op ML-I.

waardoor de afbakening van de werkzaamheden soms onduidelijk is. Het onderstaande advies heeft derhalve alleen betrekking op de in dit advies beschreven werkzaamheden en handelingen.

5.1 Recombinatie

De picornavirus SRIPs worden geproduceerd door het picornavirus replicon-RNA in P1-expresserende productielijnen te transfecteren. Omdat in deze productiecellen de capsid-eiwitten *in trans* aangeboden worden, kan het replicon-RNA ingepakt worden. De hierbij gevormde SRIPs kunnen slechts één infectieronde doormaken. Een voorwaarde hierbij is dat er geen recombinatie optreedt tussen het replicon-RNA en de P1-regio in de productiecellen. In de aanvraag wordt aangegeven dat er bij de SRIPs die op ML-I zullen worden toegepast, geen sequentiehomologie zal zijn tussen het CVB3, EV-D68, of EV-A71 replicon-RNA en het mRNA dat codeert voor de betreffende capsid eiwitten in de productiecellen. In deze replicons is namelijk de complete P1-regio gedeleteerd en vervangen door een reporter-gen en een T2A-sequentie dat codeert voor een 'self-cleaving' peptide waarmee het reporter-eiwit losgekoppeld wordt. De SRIPs zullen vervolgens gebruikt worden om naïeve cellen (zonder P1 capsid expressie) te infecteren, die met cryoEM/ET onderzocht worden of waarvan het lysaat voor omics-analyses gebruikt zal worden. Omdat in de naïeve cellen geen capsid-eiwitten geproduceerd worden, kunnen geen nieuwe SRIPs geproduceerd worden.

De aanvrager heeft de gegevens van een tweetal analyses gedeeld, waarmee onderzocht is of er recombinatie optreedt tijdens de productie van de SRIPs en na infectie van naïeve cellen (zonder P1-regio)^b. De experimenten zijn volgens de aanvrager '3x in meervoud' uitgevoerd. In het 1^e experiment is aangetoond dat een cytopathogeen effect (CPE, structurele veranderingen in de gastheercel veroorzaakt door de virusinfectie) waargenomen wordt na transfectie van SRIPs in cellen die P1 tot expressie brengen, door replicatie in en verspreiding naar omliggende P1-expresserende cellen. Er wordt echter geen volledige CPE waargenomen in naïeve cellen, daar werd alleen expressie van het reporter-gen waargenomen. De COGEM merkt op dat het laatstgenoemde experiment wat lastiger te interpreteren is, omdat met onverdunde SRIPs (d.w.z., een hoge 'multiplicity of infection', MOI) alsnog celdood op kan treden, teweeggebracht door RNA-replicatie en virale genexpressie. In het 2^e experiment is een 'endpoint' titratie uitgevoerd op naïeve cellen. Hierbij zijn vier verschillende CVB3 SRIPs stocks in triplo getitreerd in 10-staps verdunningen op HEK293T naïeve cellen en HEK293T CVB3-P1 expresserende cellen. Een 'endpoint' titratie is zeer gevoelig. De aanvrager stelt dat de experimenten aantonen dat er geen productie en verspreiding van virusdeeltjes plaatsvindt na infectie van naïeve cellen met SRIPs en er derhalve geen recombinatie op heeft getreden. Deze testen zoals hierboven beschreven voor CVB3 zullen ook worden uitgevoerd voor EV-D68 en EV-A71 SRIPs, die alleen bij gelijke uitkomst op ML-I worden toegepast.

Op basis van aangeleverde informatie over het productiesysteem en de experimentele gegevens is de COGEM van oordeel dat voldoende is aangetoond dat er geen replicatiecompetent virus aanwezig is bij de te gebruiken SRIPs, en dat de kans op het ontstaan van replicatiecompetent picornavirus bij de beschreven werkzaamheden verwaarloosbaar klein is.

5.2 Afwezigheid MLV

Om de aanwezigheid van replicatiecompetent MLV in het kweeksupernatant met de SRIPs uit te sluiten, voert de uitvoerder een PERT-assay uit, alvorens de SRIPs toegepast worden voor analyses op ML-I. De PERT-assay is een zogenoemde functionele assay waarmee ‘reverse transcriptase’ (RT-)activiteit van eventueel aanwezige RCR of (complementerende) gammaretrovirussen in cellijnen kan worden aangetoond.⁴ De PERT-assay die de aanvrager voornemens is toe te passen wordt tevens als commerciële kit aangeboden.^{5,6} De COGEM is van oordeel dat deze PERT-assay voldoende gevoelig is om aanwezigheid replicatiecompetent retrovirus aan te tonen.

5.3 Vrijkomen van SRIPs op de grids voor cryoEM/ET

De COGEM is tevens door BGGO gevraagd of het vrijkomen van de SRIPs van de ‘grids’ na bevriezing mogelijk is gedurende de experimenten. De SRIPs bevinden zich in de cellen die op de grids gekweekt voor de cryoEM/ET microscopie. Deze grids zullen tijdens de analyses bevroren blijven, het is daarmee onwaarschijnlijk dat onder deze situatie SRIPs vrij kunnen komen. Omdat de SRIPs geen nieuwe (infectieuze) virusdeeltjes kunnen vormen, zal in het theoretische scenario dat er onverhoopt SRIPs vrijkomen, er geen risico op verdere verspreiding zijn.

5.4 Conclusie

Aangezien de kans op aanwezigheid van replicatiecompetent picornavirus of MLV in het supernatant met SRIPs verwaarloosbaar klein is, stemt de COGEM in met de omlaagschaling van voorgenomen werkzaamheden met de SRIPs op ML-I. Zij is van oordeel dat op het genoemde inperkingsniveau de risico’s voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2022 Release <https://ictv.global/taxonomy> (bezoekt: 22 januari 2024)
2. Zell R *et al.* (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 98: 2421-2422
3. COGEM (2023). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene DNA- en RNA-virussen (2023). COGEM advies CGM/230929-01
4. Sastry L *et al.* (2005). Product-enhanced reverse transcriptase assay for replication-competent retrovirus and lentivirus detection. *Hum. Gene Ther.* 16: 1227-1236
5. Creative Biogene. PERT Assay Protocol. <https://www.creative-biogene.com/support/PERT-Assay-Protocol.html> (bezoekt: 26 januari 2024)
6. Vermeire J *et al.* (2012). Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti- and retroviral vectors. *Plos One* 7:e50859