

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
dhr. M.G.J. Harbers
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 12 juni 2024
KENMERK CGM/240612-01
ONDERWERP Generiek advies over elementen in lenti- en retrovirale vectoren

Geachte heer Harbers,

Om de vergunningsprocedure voor een aantal toepassingen met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) in klinisch onderzoek te vereenvoudigen, zijn zogeheten 'vergunningen onder vaste voorwaarden' (VoV's) ingesteld. Indien een klinische studie kan voldoen aan randvoorwaarden, is een verkorte procedure mogelijk en kan de studie worden vergund onder de VoV. Hieraan ligt ten grondslag dat de milieurisico's van het betreffende type ggo verwaarloosbaar klein zijn. De VoV's zijn mede gebaseerd op de door de COGEM opgestelde generieke milieurisicobeoordelingen.

De COGEM heeft in 2019 een generieke milieurisicobeoordeling uitgevoerd naar vectoren afgeleid van lentivirussen en retrovirussen. Bij klinische toepassingen met deze vectoren worden cellen buiten het lichaam van de patiënt behandeld met de vectoren (*ex vivo* transductie), om zo een "vreemd" gen (afkomstig van een ander organisme, een zogeheten transgen) in de cellen te introduceren. Uit de generieke milieurisicobeoordeling is geconcludeerd dat de milieurisico's voor toepassingen met lenti- en retrovirale vectoren in klinisch onderzoek verwaarloosbaar klein zijn, mits er aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan.¹ Deze randvoorwaarden zijn in 2020 geüpdatet.^{2,3} Naar aanleiding van geluiden uit het werkveld is gebleken dat er behoefte is aan een verdere specificatie van de gestelde randvoorwaarden.

1. Overzicht van de randvoorwaarden voor klinische studies met *ex vivo* lenti- of retroviraal getransduceerde cellen

De COGEM heeft in de milieurisicobeoordeling van lenti- en retrovirale vectoren verschillende aspecten behandeld. Dit betrof (i) de mogelijke vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL) of replicatiecompetent retrovirus tijdens de productie van de vector, (ii) de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het uiteindelijke genproduct, en (iii) de kans op complementatie en mobilisatie van



de vector.¹ De COGEM concludeerde dat de milieurisico's van klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen verwaarloosbaar klein zijn bij toepassing van retrovirale vectoren gebaseerd op Molony murine leukemia virus (MoMLV; ICTV taxonomie *Gammaretrovirus murleu*) of bij toepassing van SIN lentivirale vectoren gebaseerd op Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1; ICTV taxonomie *Lentivirus humimdef1*) voorzien van een 'self-inactivating' (SIN) deletie en die geproduceerd zijn met een derde generatie productiesysteem, mits er aan de volgende randvoorwaarden is voldaan:

- Het gebruikte transgen codeert niet voor sequenties die in staat zijn de replicatie-deficiënte retro- of lentivirale vector te complementeren, of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen;
- Voor de moleculaire karakterisering geldt dat minimaal de vectorkaartjes en beschrijvingen van de productieplasmiden zijn overlegd door de aanvrager, en dat de aanvrager heeft bevestigd dat deze plasmiden gesequenced zijn en dat de retrovirale of lentivirale sequenties in de plasmiden identiek zijn aan de beoogde sequenties.

Specifiek voor klinische studies met retrovirale vectoren hanteert de COGEM de volgende aanvullende randvoorwaarden:

- Er zijn geen vrije infectieuze vectordeeltjes in het terug te plaatsen medische product aanwezig;
- De vectorbatch, de 'end of production' cellen of het uiteindelijke medische product (de getransduceerde cellen) worden door middel van een gevalideerde test gecontroleerd op de afwezigheid van replicatiecompetent retrovirus;
- Het medische product betreft geen macrofagen.

Voor studies met lentivirale vectoren, waarbij de aanwezigheid van vrije lentivirale vectordeeltjes niet uitgesloten kan worden, dienen daarnaast de volgende generieke maatregelen in acht genomen te worden:

- Na toediening van het medisch product (*ex vivo* lentiviraal getransduceerde gg-cellen) blijft de patiënt minimaal 16 uur in het ziekenhuis opgenomen, zodat de standaard ziekenhuis-hygiënische maatregelen in acht genomen kunnen worden;
- Na toediening van het medisch product wordt de infuusinsteekplaats met een adequate methode gedesinfecteerd om resterende cellen en vectordeeltjes te inactiveren, en worden standaard ziekenhuis-hygiënische maatregelen tijdens de verzorging van de patiënt in acht genomen;
- Patiënt, en medisch personeel en bezoekers worden voorgelicht hoe de eerste 16 uur na toediening van het medisch product er ten aanzien van wondverzorging en besmet materiaal moet worden omgegaan.

Het uitsluiten van HIV-1 en HIV-2 patiënten bij klinische studies met lentivirale vectoren, is vervallen als randvoorwaarde van de generieke milieurisicobeoordeling.



2. Specificatie van de elementen in lenti- en retrovirale vectoren

Mede door voortgaande ontwikkelingen met betrekking tot lenti- en retrovirale vectoren, is gebleken dat er behoefte is aan verdere specificatie van de elementen die in het vectorgenoom aanwezig mogen zijn. Met betrekking tot elementen die al dan niet aanwezig mogen zijn, heeft de COGEM de randvoorwaarde gesteld dat 'het gebruikte transgen niet codeert voor sequenties die in staat zijn de replicatie-deficiënte retro- of lentivirale vector te complementeren, of voor schadelijke genproducten of (proto)oncogenen'. Of sequenties in staat zijn tot complementatie of niet, wordt in deze brief verder uitgediept.

2.1 Virale promotor sequenties


In retrovirale vectoren en de eerste generaties lentivirale vectoren wordt de expressie van het transgen gedreven door de 'long terminal repeat' (LTR) sequenties.⁴ In SIN vectoren – waaruit de promotor en enhancer sequenties in de 3'LTR zijn verwijderd – worden interne promotoren en regulatoire sequenties ingebouwd voor de expressie van het transgen. Expressie van het transgen kan gereguleerd worden door bijvoorbeeld cellulaire promotoren van humane genen, zoals elongation factor 1alpha (EEF1 α), ubiquitin C (UBC) en phosphoglycerate kinase (PGK), of door virale promotoren, afkomstig van bijvoorbeeld cytomegalovirus (CMV), murine leukaemia virus (MLV) of spleen focus-forming virus (SFFV).⁵ Naast promotoren die constitutieve expressie teweegbrengen, is er ook groeiende interesse in induceerbare promotoren.⁴ Zover bij de COGEM bekend, is recombinatie tussen lenti- of retrovirale vectoren en sequenties afkomstig van virussen anders dan lentivirussen of gammaretrovirussen nog nooit wetenschappelijk aangetoond. Daarnaast acht zij het niet mogelijk dat interne virale promotoren, anders dan lenti- of retrovirale promotoren, in staat zijn de SIN-deletie te complementeren.

2.2 Niet-virale intronen

In lenti- en retrovirale vectoren wordt gebruik gemaakt van niet-virale intron sequenties, om de expressie van het transgen te beïnvloeden. De COGEM ziet geen aanleiding om te verwachten dat niet-virale intronen de replicatie-deficiënte eigenschappen van lenti- en retrovirale vectoren kunnen complementeren of de SIN-deletie van lentivirale vectoren kunnen opheffen.

2.3 'Internal ribosome entry sites' (IRES) en ribosomale skip sequenties

In lenti- en retrovirale vectorsystemen kan gebruik gemaakt worden van 'internal ribosome entry sites' (IRES) en 'ribosomale skip sequenties'. Deze sequenties worden ingezet om meerdere transgenen in één vector onder één promotor tot expressie te brengen, zogeheten multicistronische vectoren.^{6,7} Deze elementen zijn oorspronkelijk geïdentificeerd in picornavirussen, en zijn later ook ontdekt in andere virale en cellulaire eukaryotische mRNAs.^{8,9} IRES-elementen zijn ongeveer 130 tot 460 nucleotiden groot. In een multicistronische vector worden de IRES-sequenties tussen de transgenen geplaatst. Vanaf het mRNA-transcript wordt op iedere IRES-locatie opnieuw translatie geïnitieerd, en wordt er op iedere plek opnieuw een translatiecomplex samengesteld, waardoor er meerdere eiwitten geproduceerd worden vanaf hetzelfde transcript.⁶



Ribosomale skip sequenties worden eveneens tussen de transgenen geplaatst, en hierbij worden ook meerdere eiwitten geproduceerd vanaf hetzelfde transcript. Een verschil met IRES elementen is dat bij ribosomale skip sequenties het ribosoom na de synthese van het eerste eiwit naar het volgende gen gaat zonder te dissociëren van het mRNA. Dit in tegenstelling tot de IRES, waar de synthese tussentijds onderbroken wordt.⁷ Voorbeelden van ribosomale skip sequenties zijn afkomstig van 2A 'self-cleaving' eiwitten. In tegenstelling tot wat 'cleaving' doet vermoeden, ontstaan de meerdere eiwitten hier niet door een proteïnase, maar door ribosomal skipping.^{10,11} 2A peptidesequenties zijn afkomstig van virussen. Veelgebruikte 2A-peptide-sequenties in multicistronische vectoren zijn afkomstig van bijvoorbeeld foot-and-mouth disease virus (F2A), equine rhinitis virus (E2A), porcine teschovirus-1 (P2A) en Thosea asigna virus (T2A).⁷

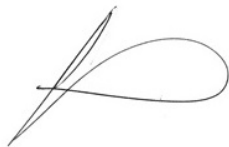
Bovengenoemde IRES- en ribosomale skip sequenties zijn niet in staat de SIN-deletie van lentivirale vectoren op te heffen, noch zijn ze in staat om het replicatie-deficiënte karakter van de lenti- en retrovirale vectoren te complementeren. Derhalve is de COGEM van oordeel dat het opnemen van deze sequenties, mits niet afkomstig van lenti- of retrovirussen, in de transfervector voor de productie van lenti- en retrovirale partikels het replicatie-deficiënte karakter niet zal beïnvloeden.

3. Conclusie

De COGEM is van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij het gebruik van lenti- en retrovirale vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits er aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan, waaronder dat er geen sequenties gebruikt worden die in staat zijn de replicatie-deficiënte vector te complementeren.^{1,2,3} De COGEM is van oordeel dat virale promotor-, niet-virale intron-, IRES en ribosomale skip-sequenties niet in staat zijn het replicatie-deficiënte karakter van deze vectoren te complementeren, mits hiervoor geen lenti- of retrovirale sequenties worden gebruikt, en daarmee onder de randvoorwaarden van de VoV kunnen vallen.

De COGEM is van oordeel dat, indien aan de door haar gestelde randvoorwaarden wordt voldaan, klinische studies met *ex vivo* lentiviraal of retroviraal getransduceerde cellen een verwaarloosbaar klein risico vormen voor mens en milieu.

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



Referenties

1. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met ex vivo retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
2. COGEM (2020). Generiek advies over de milieurisicobeoordeling van klinische studies met ex vivo lentiviraal getransduceerde cellen: aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medisch product. COGEM advies CGM/200507-01
3. COGEM (2020). Briefadvies markttoelatingen van medische ggo-producten die onder de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies vallen. COGEM advies CGM/201214-02
4. Page A *et al.* (2020). Toward tightly tuned gene expression following lentiviral vector transduction. *Viruses* 12: 1427
5. Cooper AR *et al.* (2015). Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter. *Nucleic acids res.* 43: 682–690
6. Renaud-Gabardos E *et al.* (2015). Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J. Exp. Med.* 5: 11-20
7. Shaimardanova AA *et al.* (2019). Production and application of multicistronic constructs for various human disease therapies. *Pharmaceutics.* 11: 580
8. Jackson RJ & Kaminski A (1995). Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 1: 985-1000
9. Martínez-Salas E. (1999). Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 458-464
10. Donnelly MLL *et al.* (2001). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J. Gen. Virol.* 82: 1013-1025
11. Donnelly MLL *et al.* (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.* 82: 1027-1041