

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

**DATUM** 31 januari 2023  
**KENMERK** CGM/230131-01  
**ONDERWERP** Aanbieding onderzoeksrapport detectiemethoden replicatiecompetente lenti- en retrovirale vectoren

Geachte mevrouw Heijnen,

In het biomedisch, genetisch en klinisch onderzoek wordt vaak onderzoek gedaan met verzwakte lenti- en retrovirussen, omdat deze virussen hun genetische informatie kunnen integreren in het genoom van de gastheercel en daarmee bepaalde genen in cellen kunnen inbouwen. Om deze virussen te verzwakken, wordt een groot deel van het virale genoom verwijderd. De verzwakte virussen (hierna: lenti- of retrovirale vectoren) kunnen nog steeds hun genoom integreren in het gastheergenoom, maar zijn niet meer in staat nieuwe virusdeeltjes te vormen: ze zijn replicatie-deficiënt. Bij de productie van deze vectoren kan echter niet altijd uitgesloten worden dat er toch een replicerend virus (i.e., replicatiecompetent virus (RCV)) gevormd wordt. Omdat RCV zich kan verspreiden, vormt het een risico bij werkzaamheden met lenti- en retrovirale vectoren.

De COGEM heeft onderzoek laten uitvoeren naar de methoden die gebruikt kunnen worden om RCV, ontstaan bij de productie of gebruik van lenti- en retrovirale vectoren, aan te tonen. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in het rapport '[Detection of replication competent virus formation during production and use of lenti- and gammaretroviral vectors](#)' (CGM 2023-01). Naast een uitgebreid literatuuronderzoek is er ook navraag gedaan onder belanghebbenden naar praktijkervaringen met RCV-testen met behulp van een enquête.

Het onderzoeksrapport biedt een mooi overzicht van de huidige beschikbare RCV-testen, hun geschiktheid en beperkingen, de beschikbare gegevens over validatie van de testen en gebruikte positieve en negatieve controles. Er wordt in het rapport onderscheid gemaakt tussen zogenaamde 'structurele testen', waarbij sequenties of eiwitten van het RCV worden aangetoond (immuno-assay's of moleculaire assay's), en 'functionele testen', waar de biologische activiteit van eventueel aanwezig RCV zichtbaar gemaakt kan worden (cellulaire assay's).



Als voornaamste aandachtspunt voor de structurele testen wordt in het rapport genoemd dat een positieve uitslag niet per definitie betekent dat er functioneel RCV is gevormd. De structurele componenten waarop getest wordt, kunnen namelijk ook afkomstig zijn van de replicatiedeficiënte vectordeeltjes. Bij functionele testen dient er rekening te worden gehouden dat een mogelijke verstoring van de gebruikte (indicator) cellijn, bijvoorbeeld door de eventuele aanwezigheid van endogene retrovirussen, kan resulteren in een vals positieve uitkomst van de test. Wanneer verschillende testen worden gecombineerd, zou dit meer uitsluitel kunnen geven over de betrouwbaarheid van de testuitslag.

Een belangrijke bevinding in het rapport, is dat het uitvoeren van een amplificatiefase voorafgaand aan de RCV test, waarbij een preparaat een aantal maal wordt gepasseerd op gevoelige cellen, de gevoeligheid van de testen kan verhogen en de kans op een vals positief signaal kan verlagen. Tijdens deze stap wordt namelijk het aandeel (interfererende) replicatiedeficiënte vectordeeltjes verdund omdat deze slechts eenmalig kunnen infecteren, en het aandeel van eventueel aanwezig RCV verhoogd vanwege hun replicatiecompetente eigenschap. Dit proces is echter wel tijdrovend.

Uit het rapport blijkt tevens dat er weinig gegevens beschikbaar zijn als het gaat om validatie van de RCV-testen, en dat beschikbare gegevens moeilijk onderling te vergelijken zijn. Verder wordt erop gewezen dat wanneer er bij een test geen RCV gedetecteerd is, het kan het zijn dat er wel RCV aanwezig is, maar dat de hoeveelheid te klein is om te detecteren (onder de detectielimiet). De kans op zo'n vals negatieve uitslag kan worden verkleind door het uitvoeren van een amplificatiefase.

Voor de enquête zijn verschillende organisaties die retro- en lentivirale vectoren produceren of hier (klinisch) onderzoek mee verrichten, gevraagd om informatie te delen over de door hen gebruikte RCV-testen. In totaal zijn twintig organisaties benaderd, waarvan er zeven hebben gereageerd. Daarvan hebben vier organisaties aangegeven dat zij RCV-testen uitvoeren.<sup>1</sup> Bij twee organisaties worden de vectoren ook voor klinische toepassingen gebruikt, bij de overige twee organisaties vindt productie van vectoren of van getransduceerde cellen plaats voor meer fundamentele onderzoeksdoeleinden. Op basis van de enquêteresultaten wordt in het rapport geconcludeerd dat RCV-testen voornamelijk worden uitgevoerd wanneer de vectoren voor klinische doeleinden worden geproduceerd. Bij gebruik van dit soort vectoren voor klinische doeleinden gelden vanuit de European Medicines Agency (EMA)<sup>2</sup> en de ggo-regelgeving<sup>3</sup> verplichtingen om RCV-testen uit te voeren om herstel van de replicatie-capaciteit door recombinatie of complementatie tijdens de productie uit te sluiten. Bepaalde vectoren die geproduceerd zijn met een geavanceerd productie-

- 
1. Bij de overige drie organisaties werden geen RCV-testen uitgevoerd omdat dit vanuit de milieurisicobeoordeling niet verplicht is, bijvoorbeeld omdat gebruik gemaakt wordt van 3<sup>e</sup> generatie SIN-lentivirale vectoren of omdat de werkzaamheden niet op een lager inperkingsniveau uitgevoerd worden.
  2. European Medicines Agency (EMA, 2018). Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014
  3. Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cells genetically modified by means of retro/lentiviral vectors. Version 3 <https://www.loketgentherapie.nl/documenten/good-practice-on-assessment-of-gmo-related-aspects-in-context-of-clinical-trials-with-0>



systeem waarbij de kans op de vorming van RCV verwaarloosbaar klein is,<sup>4</sup> zijn echter vaak gevrijwaard van deze testplicht. In laboratoria waar meer fundamenteel onderzoek plaatsvindt, worden RCV-testen vaak alleen uitgevoerd wanneer deze vanwege de ggo-regelgeving voor de milieurisicobeoordeling noodzakelijk zijn. Daarnaast kunnen RCV-testen uitgevoerd worden wanneer hier aanleiding toe is. Zo is door één organisatie gemeld dat RCV-testen alleen worden uitgevoerd indien onverwachte celdood optreedt tijdens de productie van de vectoren.

De gebruikte test voor detectie van RCV verschilt per organisatie. In alle gevallen vindt voorafgaand aan de RCV-test een amplificatiestap plaats. Eén organisatie meldde dat er wel eens RCV gedetecteerd is, namelijk bij de productie van gammaretrovirale vectoren. Het RCV was ontstaan door de aanwezigheid van endogene retrovirale sequenties in productiecellen afkomstig van muizen.<sup>5</sup>

Op basis van het onderzoeksrapport constateert de COGEM dat er een grote verscheidenheid aan RCV-testen beschikbaar is, die elk hun voor- en nadelen hebben. De COGEM adviseert voorafgaand aan de RCV-test een amplificatiestap toe te passen, waarmee zowel de kans op een vals negatieve uitslag, als de kans op een vals positieve uitslag verkleind wordt. Tevens wijst de COGEM op het belang van validatie, waarbij het gebruik van de juiste positieve en negatieve controles noodzakelijk is voor een juiste interpretatie van de test. Zij adviseert derhalve om alleen gevalideerde testen te gebruiken in het kader van de vergunningverlening.

De COGEM merkt op dat laboratoria of bedrijven waar gewerkt wordt met lenti- of retrovirale vectoren en RCV-testen uitgevoerd worden, vaak de gegevens over het ontstaan van RCV en de gebruikte controles niet openbaar maken. Deze gegevens zijn juist van belang om meer inzicht te krijgen of het uitvoeren van RCV-testen bij verschillende lenti- of retrovirale vectoren of productiesystemen wel of niet noodzakelijk is. De COGEM wijst erop dat meer openheid over deze gegevens, die van invloed kunnen zijn op de milieurisicobeoordeling van deze vectoren, een bijdrage kan leveren aan het verbeteren van het vergunningverleningsproces. Zij adviseert derhalve het ministerie van IenW om met het bedrijfsleven in overleg te gaan over het delen van deze informatie.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

- 
4. Zoals SIN lentivirale vectoren die met een 2<sup>e</sup> of 3<sup>e</sup> generatie productiesysteem vervaardigd zijn. Voor deze systemen is in de wetenschappelijke literatuur nooit gerapporteerd dat er tijdens de productie RCV is ontstaan. Hierover heeft de COGEM eerder geadviseerd dat een RCV-test niet noodzakelijk is: COGEM advies [CGM/090331-03](#)
  5. De COGEM heeft eerder aangekaart dat de aanwezigheid van endogene retrovirussen (ERV's) het risico op de vorming van RCV kan verhogen: COGEM (2021). COGEM advies [CGM/210218-01](#)



c.c.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal