

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

DATUM 06 december 2023
KENMERK CGM/231206-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden VPX-VPR i.c.m. SIN vectorsystemen

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 23-147_2.8-000 getiteld 'Het tot expressie brengen van VPX/VPR eiwit in combinatie met 2^{de} en 3^{de} generatie SIN lentisystemen' afkomstig van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

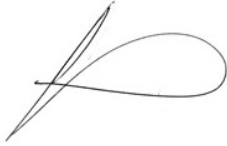
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met zogenaamde 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectorsystemen waarbij een extra vector aan het productiesysteem wordt toegevoegd. Hiermee kunnen lentivirale vectordeeltjes geproduceerd worden die het Vpx-Vpr fusie-eiwit bevatten en hierdoor bepaalde cellen beter infecteren. De aanvrager verzoekt om productie en handelingen met de geproduceerde vectordeeltjes in cellen en dieren op het laagste inperkingsniveau te mogen uitvoeren.

De Vpr en Vpx sequenties die aan het systeem worden toegevoegd, komen ook van nature voor in lentivirussen. De COGEM is daarom gevraagd of het toevoegen van Vpx-Vpr sequenties in het productiesysteem leidt tot een verhoogde kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL), of kan leiden tot een verandering in pathogeniteit of gastheerbereik van de vectordeeltjes.

De COGEM merkt op dat een aantal vectoren niet correct aangemerkt zijn, waardoor niet voor alle 2^e generatie lentivirale productiesystemen uitgesloten kan worden dat recombinatie optreedt en RCL gevormd zou kunnen worden. Zij kan derhalve niet instemmen met de voorgenomen werkzaamheden. Zij kan alleen instemmen indien enkel geverifieerde 3^e generatie productiesystemen worden gebruikt, of geverifieerde 2^e generatie productiesystemen waarin (naast de 20 bp overlap met Vpr in het *tat*-gen), geen accessoire HIV-gensequenties in de packagingconstructen aanwezig zijn. In deze gevallen zal het toevoegen van Vpx-Vpr sequenties een verwaarloosbaar klein milieurisico vormen bij de voorgenomen werkzaamheden. Productiesystemen die hier niet aan voldoen, dienen casusgewijs beoordeeld te worden.

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 belangenverstrengeling is COGEM lid dr. M.B. Ekkelenkamp niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectordeeltjes waarin het VPX-VPR fusie-eiwit aanwezig is

COGEM advies CGM/231206-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden (productie en infectie) met 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectorsystemen waaraan het plasmide pCAGGS-VPX-VPR toegevoegd wordt (IG 23-147). Hiermee wil de aanvrager, het Universitair Medisch Centrum Utrecht, lentivirale deeltjes produceren waarin het Vpx-Vpr fusie-eiwit aanwezig is. Dit fusie-eiwit is gemaakt uit een verkort Vpx-eiwit en het volledige Vpr-eiwit, beide eiwitten spelen een rol bij de infectie van gastheercellen. De aanvrager verzoekt de productie en infectie van de lentivirale vectordeeltjes op ML-I uit te voeren en alle vervolgvactiteiten in al-dan-niet genetisch gemodificeerde (gg-)muizen op DM-I. Vervolgens, nadat in de cellen of in het dier een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes is gerealiseerd, verzoekt de aanvrager de vervolgvactiteiten met de (gg-)muizen op D-I uit te mogen voeren.

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden (productie, infectie en handelingen met getransduceerde cellen) met 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectordeeltjes. Bij deze aanvraag is de COGEM gevraagd of het toevoegen van het Vpx-Vpr fusie eiwit aan het vectordeeltje leidt tot een verhoogde kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL), een verhoogde pathogeniteit dan wel virulentie, of leidt tot een wijziging van tropisme en/of gastheerbereik.

2. Algemene beschrijving van lentivirussen en lentivirale vectorsystemen

Lentivirussen kunnen hun virale genoom in het genoom van de gastheercel integreren. Vanwege deze eigenschap worden replicatiedeficiënte vectoren op basis van lentivirussen ontwikkeld en toegepast als gentransfersysteem. Veel lentivirale vectorsystemen zijn afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1).

2.1 Lentivirussen HIV-1, HIV-2 en SIV

HIV-1, HIV-2 en gerelateerde Simian immunodeficiency virussen (SIV) zijn enkelstrengs RNA virussen en behoren tot de familie van retrovirussen (*Retroviridae*, genus *Lentivirus*). Het genoom bevat drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), twee essentiële regulatoire genen (*tat* en *rev*), een viertal accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef* in HIV-1; *vif*, *vpr*, *vpx* en *nef* in HIV-2 en SIV)¹, een packagingsignaal (Ψ), Rev-responsive element (RRE) en aan weerszijden een zogenaamde 'Long Terminal Repeat' (LTR).

Het genoom is ingepakt in capsid-eiwitten (gecodeerd door het *gag* gen) en wordt omhuld door een lipidenmembraan, de zogenoemde 'envelop'. In de envelop bevinden zich envelopeiwitten (gecodeerd door het *env* gen) die het gastheertropisme van het virus bepalen. Het derde structurele gen *pol*, codeert voor een virus-specifieke polymerase: het reverse transcriptase (RT) dat het virale RNA omzet naar dubbelstrengs DNA.^{2,3} Dit wordt het provirale genoom genoemd. Daarnaast codeert *pol* ook voor het enzym integrase, waardoor het provirale genoom in het DNA van de geïnfecteerde cel wordt

geïntegreerd. De transcriptiemachinerie van de gastheercel zorgt voor de synthese van viraal RNA vanaf het geïntegreerde provirale DNA.

Het regulatoire *tat* gen codeert voor het Tat eiwit dat noodzakelijk is om de transcriptie te activeren. Het *rev* gen codeert voor een eiwit dat aan het RRE in het virale RNA bindt en een belangrijke rol heeft in de export van dit RNA van de kern naar het cytoplasma. Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het packaging-sigitaal Ψ in het RNA essentieel.

De accessoire genen zijn *in vitro*, i.e., in virus-cel cultures in het laboratorium, niet essentieel voor virusreproductie, maar *in vivo* spelen ze een belangrijke rol in de virulentie. Zonder de accessoire genen kunnen deze lentivirussen niet efficiënt repliceren in de mens (HIV-1 en HIV-2) of apen (SIV). De precieze functie van de verschillende accessoire eiwitten is echter nog niet geheel duidelijk.

2.2 De eiwitten Vpr en Vpx

De eiwitten Vpr en Vpx zijn onderdeel van het virusdeeltje en spelen een rol bij infectie. Beide eiwitten worden tijdens de assemblage van het virusdeeltje in grote hoeveelheden in het virusdeeltje ingepakt, en beide eiwitten zijn in verband gebracht met complexen die cellulaire eiwitten afbreken.^{4,5}

Vpr is een klein eiwit dat wordt opgenomen in het virusdeeltje door een interactie met het P6 domein van het Gag 'precursor' eiwit.¹ Binnen enkele uren na infectie van de gastheercel wordt Vpr afgebroken.⁶ De exacte functie van Vpr is tot op heden onduidelijk. Mogelijk vertraagt Vpr de G2 fase van de celcyclus en faciliteert Vpr infectie van macrofagen.^{7,1}

Vpx (alleen aanwezig in HIV-2 en SIV) wordt verondersteld te zijn ontstaan door duplicatie van het *vpr* gen.⁸ Vpx induceert de degradatie van SAMHD1, een enzym dat de lentivirale 'reverse transcriptie' hindert.^{1,9,10} SAMHD1 zorgt in myeloïde cellen, zoals dendritische cellen en macrofagen, voor een depletie van de intracellulaire pool van beschikbare nucleotiden (dNTPs). Het virale Vpx-eiwit induceert afbraak van SAMHD1, waardoor het virus gebruik kan blijven maken van de dNTPs bij het reverse transcriptie-proces.

2.3 Lentivirale vectorsystemen

Voor de productie van replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes wordt gebruik gemaakt van zogenaamde 'split packaging' systemen. Daartoe worden de verschillende virale genen en sequenties opgesplitst, en *in trans* over meerdere vectoren verdeeld. Door deze opsplitsing moet de productie van replicatiecompetent lentivirus (RCL) voorkomen worden. De vectoren moeten gezamenlijk in een gastheercel getransfecteerd worden om virusdeeltjes te produceren. De vectoren zijn:

- 1) de 'transfervector'. Dit construct bevat het gewenste transgen, geflankeerd door virale LTRs. Dit construct bevat ook het packaging-sigitaal, zodat het transgen in de virusdeeltjes wordt ingepakt.
- 2) de 'pseudotyping vector'. Dit is een expressievector voor een envelopeiwit. Meestal wordt VSV-G als envelopeiwit gebruikt, waardoor de resulterende lentivirale vector een veel breder spectrum van doelwitcellen kan infecteren, dan HIV-1.

- 3) het 'packagingconstruct'. Deze vector (of set van vectoren) codeert de HIV-1 eiwitten die nodig zijn voor de productie van virusdeeltjes. De *gag*, *pol* en *rev* genen zijn de minimale componenten, maar daarnaast kan ook het *tat* gen aanwezig zijn.

Bij een 2^e generatie lentiviraal vectorsysteem zijn de *gag*, *pol*, *tat* en *rev* genen aanwezig in één packagingconstruct. Bij een 3^e generatie lentiviraal vectorsysteem zijn de *gag* en *pol* genen op één packagingconstruct aanwezig, ontbreekt het *tat* gen, en is het *rev* gen aanwezig op een afzonderlijk plasmide. Het packagingsignaal en de LTRs ontbreken in de packagingconstructen.

Daarnaast zijn er zelf-inactiverende (self inactivating; SIN) transfervectoren ontwikkeld. In deze vectoren ontbreekt het domein van de 3' LTR dat de promotor en 'enhancer' elementen van de LTR bevat. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor de in het DNA geïntegreerde vector geen functionele LTR promotor/enhancer activiteit meer bezit. Hierdoor wordt de initiatie van transcriptie verhinderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectordeeltjes te produceren waarin het Vpx-Vpr fusie-eiwit aanwezig is. Hiervoor wordt het plasmide pCAGGS-VPX-VPR als vector aan het productiesysteem toegevoegd. Hierin zijn de LTR's en het packagingsignaal afwezig. Het Vpx eiwit is afkomstig van de SIV stam mac251. Het Vpr eiwit is afkomstig van de HIV-1 stam NL4-3. Voor de productie wordt gebruik gemaakt van verschillende HEK 293 cellijnen ('human embryonic kidney cells') en worden verschillende combinaties van transfer-, packaging- en pseudotyperingsvectoren gebruikt. Als pseudotyperingseiwit wordt VSV-G gebruikt.

De donorsequenties die de aanvrager voornemens is te gaan gebruiken als transgen in de transfervector, betreffen: cDNA en genomisch DNA niet coderend voor een schadelijk genproduct (zoogdier, micro-organismen van bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo), oncogene genvarianten van cDNA en genomisch DNA sequenties (mens, muis), T2A of epitope tags (HA, DDK, 6xHIS, FLAG, MYC, V5, GST), siRNA's, shRNA's, sgRNA's gebaseerd op voornoemde sequenties, marker- en reporter genen (niet coderend voor een schadelijk genproduct), Cas9, Cas13 en afgeleide varianten, al dan niet in fusie met voornoemde genen (niet coderend voor een schadelijk genproduct).

3.1 In vitro handelingen

De geproduceerde lentivirale vectordeeltjes worden gebruikt om verschillende humane en animale cellen te transduceren. Cellijnen die EBV- of SV40-sequenties bevatten in combinatie met vectoren die respectievelijk een EBNA1/oriP of SV40 ori bevatten, vallen buiten deze vergunningaanvraag. Verder zullen wildtype en gg-muizen geïnoculeerd worden met de lentivirale vectordeeltjes, of met de getransduceerde cellen. Als generieke voorwaarde stelt de aanvrager dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen, overeenkomstig met artikel 9.1.1.1.3.6. uit de Regeling ggo.¹¹

De aanvrager verzoekt de productie van de lentivirale vectordeeltjes en infectie van animale cellen op ML-I uit te mogen voeren. De aanvrager geeft aan dat open handelingen tijdens de productie van de lentivirale vectordeeltjes en de infectie van gastheren met deze vectordeeltjes, zullen plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II). Ook stelt de aanvrager dat er geen handelingen met de lentiviraal getransduceerde animale cellen worden uitgevoerd in een tijdsbestek van minder dan 30 minuten nadat handelingen met replicatiecompetente lenti- of retrovirussen of andere vectorsystemen in hetzelfde VK-II hebben plaatsgevonden.

3.2 In vivo handelingen

Daarnaast wordt voorgesteld om de toediening van de verkregen lentivirale vectordeeltjes of lentiviraal getransduceerde cellen aan wildtype en gg-muizen plaats te laten vinden op inperkingsniveau DM-I zonder aanvullende maatregelen. Cellen en weefsels afkomstig van deze dieren zullen eerder aan de *in vitro* werkzaamheden die onder paragraaf 3.1 beschreven zijn, op ML-I geanalyseerd worden. De aanvrager verzoekt de vervolgvactiteiten in de getransduceerde (gg-)muizen op D-I uit te mogen voeren, nadat een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes is gerealiseerd (in de te transplanteren getransduceerde cellen, of in het getransduceerde dier). Met betrekking tot de toepassing van gg-cellen in de (al dan niet gg-) muizen, verzoekt de aanvrager om omlaagschaling naar D-I, mits:

- In de cellen een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes is gerealiseerd, die minimaal 100 maal hoger is dan de titer van het inoculum. Deze reductiefactor is berekend aan de hand van de titer van het virale inoculum, de kweektijd na transductie, de halfwaardetijd van het virus op basis van het toegepaste envelopeiwit en het aantal wasstappen en inactiverende stappen, of er is een wachttijd van 7 dagen na transductie van de cellen gehanteerd.

Indien lentivirale deeltjes worden toegediend, of gg-cellen waarvan nog niet is vastgesteld of het aantal aanwezige vrije vectordeeltjes voldoende is gerealiseerd, verzoekt de aanvrager omlaagschaling naar D-I, mits:

- Er een reductie van het aantal vrije vectordeeltjes in het dier is gerealiseerd, die minimaal 100 maal hoger is dan de titer van het inoculum. Deze reductiefactor is berekend aan de hand van de titer van het virale inoculum, de tijd na transductie en de halfwaardetijd van het virus op basis van het toegepaste envelopeiwit; en
- De dieren zijn na inoculatie met de lentivirale vectordeeltjes/lentiviraal getransduceerde animale cellen minimaal 14 dagen op DM-I gehuisvest.

Met betrekking tot het gebruik van macrofaagachtige cellen, dendritische cellen en folliculaire dendritische cellen heeft bureau ggo als aanvullend voorschrift voorgesteld dat deze na transductie met een gevalideerde methode zijn getest op afwezigheid van infectieuze virusdeeltjes of het kadaverafval van D-I dieren in associatie met *in vitro* getransduceerde macrofaagachtige cellen dient als DM-I afval te worden afgevoerd, ook indien een afdoende reductie van het aantal vrije vectordeeltjes is gerealiseerd.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2009 een generiek advies uitgebracht over de inschaling van *in vitro*, *in vivo* en *ex vivo* werkzaamheden met lentivirale vectoren onder Ingeperkt Gebruik.¹² In 2021 heeft de COGEM aangegeven dat de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes een verwaarloosbaar klein milieurisico vormt. Daaropvolgend zijn ook de criteria om tot inschaling te komen voor *in vitro* handeling met lentivirale vectoren, heroverwogen.¹³ Met betrekking tot 2^e generatie en 3^e generatie lentivirale systemen (productie van SIN-vectoren) en translentivirale systemen, heeft de COGEM geadviseerd dat de kans op RCL-vorming bij deze systemen verwaarloosbaar klein is, en dat werkzaamheden op ML-I kunnen plaatsvinden, mits te gebruiken cellen of cellijnen vrij zijn van wildtype lentivirussen om recombinatie, complementatie en mobilisatie van de vectoren uit te sluiten. Daaropvolgend zijn naar aanleiding van vragen van het Bureau ggo over het advies uit 2021, twee vervolgadvisen uitgebracht die betrekking hadden op het gebruik van macrofaagachtige cellen,¹⁴ en de invloed van (pseudo)typering op bepaalde lentivirale vectorproductiesystemen.¹⁵

5. Overweging en advies

In de onderhavige vergunningaanvraag wordt verzocht om de productie en infectie van 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectordeeltjes, waarbij het Vpx-Vpr fusie-eiwit in het vectordeeltje aanwezig is, op ML-I uit te voeren. Tevens wordt verzocht alle vervolgactiviteiten met de lentivirale deeltjes of gg-cellen in (gg-) muizen op DM-I, en na reductie van het aantal vrije vectordeeltjes in de cellen of in het dier, op D-I te laten plaatsvinden.

De COGEM is gevraagd of aanwezigheid van het Vpx-Vpr plasmide pCAGGS VPX-VPR tijdens de productie leidt tot een verhoogde kans op het ontstaan van RCL, en of de aanwezigheid van het Vpx-Vpr fusie-eiwit in de vectordeeltjes invloed heeft op de pathogeniteit danwel virulentie, of het tropisme en/of gastheerbereik. De COGEM zal in onderstaande paragrafen ingaan op deze aspecten van de milieurisicobeoordeling.

5.1 De invloed van pCAGGS-VPX-VPR tijdens de productie van SIN lentivirale vectordeeltjes

De aanvrager stelt dat de lentivirale vectordeeltjes die geproduceerd zullen worden, geen sequenties van het pCAGGS-VPX-VPR plasmide zullen bevatten. Omdat pCAGGS-VPX-VPR geen LTR en packagingsignaal bevat, zullen de sequenties voor het fusie-eiwit niet opgenomen worden in het vectordeeltje en zal alleen het Vpx-Vpr fusie-eiwit zelf in het vectordeeltje aanwezig zijn. Er zal gebruik gemaakt worden van vectoren die zijn voorzien van een SIN-deletie, waardoor de promotor/enhancer activiteit van de LTRs is verwijderd. Hierdoor is de kans op mobilisatie na integratie in het genoom van de gastheer zeer klein. De COGEM heeft geen aanleiding om aan te nemen dat het Vpx-Vpr fusie-eiwit invloed heeft op deze SIN-eigenschap.

5.2 De invloed van het Vpx-Vpr fusie-eiwit op pathogeniteit en tropisme

De aanvrager verwacht dat het Vpx-Vpr fusie-eiwit in de lentivirale vectordeeltjes zal worden opgenomen door de interactie van Vpr met het P6-domein van het Gag precursor-eiwit.⁴ Door toevoeging van Vpx-Vpr aan de lentivirale vectordeeltjes wordt reverse-transcriptie verhoogd. De

aanvrager stelt dat het Vpx-Vpr fusie-eiwit geen invloed heeft op het door pseudotypering aangebrachte tropisme.

Het tropisme wordt bepaald door de virale envelop-eiwitten. Door in een lentiviraal vector-productiesysteem gebruik te maken van een ‘pseudotyping vector’ worden de lentivirale vectordeeltjes gepseudotyped met envelopeiwitten van een ander virus. Zoals in veel systemen zal bij deze werkzaamheden gebruik worden gemaakt van het heterologe envelopeiwit VSV-G, waardoor een veel breder spectrum van doelwitcellen geïnfecteerd kan worden, dan door HIV-1. Het Vpr eiwit bevindt zich daarentegen in de kern van het HIV-deeltje waar het met het virale RNA verbonden is,¹⁶ en komt pas vrij nadat het HIV-deeltje de gastheercel binnenkomt. Het toevoegen van Vpx-Vpr fusie-eiwit in de lentivirale vectordeeltjes verbetert mogelijk de transductie-efficiëntie in myeloïde cellen, hetgeen gezien zou kunnen worden als een verandering in celtropisme. Echter, bij afwezigheid van RCL zal dit een eenmalige infectie betreffen, waarbij geen verdere verspreiding op zal treden en zal dit geen risicovolle gevolgen hebben voor mens en milieu.

5.3 De kans op vorming van RCL tijdens de productie door aanwezigheid van pCAGGS-VPX-VPR

De genen die coderen voor de accessoire eiwitten Vpr en Vpx ontbreken in reguliere 2^e en 3^e generatie lentivirale productiesystemen. In het translentivirale productiesysteem is het *vpr*-gen wel aanwezig om het Pol-eiwit in het virusdeeltje terecht te laten komen. De aanvrager noemt als één van de argumenten voor omlaagschaling dat toevoeging van het Vpr-eiwit bij translentivirale systemen niet leidt tot een hogere inschaling. De COGEM merkt echter op dat in dit productiesysteem enkele andere veiligheidsmaatregelen aanwezig zijn, zoals het opsplitsen van de *gag* en *pol* sequenties over twee vectoren, waardoor geen RCL kan ontstaan.¹⁷

De aanvrager stelt dat er geen sequentieoverlap is tussen de virale onderdelen van de gebruikte vectoren, waardoor de kans op recombinatie en het ontstaan van RCL nihil zou zijn. Indien er inderdaad geen overlap is tussen de sequenties van de betreffende plasmiden is de kans op recombinatie verwaarloosbaar klein.

In een 2^e generatie productiesysteem zijn de regulatoire genen *tat* en *rev* aanwezig op het packagingconstruct. Bij 3^e generatie productiesystemen is het *tat* gen afwezig. In beide productiesystemen geldt als criterium, – zoals beschreven in de Regeling ggo¹⁸ – dat de accessoire HIV-genen (*vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*) afwezig zijn.

De COGEM merkt op dat door overlappende open reading frames (ORF's) in het HIV-genoom, korte sequenties van de accessoire genen *vif* en *vpr* aanwezig zullen zijn in 2^e en 3^e generatie productiesystemen. Door overlap tussen de Pol- en Vif-ORF's zal 56 bp van de *vif*-sequentie aanwezig zijn in het *pol*-gen op het packagingconstruct. Voor 2^e generatie lentivirale productiesystemen geldt daarnaast dat het Tat-ORF 20 bp overlapt met het Vpr-ORF. Omdat bij onderhavige aanvraag het *vpr*-gen via een extra plasmide wordt geïntroduceerd, geldt voor 2^e generatie productiesystemen dat er altijd sequentie-overlap is tussen het packagingconstruct waarop het Tat-ORF aanwezig is en het geïntroduceerde pCAGGS-VPX-VPR.

De overlap van 20 bp is relatief beperkt maar vergroot de kans op recombinatie tussen de Vpr-sequenties in beide constructen. Echter wanneer – naast de *gag* en *pol* genen – alleen de genen voor Tat en Rev in het productiesysteem aanwezig zijn, zal het de kans op het ontstaan van RCL niet wezenlijk vergroten, omdat een extra recombinatie stap vereist is om het *vpr* gen in een eventuele recombinant virus te includeren, en de andere accessoire genen ontbreken. Wanneer er echter meer HIV-sequenties aanwezig zijn of toegevoegd worden aan het productiesysteem, wordt de kans op vorming van RCL verhoogd. Daarbij merkt de COGEM op dat bij 2^e generatie productiesystemen ook gebruik gemaakt kan worden van transfervectoren met een wildtype 5’LTR, waarbij alleen de 3’LTR SIN is. Deze 5’LTR kan mogelijk – met een lage frequentie – overgeërfd worden naar de 3’LTR bij de transductie van cellen.

In de aanvraag wordt een groot aantal vectoren genoemd. De COGEM wijst erop dat een aantal van deze vectoren (meer) overlappende sequenties bevat met pCAGGS-VPX-VPR dan alleen de 20 bp overlap in het Tat-ORF. Zo bevat pCMVdeltaR8.91 een groter gedeelte van de Vpr-sequentie, namelijk 107 bp. Een ander packagingconstruct, pCMVdeltaR8.2, bevat de gehele sequentie van Vpr, en daarnaast alle andere accessoire en regulatoire HIV-genen, en een gedeelte van de U3 sequentie.¹⁹ Dit laatste packagingconstruct wordt in de tabel van de aanvrager ten onrechte als 3^e generatie packagingconstruct aangeduid, terwijl dit construct zelfs niet voldoet aan de eisen voor een 2^e generatie packagingconstruct – zoals beschreven in de Regeling ggo¹⁸ – vanwege de aanwezigheid van accessoire HIV-genen. De COGEM acht het waarschijnlijk dat in meer van de in de aanvraag opgenomen 2^e generatie packagingconstructen accessoire HIV-gensequenties aanwezig zijn.

Uit het bovenstaande blijkt dat, in tegenstelling tot wat de aanvrager meent, er wel sprake is van overlap tussen sequenties van pCAGGS-VPX-VPR en packagingconstructen vermeld in de aanvraag. Om het risico op recombinatie en het ontstaan van RCL in te schatten is het daarom noodzakelijk om te weten of de vectoren correct als 2^e en 3^e generatie aangemerkt zijn, en welke van HIV afkomstige genen en sequenties in de packagingconstructen aanwezig zijn.

De COGEM is van oordeel dat alleen voor geverifieerde 3^e generatie productiesystemen, en voor geverifieerde 2^e generatie productiesystemen waarin naast de 20 bp overlap met Vpr in het *tat*-gen, geen accessoire HIV-gensequenties^a aanwezig zijn, het toevoegen van pCAGGS-VPX-VPR een verwaarloosbaar klein risico op recombinatie en de vorming van RCL oplevert. 2^e generatie lentivirale systemen die hier niet aan voldoen, dienen casusgewijs beoordeeld te worden.

5.4 Inschaling dierproeven (DM-I en D-I)

De aanvrager verzoekt om alle vervolgactiviteiten met de lentivirale vectordeeltjes of gg-cellen in (gg-)muizen op DM-I, en na reductie van het aantal vrije vectordeeltjes in de cellen of in het dier, op D-I te laten plaatsvinden.

De werkzaamheden met dieren zijn in twee activiteiten opgesplitst. Bij de eerste activiteit worden de getransduceerde cellen op DM-I toegediend aan de proefdieren. Wanneer in de cellen een reductie van

^a Met uitzondering van de eerdergenoemde 56 bp aan *vif*-sequenties die aanwezig zullen zijn vanwege overlap met het Pol-ORF.

het aantal vrije vectordeeltjes gerealiseerd, berekend op basis van de COGEM formule,²⁰ of een wachttijd van 7 dagen na transductie van de cellen gehanteerd wordt (zie voorwaarden onder paragraaf 3.2), zal de aanvrager de werkzaamheden met *ex vivo* getransduceerde dieren op D-I vervolgen.

Bij de tweede activiteit worden zowel de lentivirale deeltjes als de getransduceerde cellen aan de proefdieren toegediend op DM-I, waarbij voor de gg-cellen nog niet is vastgesteld of een voldoende reductie van het aantal aanwezige vrije vectordeeltjes is gerealiseerd. De dieren zullen in dit geval op D-I overgeplaatst worden indien de een reductie van de vrije vectordeeltjes in het dier is gerealiseerd aan de hand van een formule, of wanneer de *in vivo* of *ex vivo* getransduceerde proefdieren minimaal 14 dagen op DM-I zijn gehouden (zie voorwaarden onder paragraaf 3.2).

Naar analogie met de inschaling op ML-I, is de COGEM van oordeel dat de toediening van de lentivirale vectordeeltjes of getransduceerde cellen aan de (gg-)muizen op DM-I kan plaatsvinden, mits hierbij alleen lentivirale vectordeeltjes gebruikt worden die geproduceerd zijn met 3^e generatie lentiviraal productiesysteem, of een 2^e generatie lentiviraal productiesysteem waarin naast de 20 bp overlap met Vpr in het *tat*-gen, geen accessoire HIV-gensequenties aanwezig zijn. Tevens kan zij enkel onder dezelfde voorwaarde instemmen met de voorgestelde voorschriften voor verdere omlaagschaling van DM-I naar D-I.

6. Advies

De COGEM kan niet positief adviseren over deze vergunningaanvraag, omdat bij de voorgenomen werkzaamheden packagingconstructen worden toegepast waarbij een risico op vorming van RCL bestaat. De COGEM kan alleen instemmen met de omlaagschaling van de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden (met inachtnaam van de genoemde maatregelen beschreven in paragraaf 3), mits gebruik gemaakt wordt van geverifieerde 3^e generatie productiesystemen, of geverifieerde 2^e generatie productiesystemen waarin naast de 20 bp overlap met Vpr in het *tat*-gen, geen accessoire HIV-gensequenties^a in de packagingconstructen aanwezig zijn. Wanneer aan deze voorwaarden voldaan wordt, acht de COGEM de milieurisico's van het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op de betreffende inperkingsniveaus verwaarloosbaar klein. Indien niet aan deze voorwaarden voldaan kan worden, dient een casusgewijze beoordeling plaats te vinden.

7. Signalerende opmerking

In het algemeen zijn 3^e generatie productiesystemen wereldwijd vrij goed gedefinieerd, maar dat is niet het geval voor 2^e generatie productiesystemen. Hierdoor kan er variatie zitten in de gebruikte packagingconstructen met betrekking tot de aanwezigheid van accessoire genen of gedeeltes hiervan. Ook de informatie die leveranciers van deze systemen geven, is niet altijd volledig of correct waardoor niet direct inzichtelijk is welke sequenties aanwezig zijn op de plasmiden. Hierdoor kan het gebeuren dat aanvragers niet altijd goed op de hoogte zijn van de sequenties die in de vectoren aanwezig zijn. Dit kan risico's opleveren voor werkzaamheden met 2^e generatie lentivirale productiesystemen die standaard op ML-I worden ingeschaald, zeker wanneer additionele HIV-sequenties aan het productiesysteem worden toegevoegd, zoals in onderhavige vergunningaanvraag het geval is. De COGEM signaleert derhalve dat

bij gebruik van 2^e generatie lentivirale productiesystemen extra aandacht besteed moet worden aan mogelijke sequentieoverlap in de gebruikte packagingconstructen.

Referenties

1. Romani B & Cohen EA (2012). Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase. *Curr. Opin. Virol.* 2: 755–763
2. Goff SP (2013). Retroviridae. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
3. Freed EO & Martin MA (2013). Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
4. Strebel K (2013). HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr. Opin. Virol.* 3: 692–699
5. Gramberg T *et al.* (2009). Accessories to the Crime: Recent Advances in HIV Accessory Protein Biology. *Curr HIV/AIDS Rep.* 6: 36-42
6. Wanaguru M & Bishop KN (2021). HIV-1 Gag recruits oligomeric VPR via two binding sites in P6, but both mature P6 and VPR are rapidly lost upon target cell entry. *J. Virol.* 95: e0055421
7. Malim MH & Emerman M (2008). HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3: 388–398
8. Tristem M, Marshall C, Karpas A, Petrik J, Hill F: Origin of vpx in lentiviruses. *Nature* 1990, 347:341-342.
9. Laguette N *et al.* (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474: 654–65
10. Hrecka K *et al.* (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474: 658–661
11. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-01-01#Bijlage9> (bezocht: 28 november 2023)
12. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
13. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM advies CGM/210218-01
14. COGEM (2022). Vervolgadvies ‘Inschaling replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes’ COGEM advies CGM/220517-02
15. COGEM (2021). Vervolgadvies Heroverweging inschaling werkzaamheden replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes. COGEM advies CGM/210503-01
16. Zhang S *et al.* (1998). Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 212: 157-166
17. Kappes JC and Wu X (2002) Safety consideration in vector development. *Somat.Cell Mol. Genet.* 126: 147-158
18. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-10-01> (bezocht: 23 november 2023)

19. Naldini *et al.* L (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 11382-11388
20. Dautzenberg IJ & Hoeben RC (2020). The COGEM formula revisited, experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles. COGEM rapport CGM 2020-01