

GROEPEN VAN GASTEREN, VECTOREN EN DONORSEQUENTIES MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL

INLEIDING

Het document Groepen van Gelijk Risicoprofiel (GvGRP) is ontwikkeld om de administratieve lasten bij veel aangevraagde reguliere werkzaamheden, waarbij er sprake is van een historie van veilig gebruik, te verlagen en een groot deel van de reguliere werkzaamheden eenvoudiger inzichtelijk te maken. Daarnaast dient het document als praktisch hulpmiddel voor biologischeveiligheidsfunctionarissen bij het uitvoeren van risicobeoordelingen en het inschalen van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen.

In de GvGRP methodiek worden gastheren, vectoren en donorsequenties omschreven als afgekaderde groepen van gelijk risicoprofiel met specifieke criteria in plaats van individuele cellen, plasmiden, of sequenties. Voor werkzaamheden met verschillende combinaties van deze GvGRP is vervolgens een generieke risicobeoordeling opgesteld in de vorm van de meegeleverde GvGRP inschalingstabel. Dit vergemakkelijkt het aanvragen van werkzaamheden indien zij voldoen aan de criteria beschreven in dit document. Het is belangrijk om te benadrukken dat de GvGRP methodiek focust op een aantal veel aangevraagde reguliere werkzaamheden en niet bedoeld is om alle mogelijke aanvragen onder zijn paraplu te vangen. Meer specialistische werkzaamheden vallen al snel buiten het hier gestelde kader, maar kunnen alsnog op de reguliere wijze worden aangevraagd zonder het gebruik van GvGRP.

Echter indien de aangevraagde werkzaamheden bestaan uit een combinatie van een gastheer, vector en donorsequentie welke voldoen aan de criteria beschreven voor de GvGRP in bijlage 1 van dit document, is het afdoende om bij een aanvraag enkel:

- aan te geven welke GvGRP's er bij de werkzaamheden worden gecombineerd
- in de GvGRP inschalingstabel (zie bijlage) af te lezen welk inschalingsartikel, CFI en welke aanvullende voorschriften van toepassing zijn
- Deze gegevens in het aanvraagformulier op te nemen.

Dit betekent tevens dat het toevoegen van bijvoorbeeld een nieuwe cellijn aan een activiteit niet leidt tot het wijzigen van een kennisgeving indien de GvGRP waartoe deze cellijn behoort al onderdeel is van de reeds kennisgegeven activiteit.

Belangrijk: Aanvullende gegevens met betrekking tot een verdere specificatie van gastheer, vector en donorsequenties dienen niet bij bGGO ingediend te worden bij het gebruik van de GvGRP methodiek.

In deze context ontvangt bGGO van de aanvrager dus niet langer:

- een specificatie van elke individuele gastheer, vector of donorsequentie
- plasmidekaartjes
- een omschrijving van de vervaardiging van cellen/vectoren
- een risicobeoordeling opgesteld door de aanvrager

Belangrijk: Of de combinatie van gastheer, vector en donorsequentie inderdaad voldoet aan de GvGRP criteria opgesteld in dit document is de verantwoordelijkheid van de aanvrager.

Dit GvGRP document is tot stand gekomen in samenwerking tussen bGGO en BVFen uit het veld. Het betreft nadrukkelijk geen vervanging van de Regeling ggo milieubeheer 2013, maar een aanvullende tool binnen de kaders van bestaande regelgeving specifiek voor werkzaamheden met lenti- en plasmidevectoren. In vervolgfases zal worden verkend of het principe van groepen van gelijk risicoprofiel ook kan worden toegepast op andere veel gebruikte vectorsystemen.

1. DEFINITIES VOOR GROEPEN MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL VAN GASTHEREN, VECTOREN EN DONORSEQUENTIES

Bijlage 1 van dit rapport bevat de definities voor groepen met een gelijk risicoprofiel (GvGRP) van gastheren, vectoren en donorsequenties. Deze bijlage richt zich op groepen van gastheren en donorsequenties die in combinatie met plasmiden en/of ingeperkte lentivirale vectorsystemen worden gebruikt. Voor werkzaamheden met andere (virale) vectoren kunnen indien relevant in de toekomst afzonderlijke documenten worden opgesteld, waarbij zoveel mogelijk wordt aangesloten bij de gehanteerde structuur en systematiek van deze versie.

De definities voorzien in een afbakening van de groepen gastheren, vectoren en donorsequenties en bieden toelichting op de voorwaarden waaronder deze groepen kunnen worden toegepast. Zo wordt nadrukkelijk aandacht besteed aan de mogelijke aanwezigheid van wildtype virussen of virale sequenties in cellijnen, en aan de vereisten ten aanzien van recombinatie- of complementatierisico's. Ook is vastgelegd dat de schadelijkheid van een genproduct steeds in de context van het specifieke ggo en de voorgenomen werkzaamheden moet worden beoordeeld, conform de Regeling ggo milieubeheer 2013.

Gastheren:

De indeling van gastheren omvat verschillende groepen van primaire cellen en cellijnen, waaronder tumorcellen, niet-viraal geïmmortaliseerde cellen, en cellen die met wildtype virussen zijn geïmmortaliseerd. Tevens is een afzonderlijke groep gedefinieerd voor productiecellen van lentivirale partikels. De beschreven voorwaarden maken onderscheid tussen groepen op basis van hun herkomst, eventuele aanwezigheid van virale sequenties, en de wijze van immortaliteit.

Een belangrijke aspect bij het gebruik van de gastheercel GvGRP's betreft de mogelijke aanwezigheid van wildtype virussen in gebruikte cellijnen. Het loslaten van de verplichting om rekening te houden met de aanwezigheid van wildtype virussen die niet relevant zijn voor de risicobeoordeling in de context van de beschreven werkzaamheden, biedt instellingen meer vrijheid om bredere aanvragen in te dienen en vermindert de administratieve belasting voor aanvragers. De Biologische veiligheidsfunctionaris (BVF) dient echter nog steeds te beoordelen of de mogelijke aanwezigheid van een wildtype virus binnen de beschreven werkzaamheden aanleiding kan geven tot een andere inschaling, of tot aanvullende voorschriften. Voor een nadere toelichting wordt verwezen naar het onderdeel "Let op" in bijlage 1 onder hoofdstuk 1, Groepen van gastheren met een gelijk risicoprofiel.

Vectoren:

Voor de vectoren zijn een aantal vector systemen samengevoegd in één groep van gelijk risicoprofiel met als doel de praktische toepasbaarheid te vergroten en onnodige complexiteit te beperken. Zo wordt er geen onderscheid gemaakt tussen 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale plasmiden en partikels aangezien combinaties van vectoren uit deze systemen niet tot aanvullende risico's of een andere classificatie van fysiek inperkingsniveau (CFI) leiden in de context van werkzaamheden met de hier beschreven GvGRP. Daarom is er voor gekozen om lentivirale partikels vervaardigd met combinaties van 2^e generatie en 3^e generatie SIN lentivirale transfer- en packagingvectoren, evenals de bijbehorende pseudotypingvectoren, gezamenlijk onder één noemer te brengen, namelijk: 2e/3e generatie SIN partikels. Vervaardigde lentivirale partikels die binnen deze categorie vallen, resulteren in de binnen dit document beschreven werkzaamheden tot hetzelfde risicoprofiel en dezelfde inschaling, en kunnen daarom als één groep van gelijk risicoprofiel worden beschouwd. Dit verlaagt de administratieve last met betrekking tot het specificeren van individuele vectoren binnen het gebruikte systeem en het niet langer hoeven aanleveren van bijvoorbeeld plasmidekaartjes.

Er zijn echter aparte GvGRP's opgesteld voor vectoren die een EBV- of SV40-ori of replicatie (ori) bevatten, aangezien de aanwezigheid van deze elementen aanleiding kan geven tot een hogere inschaling. Daarnaast zijn translentivirale vectorsystemen ook bewust als aparte GvGRP ingedeeld, omdat combinaties van translentivirale vectorsystemen met 2e en 3e generatie SIN lentivirale vectorsystemen tot een ander risicoprofiel kunnen leiden.

Bij transductiewerkzaamheden met cellijnen volstaat het bij het gebruik van GvGRP voortaan om in het aanvraagformulier te verwijzen naar de overkoepelende groep, bijvoorbeeld 2^e/3^e generatie SIN partikels zonder virale ori, zonder dat alle onderliggende vectoren afzonderlijk benoemd hoeven worden bij het

indienen van een aanvraag.

De vectoren die vallen onder GvGRP-groep 4.3, Plasmide met muizen gammaretrovirale sequenties met meer dan één LTR, zijn expliciet opgenomen om te benadrukken dat deze vectoren moeten worden ingeschaald via artikel 5.4.1.g en uitkomen op ML II. Dit volgt uit het feit dat in animale cellen en cellijnen, inclusief humane cellen en cellijnen, een retrovirusbesmetting als gegeven wordt beschouwd.

Donorsequenties:

Er zijn elf donorsequentie GvGRP's opgesteld. Ook hier geldt dat een verdere specificatie niet hoeft te worden gegeven afgezien van de donorsequentie GvGRP.

Met dit document wordt een eenduidige basis gelegd voor de toepassing van groepen van gelijk risicoprofiel in de praktijk. De gehanteerde structuur maakt het mogelijk om toekomstige uitbreidingen, waaronder documenten voor andere virale vectorsystemen, binnen hetzelfde raamwerk vorm te geven, zodat de consistentie tussen de verschillende GvGRP-documenten behouden blijft.

2. RISICOBEOORDELINGEN OP BASIS VAN DE DIVERSE COMBINATIES VAN GROEPEN MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL VAN GASTHEREN, VECTOREN EN DONORSEQUENTIES

Aan dit document is een bijlage toegevoegd met de titel GvGRP inschalingstabel. Deze bijlage bevat een visuele weergave van de combinaties van de GvGRP-groepen voor gastheer, vector en donorsequentie, met daarbij het resulterende inschalingsartikel, het bijbehorende classificatieniveau (CFI) en, waar van toepassing, de aanvullende voorschriften. Uit de GvGRP inschalingstabel blijkt dat met name werkzaamheden waarbij een SV40- of EBV-ori aanwezig is op de vector kunnen leiden tot een ML II-inschaling. Dit document betreft een werkwijze welke volledig binnen de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 opereert. Ook bij het gebruik van GvGRP dient de risicobeoordeling dus te voldoen aan de voorwaarden gesteld in de Regeling.

De GvGRP inschalingstabel kan in combinatie met het GvGRP lenti en plasmiden document gezien worden als een generieke risicobeoordeling voor de werkzaamheden die aangevraagd kunnen worden met de GvGRP methodiek. Dit betekent dat het in deze context niet langer noodzakelijk is om een risicobeoordeling op te stellen voor deze werkzaamheden bij het indienen van een aanvraag.

3. PRAKTISCHE INFORMATIE

De GvGRP-groepsdefinities worden centraal beheerd door bGGO. Tijdens het ontwikkelingstraject is echter, in samenwerking met BVFen uit het veld, besloten dat het centraal bijhouden van lijsten met indelingen binnen deze GvGRP-groepsdefinities in de praktijk niet wenselijk is. Dit betekent dat bij toepassing van deze methodiek rechtspersonen zelf verantwoordelijk zijn voor de correcte indeling van gebruikte gastheren, vectoren en donorsequenties binnen de vastgestelde GvGRP-kaders, en dat zij hiervoor eigen lijsten bijhouden.

De definities van groepen zoals gepresenteerd in Bijlage 1, zijn opgesteld voor toepassing in de risicobeoordeling volgens Bijlage 5 voor inperkingsniveau's I en II. Het staat onderzoeksinstellingen vrij om bij het intern vullen van de groepen met bv. lijsten van gastheren hier andere informatie over deze gastheren aan toe te voegen waarmee de bruikbaarheid van deze lijsten wordt vergroot.

Het is geen verplichting om met de GvGRP methodiek te werken. Het mag altijd en kan ook altijd later als dit nu niet direct mogelijk is voor een gebruiker of de instelling waar hij/zij werkzaam is. De groepen in Bijlage 1 kunnen in de toekomst verder worden aangevuld of uitgebreid. Daarbij is het van belang dat de definities eenduidig blijven en niet leiden tot het uiteenvallen in subgroepen die in een bepaalde combinatie tot andere uitkomsten van de risicobeoordeling leiden. Ook moeten groepen een brede doelgroep dienen; groepen moeten niet toegesneden zijn op specialistisch werk dat slechts op één of twee instituten plaatsvindt.

Wanneer gebruik wordt gemaakt van de in dit document beschreven Groepen van Gelijk Risicoprofiel (GvGRP), bestaande uit een combinatie van een gastheergroep, een vectorgroep en één of meerdere donorsequentiegroepen, volstaat het om deze groepen in de aanvraag te vermelden. Een afzonderlijke risicobeoordeling is in dat geval niet vereist, aangezien voor de combinaties binnen deze gedefinieerde

groepen reeds een generieke risicobeoordeling is uitgevoerd. Zie voor een visueel overzicht van deze combinaties en de bijbehorende inschalingsartikelen, CFI's en eventuele aanvullende voorschriften de GvGRP inschalingstabel.

Invul voorbeelden aanvraagformulier ingeperkt gebruik:

Bij de beschreven werkzaamheden dient enkel onderstaande informatie te worden ingevuld in het aanvraagformulier. Verdere informatie is niet benodigd.

Voorbeeld 1:

U gaat een niet genetisch gemodificeerde EBV positieve cellijn transfecteren met een translentivirale transfer vector met EBV ori om twee niet schadelijke humane genen tot expressie te brengen in combinatie met een tussengelegen 2A klievingssequentie afkomstig van een virus van pathogeniteitsklasse 3 en een Strep-tag.

Titel activiteit (animale cellen met viraal systeem, infectie/productie, ingeperkt/niet ingeperkt etc)		Transfectie van animale cellen ten behoeve van eiwit en/of RNA expressie met behulp van een virale transfervector				
	Activiteit	PG	Deel I	Deel II	CFI	toelichting
Gastheren	Groep 5 van gastheren GvGRP lenti en plasmiden		5.4.1g	5.10.2c/ 5.10.3d	ML-II	9.1.1.3.3.5 9.1.1.3.3.12 Vorming van gg-EBV niet uitgesloten
Vectoren	Groep 2.1.2 van vectoren GvGRP lenti en plasmiden					
Donor sequenties	Groepen I, VI, VII van donorsequenties GvGRP lenti en plasmiden					

NB: Bij het invullen van het aanvraagformulier dient geen PG klasse te worden aangegeven. Deze informatie is onderdeel van de groepsdefinities.

Voorbeeld 2:

U gaat lentivirale partikels produceren met behulp van HEK-293T cellen. U gebruikt hiervoor een 3^e generatie SIN transfervector, een 3^e generatie lentivirale packaging vectoren en een VSV-G pseudotyperingsvector. De transfer vector bevat een SV40 ori, een humaan niet schadelijk gen en een GFP gen.

Titel activiteit (animale cellen met viraal systeem, infectie/productie, ingeperkt/niet ingeperkt etc)		Transfectie van animale cellen ten behoeve van eiwit en/of RNA expressie met behulp van een virale transfervector				
	Activiteit	PG	Deel I	Deel II	CFI	toelichting
Gastheren	Groep 5 van gastheren GvGRP lenti en plasmiden		5.4.2.i	5.9.2.b	ML-I	9.1.1.1.3.6
Vectoren	Groep 1.1.3 van vectoren GvGRP lenti en plasmiden Groep 1.2 van vectoren GvGRP lenti en plasmiden Groep 3.1 van vectoren GvGRP lenti en plasmiden					
Donor sequenties	Groepen I en II van donorsequenties GvGRP lenti en plasmiden					

NB: Bij het invullen van het aanvraagformulier dient geen PG klasse te worden aangegeven. Deze informatie is onderdeel van de groepsdefinities.

Let op:

Het staat aanvragers vrij om de binnen dit GvGRP-document vastgestelde groepen te combineren met:

- gastheren, vectoren, of donorsequenties buiten de in dit document beschreven kaders

In dergelijke gevallen:

- is geen sprake van een generieke risicobeoordeling volgens de GvGRP-methode
- is de beperkte informatie zoals geformuleerd voor de GvGRP- methode niet langer afdoende

De aanvrager moet in dit geval zoals gebruikelijk bij reguliere aanvragen en kennisgevingen:

- een aanvullende, projectspecifieke risicobeoordeling aanleveren

Deze risicobeoordeling moet ten minste bevatten:

- een beschrijving van de werkzaamheden
- een onderbouwing waarom de gebruikte GvGRP groepsdefinitie voor gastheren, vectoren en/of donorsequenties binnen de context van de werkzaamheden nog steeds als groepen van een gelijk risicoprofiel kunnen worden beschouwd
- een onderbouwing waarom de voorgestelde inschaling (met eventuele aanvullende voorschriften) leidt tot een verwaarloosbaar risico

BIJLAGE 1. DEFINITIES VOOR GROEPEN MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL VAN GASTHEREN, VECTOREN EN DONORSEQUENTIES.

In dit document wordt enkel ingegaan op GvGRP welke in het kader van werkzaamheden met plasmiden en lentivirale vectoren gebruikt kunnen worden.

Algemene toelichting op het gebruik van groepen van gastheren, vectoren en donorsequenties:

- Bij handelingen met cellen en cellijnen in associatie met plasmide vectoren of een virale vector dient, naast met de vector en de donorsequentie, rekening te worden gehouden met (de mogelijke) aanwezigheid van (wildtype) virussen en virale sequenties die bij de vervaardiging van de cellijn zijn toegepast of die als besmetting in de cellen aanwezig kunnen zijn. Er dient in de risicoanalyse rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van recombinatie en/of complementatie met deze wildtype virussen en/of virale sequenties, waardoor er een recombinant virus kan ontstaan.
- De schadelijkheid van een genproduct dient te allen tijde bepaald te worden in de context van het ggo en de uit te voeren werkzaamheden. Hierbij wordt de definitie gebruikt zoals gesteld in artikel 2 van Afdeling 1.2. Begripsbepalingen van de Regeling ggo milieubeheer 2013.
- Het inperkingsniveau mag bij het gebruik van de groepen van gastheren, vectoren en donorsequenties niet anders zijn dan I of II.

1. GROEPEN VAN GASTHEREN MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL

LET OP:

- De cellen en cellijnen mogen wildtype virussen bevatten tenzij nadrukkelijk anders vermeld staat in de omschrijving van de groep.
 - Cellen waarvan gezien de herkomst redelijkerwijs verondersteld kan of mag worden dat ze de volgende virussen zouden kunnen bevatten die van invloed zijn op de RB van de in de groepen ingedeelde vectoren betreffen de volgende categorieën:
 - HTLV, en HIV en andere verwante lentivirussen (werkzaamheden met deze cellen kunnen niet middels dit document worden ingeschaald).
 - EBV (Groep 5)
 - SV₄₀ en andere polyomavirussen (Groep 6)
 - Cellen met overige wild-type virus infecties kunnen worden ingedeeld in de groep die van toepassing is indien de aanvrager hierbij het volgende meeneemt in de beoordeling: Voor overige wild-type virussen die (voor zover bekend of onbekend) in een cel aanwezig zouden kunnen zijn is de kans zeer gering dat hiervan toevalligse sequenties worden gehanteerd die ook worden toegepast in de gebruikte virale vector, plasmide (als viraal regulatorisch element), of als individuele virale donorsequentie en dat deze vervolgens van invloed zijn op de inschaling, tenzij dit doelbewust wordt gedaan bv. voor productiedoeleinden. Indien voor een bepaalde cellijn een besmetting met een wildtype virus echter bij de gebruiker bekend is dan dient deze er zich van te vergewissen dat er geen sequenties van hetzelfde virus op de gebruikte virale vector, plasmide, of donorsequenties aanwezig zijn waardoor recombinant virus zou kunnen ontstaan en waarvoor een andere inschaling geldt. Indien een dergelijke cellijn wordt geïdentificeerd, dient deze uit de betreffende GvGRP verwijderd te worden door de BVF/rechtspersoon. De werkzaamheden kunnen in dat geval niet via de GvGRP methodiek worden aangevraagd. Indiening van de werkzaamheden via reguliere procedures is echter nog steeds mogelijk.
 - De verantwoordelijkheid voor de juiste identificatie van en het vergaren van informatie over cellijnen ligt bij de aanvrager. De verantwoordelijkheid van het juist indelen en excluderen van gehanteerde cellijnen in de (flexibele) GvGRP ligt bij de aanvrager.
 - Besmetting van animale cellen en cellijnen met retrovirussen wordt als gegeven beschouwd, dit geldt ook voor humane cellen en cellijnen.
 - In de in dit document beschreven context is herhaaldelijke transfectie/transductie van dezelfde gastheer met hetzelfde vectorsysteem mogelijk.
- De animale cellen en cellijnen mogen alleen afkomstig zijn van de volgende soorten: zoogdieren; vogels; vissen: *Danio rerio*; Insecten: *Drosophila melanogaster*; *Xenopus*; *C. elegans*.

- Tenzij nadrukkelijk anders vermeld betreft het alleen cellen en cellijnen afkomstig van niet genetisch gemodificeerde organismen.

Algemene benaming van centrale container

Enkel de hoofdgroep (groep 1 t/m 6) is relevant bij het indienen van een aanvraag middels GvGRP met betrekking tot het aanduiden van de gastheer GvGRP. De verdere onderverdeling verschaft slechts duidelijkheid over welke cellen onder de groep vallen. Ga eerst na of groep 3 t/m 6 van toepassing is alvorens over te gaan tot indeling in de algemenere groepen 1 en 2.

Groep 1 (Indien groep 3 t/m 6 niet van toepassing is)

Primaire cellen

Hieronder worden cellen verstaan die direct geïsoleerd zijn uit organen en weefsels en zonder bewerkingen worden gebruikt als gastheer.

Primaire tumorcellen

Hieronder worden cellen verstaan die direct geïsoleerd zijn uit tumoren en zonder bewerkingen worden gebruikt als gastheer.

Tumorcellijnen

Hieronder worden cellijnen verstaan die uit tumorweefsel zijn geïsoleerd en zijn gekweekt zonder verdere modificatie.

Niet viraal geïmmortaliseerde cellen niet vervaardigd d.m.v. genetische modificatie

Hieronder worden cellijnen verstaan die spontaan zijn geïmmortaliseerd of zijn vervaardigd met technieken zoals chemische immortalisatie, serum of groeifactor selectie.

Groep 2 (Indien groep 3 t/m 6 niet van toepassing is)

Primaire cellen van genetisch gemodificeerde zoogdieren, vogels, vissen, *Xenopus* of *Drosophila melanogaster* ingeschaald op D-I inperkingsniveau conform 5.6.1.a van de regeling
Hieronder worden cellen verstaan die direct geïsoleerd zijn uit organen en weefsels en zonder bewerkingen worden gebruikt als gastheer.

Embryonale fibroblasten van genetisch gemodificeerde zoogdieren, vogels, vissen, *Xenopus* of *Drosophila melanogaster* ingeschaald op D-I inperkingsniveau conform 5.6.1.a van de regeling

Groep 3

Niet viraal geïmmortaliseerde cellen vervaardigd d.m.v. genetische modificatie

Bij de genetische modificatie van de cellen zijn plasmiden gebruikt van groep 5 van de vectoren groepen met één, of meerdere van de volgende genen: hTERT of SV40 LargeT of iPS genen (Oct-3/4, Sox family, Klf family, myc family, Nanog, LIN28, GLIS1) en COS-1 t/m -6.

Productie cellen voor virale deeltjes

Groep 4

Productiecellen van virale partikels

Deze groep bevat enkel de volgende cellijnen: HEK-293 (293), HEK-293T (293T), 293Tt, 293FT, Flp-In 293, 911, 911T, 911tT, 911t/TS-E4, HER-XhoICl, PerC6, PerC6T, PerC6tT, Caco-2, HepG2, SAOS.

Cellen die zijn geïmmortaliseerd met of wildtype virussen bevatten

Groep 5

EBV positieve cellen

Hieronder worden cellen verstaan die met een wildtype EBV virus zijn geïnfecteerd en hierdoor zijn geïmmortaliseerd. Ook cellen/cellijnen die zijn geïsoleerd uit EBV geïnduceerde tumoren (zoals Burkitts lymphoma) en lymfocyten van de mens waarbij er een gerede kans is op de aanwezigheid van wildtype EBV vallen hieronder.

Groep 6**Polyomavirus positieve cellen**

Hieronder worden cellen verstaan die met een wildtype polyomavirus zijn geïnfecteerd en hierdoor zijn geïmmortaliseerd. Alleen van toepassing op PG2 polyomavirussen vermeld in bijlage 4 van de Regeling ggo milieubeheer 2013, overige polyomavirussen zijn uitgesloten.

Ook cellen/cellijnen die geïsoleerd zijn uit polyomavirus geïnduceerde tumoren vallen hieronder.

NB: SV-40 is een klasse 2 polyomavirus hierdoor vallen ook de volgende cellen en cellijnen in deze groep:

- o Wildtype SV40 bevattende cellen en SV40 geïmmortaliseerde cellen
- o cellen/cellijnen van apen waarbij er een gerede kans is op de aanwezigheid van wildtype SV40 vallen hieronder

2. GROEPEN VAN VECTOREN MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL
LET OP:

De vectoren dienen aan onderstaande criteria (aangepast uit Regeling ggo 2013 milieubeheer bijlage 5, artikel 5.2) te voldoen, tenzij nadrukkelijk anders vermeld staat in de omschrijving van de groep:

- i. de grootte van de vector is bekend;
- ii. er is een vectorkaartje of beschrijving beschikbaar (in de administratie van de aanvrager zelf) waarop alle samenstellende delen en relatieve posities van de vector zijn aangegeven;
- iii. de functie en de herkomst van de samenstellende delen is bekend;
- iv. de in de vector aanwezige ori's zijn bekend;
- v. de samenstellende delen behoren niet tot de definitie van schadelijk genproduct. Hierbij wordt de definitie gebruikt zoals gesteld in artikel 2 van Afdeling 1.2. Begripsbepalingen van de Regeling ggo milieubeheer. Indien dit wel het geval is dienen die delen beschouwd te worden als donorsequenties;
- vi. de vector bevat geen virale sequenties afkomstig van virussen die hogere eukaryoten als gastheer hebben, waardoor de vector als virale vector zou kunnen functioneren; indien dit wel het geval is, dienen die sequenties beschouwd te worden als donorsequenties. Bovendien bevat de vector geen virale sequenties, afkomstig van muizen gammaretrovirussen, EBV en verwante virussen, polyomavirussen en HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen tenzij dit nadrukkelijk is aangegeven in de GvGRP definitie.
- vii. Enkelvoudige heterologe oppervlakte eiwitten van virussen (met uitzondering van lentivirussen) van PG2, PG3, of PG4 welke slechts gebruikt worden in de context van een in-trans pseudotyperingsplasmide kunnen via "i" worden ingeschaald binnen GvGRP. (volgens de redeneerlijn van 5.4.1.i virale sequenties, zie toelichting voor virussen op de bGGO website)

Virale vectoren onderverdeling op systeem:**1. Lentivirale vectoren van een 2^e/3^e generatie SIN lentiviraal systeem:**

Systemen voldoen alleen aan de definitie "2^e generatie SIN lentiviraal systeem" of "3^e generatie SIN lentiviraal systeem" als ze voldoen aan de omschrijving zoals opgenomen in de Regeling ggo 2013, Artikel 2 onder Afdeling 1.2 "Begripsbepalingen". Zie ook de [informatie](#) op de site van bGGO.

- 1.1. Lentivirale transfervectoren 2^e, of 3^e generatie SIN
 - 1.1.1. Zonder virale ori
 - 1.1.2. Met een EBV ori / EBNA1
 - 1.1.3. Met een SV40 ori / SV40 promotor
- 1.2. Lentiviraal packaging systemen 2^e, of 3^e generatie SIN

In het kader van een versimpelde risicobeoordeling mogen bij het gebruik van GvGRP 2^e en 3^e generatie SIN lentivirale vectoren gecombineerd worden bij de vervaardiging van een lentiviraal partikel.

- 1.3. 2^e/3^e generatie SIN Lentivirale partikels (combinatie van vectoren uit 1.1, 1.2 en 3.1)
 - 1.3.1. Zonder virale ori
 - 1.3.2. Met een EBV ori / EBNA1
 - 1.3.3. Met een SV40 ori / SV40 promotor

2. Translenti lentiviraal vectorsysteem:

Systemen voldoen alleen aan de definitie "Translenti lentiviraal vectorsysteem" als ze voldoen aan de omschrijving zoals opgenomen in de Regeling ggo 2013, Artikel 2 onder Afdeling 1.2 "Begripsbepalingen". Zie ook de [informatie](#) op de site van bGGO.

LET OP: Translenti lentivirale transfer en packagingvectoren mogen binnen GvGRP niet met 2^e en 3^e generatie systemen worden gecombineerd:

2.1. Translenti lentivirale transfervectoren (Niet SIN)

2.1.1. Zonder virale ori

2.1.2. Met een EBV ori / EBNA1

2.1.3. Met een SV40 ori / SV40 promotor

2.2. Translenti lentiviraal packaging systemen

2.3. Translenti lentivirale partikels (combinatie van vectoren uit 2.1, 2.2 en 3.1)

2.3.1. Zonder virale ori

2.3.2. Met een EBV ori / EBNA1

2.3.3. Met een SV40 ori / SV40 promotor

3. Pseudotyperingsvectoren

3.1. Pseudotyperingsvector

4. Overige plasmide vectoren (geen virale vectoren) groepen op basis van sequenties die de inschaling kunnen beïnvloeden i.c.m. gastheer:

4.1. Plasmide met EBV-ori / EBNA 1

4.2. Plasmide met Polyomavirus ori

-Alleen van toepassing op ori's afkomstig van PG2 polyomavirussen vermeld in bijlage 4 van de Regeling ggo 2013, ori's afkomstig van overige polyomavirussen zijn uitgesloten. SV40 is een PG2 polyomavirus. Daardoor vallen in deze groep ook vectoren met een SV40 ori of SV40 promotor.

4.3. Plasmide met muizen gammaretrovirale sequenties met meer dan 1 LTR

5. Overige plasmide vectoren (geen virale vectoren).

Deze vectoren kunnen afkomstig zijn uit bijlage 2 lijst A2 van de Regeling ggo 2013 indien ze voldoen aan de criteria gesteld aan het begin van dit hoofdstuk, maar ook overige vectoren die voldoen aan deze criteria vallen onder deze groep.

3. GROEPEN VAN DONORSEQUENTIES MET EEN GELIJK RISICOPROFIEL

LET OP:

- Voor alle groepen geldt dat schadelijke genproducten zoals gesteld in artikel 2 van Afdeling 1.2. Begripsbepalingen van de Regeling ggo milieubeheer 2013 zijn uitgesloten tenzij expliciet aangegeven in de groepsdefinitie (zie groep XI).
- Voor groep III en IV geldt dat indien het enkele virale genproduct afkomstig is van een virus dat slechts één ORF bevat, dit genproduct is uitgesloten van deze groepen.
- Groep III en IV van de donorsequenties is alleen te gebruiken voor vectoren en vector systemen die onder inschalingsartikelen 5.2, 5.4.1 en 5.4.2 vallen.
- Sequenties die codon geoptimaliseerd zijn mogen ingedeeld worden in de groep waarin de oorspronkelijke sequenties zijn ingedeeld.
- Enkelvoudige heterologe oppervlakte eiwitten van virussen (met uitzondering van lentivirussen) van PG2, PG3, of PG4 welke slechts gebruikt worden in de context van een in-trans pseudotyperingsplasmide kunnen via "i" worden ingeschaald binnen GvGRP (volgens de redeneerlijn van 5.4.1.i virale sequenties, zie toelichting voor virussen op de bGGO website).

- I. Gekarakteriseerde sequenties inclusief regulatoire sequenties van zoogdieren; land- en tuinbouwgewassen; *Arabidopsis thaliana*; organismen van bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo 2013; vogels; vissen: *Danio rerio*; Insecten: *Drosophila*; *Xenopus* en *C. elegans*.
- II. Marker-en reporter genen (fluorescerend, bioluminescent, LacZ).
- III. Sequenties coderend voor een enkel genproduct of regulatoire sequentie van pathogeniteitsklasse 2 strikt dier pathogene virussen genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013, uitgezonderd regulatoire sequenties afkomstig van muizen gammaretrovirussen, EBV en verwante virussen, polyomavirussen en HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.
- IV. Sequenties coderend voor een enkel genproduct of regulatoire sequentie van pathogeniteitsklasse 2 humaan pathogene virussen genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013, uitgezonderd regulatoire sequenties afkomstig van muizen gammaretrovirussen, EBV en verwante virussen, polyomavirussen en HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen.
- V. Sequenties coderend voor een enkel genproduct of regulatoire sequentie van bacteriën, schimmels en parasieten van pathogeniteitsklasse 2 genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013.
- VI. Tag sequenties van niet-virale oorsprong (His, FLAG, GST, MBP, CBP, Myc-tag, Strep-tag, protein C-tag, E-tag, Fc-tag).
- VII. Tag sequenties van virale oorsprong afkomstig van virussen van pathogeniteitsklasse 2 en 3 genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013 (uitsluitend HA, V5-tag, VSV-G tag, AU-1 tag) en 2A klievingssequenties van virale oorsprong afkomstig van virussen van pathogeniteitsklasse 2, 3, of 4.
- VIII. Recombinatiegenen en -sequenties (Cre, LoxP, FRT en Gateway sequenties)
- IX. Antibiotica resistentie genen genoemd in onderstaande lijst van stofnamen en gen namen van antibiotica / antibiotica resistentie genen.
- X. miRNA, shRNA en siRNA gericht tegen genen van donorsequentie groep I.
- XI. Immuno-modulatoire genen van organismen beschreven onder donorsequentie groep I (welke in de context van de vector als niet schadelijk kunnen worden beoordeeld).

LIJST VAN ANTIBIOTICA RESISTENTIE GENEN BEHOREND BIJ GROEP IX

- bla of AmpR (Ampicilline resistentie)
- nptI, NeoR (Neomycine / Kanamycine / Geneticin (= G418) resistentie)
- nptII (Neomycine / Kanamycine resistentie)
- erm (Erythromycine resistentie)
- aacC1 of aacA-aphD (Gentamicine resistentie)
- tetA (Tetracycline resistentie)
- ble (Bleomycine / Phleomycine (= Zeocine) resistentie)
- CAT, CamR of CmR (Chloramphenicol resistentie)
- aadA (Spectinomycine / Streptomycine resistentie)
- hph of hpt (Hygromycine B resistentie)
- nat1 (Nourseothricine resistentie)
- bsr, bsd of bls (Blasticidine resistentie)
- pac (Puromycine resistentie)

Enkel te gebruiken in samenhang met het "GvGRP lenti en plasmiden" document

	GvGRP	Inhoud
Gastheren (cellen)	Groep 1	primaire (tumor) cellen, tumorcellijnen, niet viraal geïmmortaliseerde cellen niet vervaardigd d.m.v. genetisch modificatie
	Groep 2	primaire cellen van gg zoogdieren, vogels, vissen, Xenopus of Drosophila melanogaster ingeschaald op D-1 inperkingsniveau conform 5.6.1.a van de regeling
	Groep 3	Niet viraal geïmmortaliseerde cellen vervaardigd d.m.v. genetische modificatie
	Groep 4	Productiecellen voor 2e en 3e gen LV partikels
	Groep 5	EBV positieve cellen
	Groep 6	Polyoma positieve cellen
Transfer, packaging en pseudotyperings vectoren	1.1.1	2e/3e gen SIN TV zonder virale ori
	1.1.2	2e/3e gen SIN TV met EBV ori
	1.1.3	2e/3e gen SIN TV met SV40 ori
	1.2	2e, of 3e gen packaging vectoren
	2.1.1	translenti TV zonder virale ori
	2.1.2	translenti TV met EBV ori
	2.1.3	translenti TV met SV40 ori
	2.2	translenti packaging vectoren
	3.1	pseudotyperingsvectoren
Productie van virale partikels	$1.1.1 + 1.2 + 3.1 = 1.3.1$ partikels	2e/3e gen SIN systeem zonder virale ori
	$1.1.2 + 1.2 + 3.1 = 1.3.2$ partikels	2e/3e gen SIN systeem met EBV ori
	$1.1.3 + 1.2 + 3.1 = 1.3.3$ partikels	2e/3e gen SIN systeem met SV40 ori
	$2.1.1 + 2.2 + 3.1 = 2.3.1$ partikels	translenti systeem zonder virale ori
	$2.1.2 + 2.2 + 3.1 = 2.3.2$ partikels	translenti systeem met EBV ori
	$2.1.3 + 2.2 + 3.1 = 2.3.3$ partikels	translenti systeem met SV40 ori
Lentivirale partikels (infectie)	1.3.1	2de/3de gen SIN partikels zonder virale ori
	1.3.2	2de/3de gen SIN partikels met EBV ori
	1.3.3	2de/3de gen SIN partikels met SV40 ori
	2.3.1	translenti partikels zonder virale ori
	2.3.2	translenti partikels met EBV ori
	2.3.3	translenti partikels met SV40 ori
Plasmiden	4.1	plasmiden met EBV-ori, EBNA-1
	4.2	plasmiden met polyoma ori
	4.3	Plasmiden met muizen gammaretrovirale sequenties met meer dan 1 LTR
	5	overige plasmiden

Let bij het hanteren van de donorsequenties op de voorwaarden die beschreven staan in het GvGRP lenti en plasmiden document

Donorsequenties	I	Gekarakteriseerde sequenties inclusief regulatoire sequenties van zoogdieren; land- en tuinbouwgewassen; Arabidopsis thaliana; organismen van bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo 2013; vogels; vissen: Danio rerio; Insecten: Drosophila; Xenopus en C. elegans.
	II	Marker-en reportergenen (fluorescerend, bioluminescent, LacZ).
	III	Sequenties coderend voor een enkel genproduct of regulatoire sequentie van pathogeniteitsklasse 2 strikt dier pathogene virussen genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013, uitgezonderd regulatoire sequenties afkomstig van muizen gammaretrovirussen, EBV en verwante virussen, polyomavirussen en HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen. Tevens uitgezonderd zijn sequenties afkomstig van virussen welke slechts één open reading frame (ORF) bevatten.
	IV	Sequenties coderend voor een enkel genproduct of regulatoire sequentie van pathogeniteitsklasse 2 humaan pathogene virussen genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013, uitgezonderd regulatoire sequenties afkomstig van muizen gammaretrovirussen, EBV en verwante virussen, polyomavirussen en HIV-1, HIV-2, HTLV-1 en -2, SIV en andere non-humane lentivirussen. Tevens uitgezonderd zijn sequenties afkomstig van virussen welke slechts één open reading frame (ORF) bevatten.
	V	Sequenties coderend voor een enkel genproduct of regulatoire sequentie van bacteriën, schimmels en parasieten van pathogeniteitsklasse 2 genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013.
	VI	Tag sequenties van niet-virale oorsprong (His, FLAG, GST, MBP, CBP, Myc-tag, Strep-tag, protein C-tag, E-tag, Fc-tag).
	VII	Tag sequenties van virale oorsprong afkomstig van virussen van pathogeniteitsklasse 2 en 3 genoemd op bijlage 4 van de Regeling ggo 2013 (uitsluitend HA, V5-tag, VSV-G tag, AU-1 tag) en 2A klievingssequenties van virale oorsprong afkomstig van virussen van pathogeniteitsklasse 2, 3, of 4.
	VIII	Recombinatiegenen en -sequenties (Cre, LoxP, FRT en Gateway sequenties)
	IX	Antibiotica resistentie genen genoemd in onderstaande lijst van stofnamen en gen namen van antibiotica / antibiotica resistentie genen.
	X	miRNA, shRNA en siRNA gericht tegen genen van donorsequentie groep I.
	XI	Immuunmodulatoire genen van organismen beschreven onder donorsequentie groep I.

Lijst van antibiotica genen behorend bij groep IX

- bla of AmpR (Ampicilline resistentie)
- nptI, NeoR (Neomycine / Kanamycine / Geneticin (= G418) resistentie)
- nptII (Neomycine / Kanamycine resistentie)
- erm (Erythromycine resistentie)
- aacC1 of aacA-aphD (Gentamicine resistentie)
- tetA (Tetracycline resistentie)
- ble (Bleomycine / Phleomycine (= Zeocine) resistentie)
- CAT, CamR of CmR (Chloramphenicol resistentie)
- aadA (Spectinomycine / Streptomycine resistentie)
- hph of hpt (Hygromycine B resistentie)
- nat1 (Nourseothricine resistentie)
- bsr, bsd of bls (Blasticidine resistentie)
- pac (Puromycine resistentie)