

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mr. drs. A.W.H. Bertram
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 20 oktober 2026
KENMERK CGM/261020-01
ONDERWERP Advies Omlaagschaling werkzaamheden met Vpx-VLP's gebaseerd op SIV

Geachte mevrouw Bertram,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een vergunningaanvraag voor omlaagschaling van productie- en infectiewerkzaamheden met virus-like particles (VLP's) gebaseerd op simian immunodeficiency virus (SIV) (IG 16-309_028), ingediend door het Prinses Máxima Centrum voor Kinderoncologie te Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

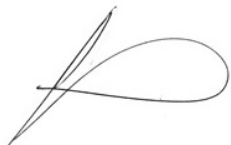
De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met zogenoemde 'virus-like particles' (VLP's), gebaseerd op het simian immunodeficiency virus (SIV), een apenvirus dat verwant is aan het humaan immunodeficiëntievirus (HIV). VLP's zijn 'lege' virusdeeltjes zonder eigen genetisch materiaal, die kunnen worden gebruikt om RNA, DNA of eiwitten in cellen te brengen. In dit geval bevatten de VLP's het Vpx-eiwit afkomstig van SIV. In het onderzoek zullen cellen gelijktijdig worden blootgesteld aan deze VLP's en aan een zelf-inactiverende (SIN) lentivirale vector gebaseerd op HIV. Het Vpx-eiwit wordt hierbij gebruikt om de efficiëntie waarmee de lentivirale vector cellen genetisch kan modificeren te verhogen, door een specifiek eiwit in de cel te remmen.

Tijdens de productie van de VLP's zal het SIV DNA dat hiervoor wordt gebruikt, of het hiervan afgeleide RNA, niet actief worden verpakt in de VLP's. Ook kan er geen SIV-DNA ingebouwd worden in het DNA van cellen. De overeenkomst in genetische sequentie tussen het gebruikte SIV-construct en de op HIV-gebaseerde SIN-lentivirale vectoren is zeer gering, waardoor kans op recombinatie tussen beide verwaarloosbaar klein is.

Samenvattend is de COGEM van oordeel dat de kans op het ontstaan van een replicerend lentivirus tijdens de productie van en experimenten met de Vpx-VLP's verwaarloosbaar klein is. Gelet op het voorgaande kan de COGEM instemmen met het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op ML-II-inperkingsniveau. De COGEM is van oordeel dat op dit inperkingsniveau, en met de voorgestelde aanvullende voorwaarde, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'S' followed by a loop and a horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Bureau ggo, Afdeling Gentechnologie en Biologische Veiligheid, RIVM
- Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal, Ministerie van IenW

Advies Omlaagschaling werkzaamheden met Vpx-VLP's gebaseerd op SIV

COGEM-advies CGM/261020-01

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van productie- en infectiewerkzaamheden met virus-like particles (VLP's) (IG 16-309_028). De aanvraag is afkomstig van het Prinses Máxima Centrum voor Kinderoncologie te Utrecht. De aanvrager is voornemens op simian immunodeficiency virus (SIV)-gebaseerde VLP's te produceren die het Vpx-eiwit bevatten. Deze VLP's zullen worden gebruikt om de transductie van verschillende cellen met 2^e- of 3^e-generatie self-inactivating (SIN) lentivirale vectoren te verbeteren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de omlaagschaling van de VLP productie- en de transductiewerkzaamheden naar ML-II.

2. Achtergrondinformatie simian immunodeficiency virus

Simian immunodeficiency virus (SIV; species *Lentivirus simimdef*) behoort tot de familie van de *Retroviridae*, en het genus *Lentivirus* (subfamilie *Orthoretrovirinae*).¹ Retrovirussen bezitten een enkelstrengs RNA-genoom dat omgeven is door capside-eiwitten en een lipidenmembraan, de zogenaamde 'envelop'.² Kenmerkend voor retrovirussen is dat bij infectie het RNA-genoom door een virus-specifiek polymerase, het 'reverse transcriptase', wordt omgezet naar dubbelstrengs DNA, dat in het genoom van de gastheercel integreert (het zogenaamde provirus).² Het geïntegreerde genoom kan in de gastheercel aanwezig blijven zolang de gastheer blijft bestaan.³ Vanuit het provirale genoom in de gastheercel kunnen nieuwe infectieuze virusdeeltjes gevormd worden, die op hun beurt nieuwe cellen kunnen infecteren en zich kunnen verspreiden tussen gastheren.^{3,4}

2.1 Genoom

Het genoom van SIV bevat drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*), twee essentiële regulatoire genen (*tat* en *rev*), een vijftal accessoire genen (*vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx*, en *nef*)⁵, een packaging-sigitaal (Ψ), een Rev-responsive element (RRE) en aan weerszijden een zogenaamde 'Long Terminal Repeat' (LTR). Onder andere de SIV-variant die geïsoleerd is uit African green monkeys (SIVagm) bevat geen *vpu*- of *vpx*-gen.^{6,7}

2.2 Ziekteverschijnselen en verspreiding

Verscheidene SIV-varianten veroorzaken een persistente infectie in Afrikaanse niet-menselijke primaten. Bij de meeste apensoorten verloopt de infectie asymptomatisch, maar in sommige gevallen, met name wanneer het virus wordt overgedragen van de ene apensoort naar een andere, ontwikkelen zich symptomen die lijken op die van *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), zoals voorkomt bij de mens na infectie met het humaan immunodeficiëntievirus (HIV).

Enkele SIV-varianten uit chimpansee, gorilla en roetmangabey (respectievelijk SIVcpz, SIVgor en SIVsmm), zijn de soortenbarrière gepasseerd en hebben zich na aanpassing in de mens ontwikkeld tot verschillende stammen van HIV.^{8,9,10,11} Er is geen bewijs dat SIV van mens tot mens overgedragen wordt.

3. Voorgenomen werkzaamheden

3.1 Productie van de Vpx-VLP's

De aanvrager is voornemens om 'viral like particles' (VLP's) die het Vpx-eiwit bevatten, te produceren in HEK293T-cellen. De cellen worden hiervoor getransfecteerd met twee plasmiden die coderen voor de eiwitten die nodig zijn voor vorming van deze VLP's.

Het eerste plasmide, pCMV-VSV-G, codeert voor het envelop-eiwit van het vesicular stomatitis virus (VSV-G). Het tweede plasmide pSIV-D3psi/Δenv/ΔVif/ΔVpr is afgeleid van het SIV-genoom en codeert voor de structurele eiwitten Gag en Pol, het accessoire eiwit Vpx, en de regulatoire eiwitten Tat en Rev.¹² De LTR sequenties en het packaging signaal zijn niet aanwezig en RNA-transcriptie van de SIV-genen staat onder controle van de CMV-promoter. De *vif*- en *vpr*-genen zijn elk geïnactiveerd door mutaties in zowel het start- als het stopcodon. De mutaties bestaan uit twee nucleotidesubstituties, waardoor reversie in één stap is uitgesloten. Van het *env*-gen zijn 1434 bp verwijderd en ook het *nef*-gen is grotendeels verwijderd (slechts 43 van de 247 codons aanwezig). Hierdoor kan geen functioneel Vif, Vpr, Env of Nef eiwit geproduceerd worden.

Het kweekmedium van de getransfecteerde cellen, dat de Vpx-VLP's bevat, wordt gefiltreerd (0,45 µm) om cellen en cel-resten te verwijderen. Daarna zal het worden behandeld met benzonase/DNase om eventueel aanwezig plasmide-DNA af te breken. De VLP's zullen worden geconcentreerd door middel van ultracentrifugatie.

3.2 Co-infectie van cellen met de VLP's en lentivirale vector deeltjes

Verschillende cellen en cellijnen zullen tegelijkertijd worden geïnfecteerd ("getransduceerd") met de Vpx-VLP's de gg-lentivirale vectordeeltjes. Deze lentivirale vectordeeltjes worden vervaardigd met 2^e- of 3^e-generatie 'packaging constructen' en SIN-transfervectoren die zijn ingeschaald op ML-I. De gebruikte donorsequenties in de transfervectoren coderen volgens de aanvrager niet voor toxines, allergenen of prionen, of voor sequenties die invloed hebben op de biologische inperking van de lentivirale vectoren.

Het Vpx-eiwit in de VLP's, heeft tot doel om tijdens co-transductie het SAMHD1-eiwit in de gastheercel af te breken, waardoor reverse transcriptie van het lentivirale vector RNA wordt verhoogd.¹³ Op deze manier kunnen bepaalde cellen, waaronder myeloïde cellen, efficiënter worden getransduceerd met de lentivirale vectoren.

De aanvrager verzoekt om de voorgenomen productie- en transductiewerkzaamheden uit te mogen voeren op ML-II. Daarbij zal bij beide activiteiten het volgende aanvullende voorschrift gehanteerd worden:

- het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen. Dit teneinde het ontstaan van een recombinant virus, of mobilisatie van het vectorgenoom uit te sluiten.

4. Eerder COGEM-advies

De COGEM heeft SIV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁴ De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over productie- en transductiewerkzaamheden met SIV-gebaseerde VLP's.

5. Overweging

In onderhavige aanvraag wordt verzocht om op ML-II VLP's te mogen produceren die het SIV Vpx-eiwit bevatten en vervolgens cellen en cellijnen te transduceren met deze VLP's en 2^e- of 3^e-generatie SIN-lentivirale deeltjes. Volgens de aanvrager bevatten de VLP's enkel het SIV Vpx-eiwit; het plasmide-DNA wordt niet actief in de VLP's verpakt. De COGEM is gevraagd in te stemmen met de inschaling van de voorgenomen productie- en transductiewerkzaamheden op ML-II-inperkingsniveau.

De VLP's bevatten het SIV Vpx-eiwit. De VLP's worden geproduceerd met behulp van het pSIV-D3psi/Δenv/ΔVif/ΔVpr-plasmide. Inkapseling van dergelijk plasmide-DNA is volgens de COGEM niet eerder beschreven en daarom onwaarschijnlijk. Omdat het gebruikte plasmide niet codeert voor een RNA packaging signaal wordt het geproduceerde RNA niet actief verpakt in de Vpx-VLP's. Niet-specifieke inkapseling van het RNA zal een inefficiënt proces zijn.^{15,16} Het RNA bevat ook geen LTR-sequenties, 'primer binding site' (PBS) en '3'-polypurine tract' (PPT), en kan daarom niet worden omgezet naar DNA en integreren het DNA van de cel, waardoor het hoogstens tijdelijk aanwezig zal zijn. De COGEM is van oordeel dat het risico van niet-specifieke inkapseling van RNA dat is getranscribeerd vanaf het plasmide-DNA verwaarloosbaar klein is.

De aanvrager geeft aan dat in het pSIV-D3psi/Δenv/ΔVif/ΔVpr-plasmide beide exonen van zowel het *tat*- als het *rev*-gen aanwezig zijn. Deze eiwitten kunnen dus in de cellen die de Vpx-VLP's produceren, volledig worden gevormd. Het Tat-eiwit kan de transcriptie activeren via het TAR-element in de LTR. Het plasmide heeft echter geen LTR, waardoor de aanwezigheid van het Tat-eiwit niet voor activatie van transcriptie kan zorgen. Het Rev-eiwit zorgt voor nucleaire export van 'unspliced' transcripten door binding aan het Rev-responsive element (RRE). Uit de aangeleverde informatie van de aanvrager is niet duidelijk op te maken of het RRE aanwezig is in pSIV-D3psi/Δenv/ΔVif/ΔVpr. De aanwezigheid van een RRE is volgens de COGEM echter wel aannemelijk, omdat het construct zowel Gag-Pol als Vpx moet produceren. Hiervoor zijn zowel 'spliced' als 'unspliced' transcripten noodzakelijk. De COGEM is van oordeel dat de aanwezigheid van beide exonen van zowel het *tat*- als het *rev*-gen, alsmede de eventuele aanwezigheid van het RRE geen effect heeft op de milieurisicobeoordeling.

Cellen zullen tegelijkertijd worden getransduceerd met de op SIV-gebaseerde Vpx-VLP's en op HIV-gebaseerde SIN-lentivirale vector deeltjes die zijn geproduceerd met 2^e- of 3^e-generatie packaging construct. De sequentieovereenkomst tussen de constructen die gebruikt worden voor de productie van de Vpx-VLP's en de SIN-lentivirale vectoren is dermate gering dat de kans op recombinatie tussen deze constructen, mochten zij in dezelfde cel terechtkomen, naar oordeel van de COGEM verwaarloosbaar klein is. De COGEM is daarom van oordeel dat de verwaarloosbaar kleine kans op het ontstaan van replicatie-competent lentivirus (RCL) bij het gebruik van 2^e- of 3^e-generatie SIN-lentivirale vectoren niet door het beschreven gebruik van de Vpx-VLP's wordt verhoogd.¹⁷

6. Advies

De bovenstaande overwegingen in ogenschouw nemende, adviseert de COGEM inschaling van de voorgenomen werkzaamheden op ML-II, met inachtneming van de voorgestelde aanvullende voorwaarden dat het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere lentivirussen. De COGEM is van oordeel dat op dit inperkingsniveau en met deze aanvullende voorwaarde, de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) taxonomy. Taxonomy of simian immunodeficiency virus. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202205034 (bezocht op 6 oktober 2026)
2. Coffin J et al. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Retroviridae* 2021. J. Gen. Virol. 102: 001712
3. Gifford RJ et al. (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. Retrovirology 15: 59
4. Mager DL & Stoye JP (2015). Mammalian endogenous retroviruses. Microbiol. Spectr. 3: MDNA3-0009-2014
5. 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
6. Lim ES & Emerman M. (2009). Simian immunodeficiency virus SIVagm from African green monkeys does not antagonize endogenous levels of African green monkey tetherin/BST-2. J. Virol. 83: 11673-11681
7. Sunseri N et al. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 modified to package Simian immunodeficiency virus Vpx efficiently infects macrophages and dendritic cells. J. Virol. 85: 6263-6274
8. Gao F et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. Nature 397: 436-441
9. Damond F et al. (2004). Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 20: 666-672
10. Hirsch VM et al. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. Nature 339: 389-392
11. Takehisa J et al. (2009). Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. J. Virol. 83: 1635-1648
12. Kim K et al. (2019). Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5alpha. J. Nat Microbiol. 4: 2044-2051
13. Wei W et al. (2012). A novel DCAF1-binding motif required for Vpx-mediated degradation of nuclear SAMHD1 and Vpr-induced G2 arrest. Cell Microbiol. 4: 1745-1756
14. COGEM (2026). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van DNA- en RNA-virussen (2026). COGEM-advies CGM/260225-03
15. Aldovini A & Young RA (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. J. Virol. 64: 1920-1926
16. Muriaux D et al. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 5246-5251
17. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM-advies CGM/210218-01