

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 22 januari 2025
KENMERK CGM/250122-01
ONDERWERP Advies virale promotorsequenties in lenti- en retrovirale vectoren

Geachte heer Jansen,

Voor gentherapiestudies waarbij gebruik wordt gemaakt van humane cellen die buiten het lichaam genetisch zijn aangepast en daarna weer in de patiënt worden teruggeplaatst, gelden versnelde vergunningprocedures met als doel vergunning-aanvragen voor deze studies te vereenvoudigen. Hiervoor is in het verleden door de COGEM een generieke milieurisicobeoordeling uitgevoerd en zijn bepaalde randvoorwaarden opgesteld. Indien aan deze randvoorwaarden voldaan wordt, is de COGEM van oordeel dat de risico's van de voorgenenomen klinische studie verwaarloosbaar klein zijn. In dit advies wordt uitleg gegeven over de interpretatie van één van de gestelde randvoorwaarden.

De COGEM heeft in 2019 en 2020 een generieke milieurisicobeoordeling uitgevoerd voor vectoren afgeleid van lentivirussen en retrovirussen die gebruikt worden voor *ex vivo* transductie van cellen voor klinische studies.^{1,2,3} Zij heeft hierover geconcludeerd 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; species *Gammaretrovirus murleu*) en bij toepassing van zelf-inactiverende ('self inactivating'; SIN) lentivirale vectoren gebaseerd op Human immunodeficiency virus 1 (HIV-

-
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

1; species *Lentivirus humimdef1*) geproduceerd met een 3^e generatie productiesysteem, mits er aan verscheidene randvoorwaarden is voldaan.

In juni 2024 heeft de COGEM geadviseerd over een verdere specificatie van de randvoorwaarde 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’.⁴ In dit advies concludeerde de COGEM dat virale promotorsequenties, niet-virale intronen, ‘internal ribosome entry sites’ (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.

Door dit advies is onduidelijkheid ontstaan over de status van veelgebruikte retro- en lentivirale promotorsequenties die toegepast worden om het transgen tot expressie te brengen. In het verleden is in bepaalde gevallen het gebruik van lenti- of retrovirale promotoren in lenti- of retrovirale vectoren bij klinische studies toegestaan, omdat deze niet tot complementatie van de replicatie-deficiënte vector leiden. De lenti- of retrovirale promotorsequenties die in klinische studies toegepast zijn en waarover eerder positief is geadviseerd door de COGEM, of die via de versnelde procedure (vergunning onder voorwaarden; VoV) zijn vergund, worden hieronder beschreven.

1. Lenti- of retrovirale promotorsequenties in gammaretrovirale vectoren

In retrovirale vectoren wordt de expressie van het transgen vaak gedreven door de ‘long terminal repeat’ (LTR) sequenties.⁵ De LTR-sequenties bevinden zich zowel aan het 5’- als het 3’-uiteinde van het provirale genoom. Omdat de 5’LTR-sequentie over promotoractiviteit beschikt, is het niet nodig om in de transgencassette van een (niet-SIN) retrovirale vector een aanvullende promotorsequentie op te nemen. De LTR-sequenties van (niet-SIN) retrovirale vectoren kunnen worden uitgewisseld, waarbij de LTR-sequenties van andere verwante gammaretrovirussen gebruikt kunnen worden. Hierbij kunnen ook 5’ leadersequenties gelegen achter de 5’LTR, welke belangrijke regulatoire functies hebben, uitgewisseld worden. Deze LTR- en leadersequenties zijn echter geen onderdeel van het transgen zoals bedoeld in de eerdergenoemde randvoorwaarde, maar van de vector-backbone. Omdat het echter wel promotorsequenties betreft die expressie van het transgen mogelijk maken, wordt hierop in het onderhavige advies kort ingegaan.

In klinische studies waarover de COGEM positief geadviseerd heeft, of die via een VoV vergund zijn, zijn LTR- en leadersequenties afkomstig van de gammaretrovirussen MoMLV, Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV), Spleen focus-forming virus (SFFV), Murine stem cell virus (MSCV) en Murine embryonic stem cell virus (MESV) toegepast. Hierbij zijn zowel

4. COGEM (2024). Generiek advies over elementen in lenti- en retrovirale vectoren. COGEM advies CGM/240612-01

5. Er bestaan namelijk ook SIN-retrovirale vectoren, waarbij de promotor en ‘enhancer’ elementen in de 3’LTR zijn verwijderd en het transgen door een interne promotor of regulatoire sequentie tot expressie wordt gebracht.

gehele LTR- en leadersequenties afkomstig van één virus, als chimere sequenties samengesteld uit LTR- en leadersequenties afkomstig van verschillende gammaretrovirussen, gebruikt.

De COGEM is van oordeel dat het milieurisico van het uitwisselen van deze gammaretrovirale LTR- en leadersequenties in retrovirale vectoren verwaarloosbaar klein is. Hierbij worden namelijk geen retrovirale elementen aan het systeem toegevoegd die recombinatie en complementatie mogelijk maken, waardoor de kans op het ontstaan van replicatie-competent retrovirus (RCR), niet toe zal nemen.

2. Lenti- of retrovirale promotorsequenties in SIN-lentivirale vectoren

In SIN-lentivirale vectoren zijn de promotorsequenties in de 3'-LTR verwijderd en worden interne promotoren en regulatoire sequenties ingebouwd om het transgen tot expressie te brengen. In eerdere klinische studies waarbij gebruikt gemaakt wordt van een SIN-lentivirale vector geproduceerd met een 3^e generatie productiesysteem waarover de COGEM positief heeft geadviseerd, of die via een VoV zijn vergund, zijn hiervoor de volgende lenti- of retrovirale promotorsequenties toegepast:

- Murine stem cell virus (MSCV) promoter.
- 'Myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) enhancer, negative control region (NCR) deleted, dl587rev primer-binding site (PBS) substituted' (MND) promoter afgeleid van MoMLV, ook wel MNDU3 genoemd. Dit promotorelement bevat de U3 regio van de MoMLV LTR-sequentie met de MPSV enhancer, waarin de NCR gedeleteerd is en waarbij de MoMLV PBS vervangen is door de PBS van de MoMLV dl587rev stam.
- Chimere promotor bestaande uit een humane promotor en een partiële LTR-sequentie van HTLV waaruit het U3-domein en een deel van het U5-domein zijn verwijderd.

De COGEM is van oordeel dat het milieurisico van het gebruik van deze lenti- of gammaretrovirale promotorelementen voor het tot expressie brengen van het transgen in SIN-lentivirale vectoren geproduceerd met een 3^e generatie productiesysteem verwaarloosbaar klein is.

De genoemde sequenties hebben geringe sequentieovereenkomst met HIV. Recombinatie van deze promotorsequenties met de SIN-LTR in de lentivirale vector waardoor een volledig actieve (niet-SIN) LTR in de lentivirale vector zou kunnen ontstaan, is daarom onwaarschijnlijk. Het gebruik van deze promotorsequenties zal de kans op de vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL) bij SIN-lentivirale vectoren geproduceerd met een 3^e generatie productiesysteem niet vergroten, en de kans op RCL vorming is derhalve verwaarloosbaar klein.

De kans op recombinatie tussen een lentivirale vector met deze promotorelementen en de wildtype virussen waarvan de elementen zijn afgeleid (HTLV of gammaretrovirus), acht de COGEM ook verwaarloosbaar klein. HTLV heeft een lage prevalentie in Nederland en er zijn

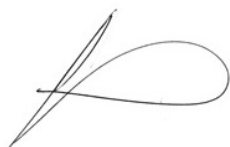
geen gammaretrovirussen bekend die mensen infecteren. De kans is dus klein dat de lentivirale vector en de wildtype virussen in eenzelfde cel terecht komen. Daarnaast zou voor het optreden van recombinatie 'co-packaging' op moeten treden waarbij de transfervector en het genoom van het wildtype virus in één virusdeeltje worden ingepakt, dat vervolgens een andere cel infecteert, waarna tijdens het 'reverse transcriptie proces' recombinatie zou moeten plaatsvinden. Productie van de lentivirale vector is echter niet efficiënt omdat een SIN-lentivirale vector wordt gebruikt. Ook is co-packaging waarschijnlijk niet efficiënt. Met betrekking tot HTLV is er bij de COGEM geen literatuur bekend die co-packaging van HTLV-1 met andere humane lentivirussen rapporteert.

3. Conclusie

Samenvattend is de COGEM van oordeel dat de in dit advies genoemde lenti- en retrovirale promotorsequenties beschouwd kunnen worden als virale sequenties die niet zullen leiden tot complementatie van een MoMLV retrovirale vector of een SIN-lentivirale vector, en dat deze derhalve vallen onder de eerder gestelde randvoorwaarden van de COGEM.^{1,2,3}

De COGEM adviseert om de in dit advies genoemde promotorsequenties onder de reikwijdte van de VoV te laten vallen. Deze lijst is overigens niet limitatief. Wanneer in de toekomst meer lenti- of retrovirale promotorsequenties voldoen aan de voorwaarde dat deze niet tot complementatie van de lenti- of retrovirale vectoren leiden, kunnen deze aan de lijst toegevoegd worden.

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
- Dr. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Gentherapie