

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

DATUM 03 mei 2021
KENMERK CGM/210503-01
ONDERWERP Vervolgadvies 'Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes'

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een recent advies van de COGEM (CGM/210218-01)¹ getiteld 'Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes' is door Bureau GGO een aanvullende adviesvraag (COG 21-002_000) gesteld.

Het advies van de COGEM betreft een heroverweging van de criteria voor de inschaling voor *in vitro* werkzaamheden (productie, transductie en werkzaamheden met getransduceerde cellen) met replicatiedeficiënte lentivirale vectoren onder Ingeperkt Gebruik, en een inschalingsvoorstel voor dezelfde werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren. De onderhavige aanvullende adviesvraag is niet gericht op de gammaretrovirale systemen, maar enkel op de productiesystemen voor replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes.

Replicatiedeficiënte lentivirale vectoren zijn voornamelijk afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). HIV-1 is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3, waardoor werkzaamheden met HIV-1 ingeschaald zijn op het corresponderende inperkingsniveau III. De COGEM heeft geadviseerd dat *in vitro* werkzaamheden met lentivirale productiesystemen, waarbij geen replicatiecompetent lentivirus (RCL) gevormd kan worden, op een lager inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden.

¹ COGEM (2021) Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes.
COGEM advies CGM/210218-01



Er bestaan verschillende lentivirale productiesystemen. Bij de productie van replicatiedeficiënte lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van zogeheten ‘split packaging’ systemen. De verschillende virale genen en sequenties worden opgesplitst en *in trans*, meestal over verschillende plasmiden verdeeld, aangeboden. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen verschillende typen vectorproductiesystemen: 1^e, 2^e, 3^e generatie systemen al dan niet in combinatie met zelf-inactiverende (SIN) vectoren, of translentivirale systemen. In deze systemen verschilt het aantal recombinatiestappen die nodig zijn om de vector zijn eigenschappen terug te geven om zelfstandig te kunnen repliceren.²

De aanvullende adviesvraag van Bureau GGO omvat twee vragen, betreffende de invloed van (pseudo)typering of complementatie van envelopeiwitten op de vorming van RCL in 2^e generatie productiesystemen met SIN vector, 3^e generatie met SIN vector en translentivirale systemen. De COGEM zal deze vragen in de onderstaande tekst beantwoorden en nader toelichten.

Vraag 1


“Acht de COGEM de vorming van RCL ook (op voorhand) verwaarloosbaar klein bij 2^e, 3^e generatie SIN en translenti systemen bij pseudotypering met heterologe virale envelop eiwitten anders dan VSV-G (zoals bijvoorbeeld de envelop eiwitten vermeld onder paragraaf 3.1 van het advies) of kunnen hier andere overwegingen van toepassing zijn?”

Antwoord 1

Bij gebruik van lentivirale vectorproductiesystemen hangt de mogelijkheid op het ontstaan van RCL af van het type productiesysteem dat gebruikt wordt. In deze verschillende productiesystemen (1^e, 2^e, 3^e generatie of translentiviraal) zijn de packagingconstructen aangepast en zijn genen of sequenties verwijderd of gesplitst over meerdere plasmiden (‘split packaging’). Daarnaast kan er gebruik gemaakt worden van SIN vectoren, waarbij aanpassingen in de LTR sequenties resulteren in zelf-inactivatie van de vector. De kans op RCL-vorming is afhankelijk van de virale genen die in het productiesysteem aanwezig of aangepast zijn, en het aantal recombinatiestappen dat nodig is om hieruit een replicerend virusdeeltje tot stand te brengen.² Gezien de samenstelling van de lentivirale vectorproductiesystemen van de 2^e generatie met SIN vector, 3^e generatie met SIN vector en translentivirale systemen, is de COGEM van oordeel dat de kans op RCL vorming met deze systemen verwaarloosbaar klein is.²

De huidige lentivirale vectorproductiesystemen zijn vaak afgeleid van HIV-1 en kunnen een ‘pseudotyping vector’ bevatten, waarbij het envelopeiwit van een ander virus tot expressie wordt gebracht. Doordat er gebruik wordt gemaakt van heterologe envelopeiwitten, zoals ‘vesicular stomatitis Indiana virus’ G-eiwit (VSV-G) maar ook andere niet-lentivirale envelopeiwitten, is er beperkte sequentiehomologie met het HIV-1. Het aantal recombinatiestappen dat leidt tot het ontstaan van RCL blijft dus gelijk bij het pseudotyperen van lentivirale vectorproductiesystemen met niet-lentivirale envelopeiwitten.

² COGEM (2009) Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03



De COGEM is daarom van oordeel dat het risico op de vorming van RCL bij pseudotypering met heterologe/niet-lentivirale envelopeiwitten verwaarloosbaar klein is, bij 2^e generatie met SIN vector, 3^e generatie productiesystemen met SIN vector en translentivirale systemen.

Vraag 2


“Acht de COGEM de vorming van RCL ook verwaarloosbaar bij 2^e, 3^e generatie SIN en translenti systemen bij pseudotypering met specifiek het virale HIV envelop eiwit env of kunnen hier andere overwegingen van toepassing zijn?”

Antwoord

De COGEM merkt op dat in het geval van een lentiviraal vectorproductiesysteem met het virale envelopeiwit van HIV, geen sprake is van pseudotypering aangezien het om een niet-heteroloog envelopeiwit gaat welke wordt gebruikt in het betreffende systeem. In het geval van toepassing van homologe eiwitten zijn de termen ‘typering’ of ‘complementering’ van toepassing.

Lentivirale vectorproductiesystemen van de 2^e generatie met SIN vector, 3^e generatie met SIN vectoren en translentivirale vectoren bevatten verschillende aantallen sequenties van HIV-1, afhankelijk van het type systeem. Bijvoorbeeld bij een 3^e generatie lentiviraal productiesysteem, wordt gebruik gemaakt van een transfervector en van HIV-1 afgeleide packagingconstructen: een *gag-pol* construct en een *rev* construct. In het geval van complementatie met een van HIV afkomstig *env* construct, zullen hierdoor een groot aantal HIV-sequenties in dit productiesysteem aanwezig zijn. Gezien er een gedeeltelijke overlap bestaat tussen de HIV-sequenties die coderen voor *env* en voor *rev* (en *tat*) kan er mogelijk recombinatie optreden tussen het *env* construct (voor de ‘typering’) en het *rev* construct (één van de packagingconstructen). Daarnaast worden de lentivirale envelopeiwitten aangeboden op helper-plasmiden die mogelijk sequenties bevatten die overlap kunnen hebben met andere vectoren van het lentivirale productiesysteem. Door de aanwezigheid van meerdere HIV sequenties en de eventuele overlap tussen deze sequenties, neemt de kans op homologe recombinatie toe, wat mogelijk kan resulteren in RCL vorming. Bij aanwezigheid van de HIV-sequenties voor *env*, *rev* en *tat* zou daarbij mogelijk een dergelijk RCL ook (delen van) *rev* en *tat* tot expressie kunnen brengen. In de constructen zal een aantal openleesramen geïnactiveerd of (deels) verwijderd zijn, HIV is echter zeer competent in het recombineren van zijn virale sequenties en het compenseren van eventuele defecten.

Het bovenstaande in acht nemende, is de COGEM van oordeel dat het risico van RCL-vorming in lentivirale productiesystemen die gecomplementeerd zijn met een envelopeiwit afkomstig van HIV, niet in alle gevallen verwaarloosbaar klein zal zijn. Hierbij is de aanwezigheid van meerdere HIV sequenties en eventuele overlap van belang, en dient gekeken te worden naar het type productiesysteem en de helperplasmides waarop de envelopeiwitten worden aangeboden.



Derhalve is de COGEM van oordeel dat werkzaamheden met 2^e generatie productiesystemen met SIN vector, 3^e generatie productiesystemen met SIN vector, of translentivirale systemen die gecombineerd worden met virale HIV envelopeiwitten, ingeschaald dienen te worden op ML-III. Mogelijk kunnen deze werkzaamheden omlaaggeschaald worden, echter dient dit casusgewijs te worden beoordeeld, waarbij de mogelijkheid op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus wordt overwogen.

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